

Tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica

*“Variabilidad genética del virus de la Hepatitis C en
pacientes Uruguayos co-infectados con el virus de la
Inmunodeficiencia humana”*

Estudiante: Matias Castells

Orientador: Rodney Colina

Co-orientador: Juan Cristina

Laboratorio de Virología Molecular,
Centro de Investigaciones Nucleares,
Facultad de Ciencias,
Universidad de la República

Agradecimientos

A mi familia, porque son lo más importante que tengo, Papi, Mami, Cande, Feli, Agus, Fonchi, abuelos, tios, primos y ahijada.

A mi tutor, Rodney, por la oportunidad de realizar mi tesis bajo su orientación, por todo lo que me enseñó y su dedicación.

A mi co-orientador, Juan, por el apoyo que me brindó siempre que lo necesité sin importar día ni horario.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda incondicional.

A mis amigos, a quienes me acompañaron durante la carrera y a todas las personas que me apoyaron durante la misma.

A Bruno, por su ayuda con el formato final.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por el apoyo recibido.

A la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos por las muestras brindadas para el desarrollo de este trabajo.

Índice

- Abreviaturas	6
- Introduccion	8
- La enfermedad	8
- Epidemiología de VHC	8
- Transmisión de VHC	8
- Patogénesis de VHC	9
- Tratamiento de VHC	11
- El virus de la hepatitis C	15
- Clasificación	15
- Generalidades	15
- Estructura y organización del genoma	17
- La proteína p7	23
- Generalidades	23
- p7 como blanco para nuevos tratamientos	24
- La región hipervariable 1	26
- Generalidades	26
- Variabilidad de la región	26
- HVR1 y la enfermedad	28
- HVR1 y cuasiespecies	29
- La proteína NS4A	30
- Generalidades y funciones	30
- Ciclo de vida viral	34

- Variabilidad genética de VHC	36
- Genotipos	37
- Distribución geográfica de cada genotipo	38
- Recombinación	40
- Coinfección VHC-VIH	43
- Justificación	45
- Objetivos	46
- Objetivo general	46
- Objetivos específicos	46
- Materiales y métodos	47
- Muestras estudiadas	47
- Extracción del ARN viral	47
- Transcripción reversa (RT)	47
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
- Visualización de los productos de PCR	51
- Purificación de los productos de PCR	51
- Secuenciación de los productos de PCR	51
- Análisis de las secuencias obtenidas	57
- Árboles filogenéticos	57
- Análisis de eventos de recombinación	58
- Resultados	60
- Amplificación y secuenciación de genomas completos de las muestras 406 y 409	60
- Genotipificación de las muestras 406 y 409 mediante el	

análisis filogenético de las regiones 5'NCR y NS5B	62
- Estudio de eventos de recombinación en VHC en las muestras 406 y 409	69
- Análisis de la variabilidad genética de las regiones p7 y NS4A en las muestras 406 y 409	75
- Análisis de firmas particulares en secuencias de la región hipervariable 1 de la proteína E2	78
- Discusión	81
- Genotipificación de las muestras 406 y 409 mediante el análisis filogenético de las regiones 5'NCR y NS5B	81
- Estudio de eventos de recombinación en VHC en las muestras 406 y 409	82
- Análisis de la variabilidad genética de las regiones p7 y NS4A en las muestras 406 y 409	84
- Análisis de firmas particulares en secuencias en la región hipervariable 1 de la proteína E2	85
- Conclusiones	87
- Bibliografía	88

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico copia
AIC	Criterio informativo de Akaike
ARF	Marco de lectura alternativo
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
HVR1	Región hipervariable 1
HVR2	Región hipervariable 2
igVR	Región variable intergénica
INF	Interferón
INF- α -Peg	Interferón α pegilado
IRES	Sitio interno de unión al ribosoma
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
M	Molar
mM	Milimolar
min	Minutos
NCR	Región no codificante
nm	Nanómetros

nt	Nucleótidos
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RBV	Ribavirina
RdRp	ARN polimerasa ARN dependiente
RT	Transcripción reversa
RVS	Respuesta virológica sostenida
U	Unidades
UDI	Usuarios de drogas inyectables
μl	Microlitros
μM	Micromolar
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana

Introducción

La Enfermedad

Epidemiología de VHC

El virus de la Hepatitis C (VHC) es considerado el principal agente causante de Hepatitis esporádicas no A no B y de Hepatitis post-transfusionales parenteralmente adquiridas en todo el mundo (Kuo et al., 1989).

En 1999 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó una prevalencia mundial del 3% de personas infectadas con el virus, afectando entonces más de 170 millones de personas (Sy y Jamal, 2006). En el 80% de los casos el virus genera una infección crónica, que puede desencadenar cirrosis (20%) y hepatocarcinoma (1-4%) (Rosen y Gretch, 1999).

La prevalencia estimada varía según la región geográfica siendo del 1% para Europa, del 2,2% para el sudeste asiático, del 5,3% para África y del 1,7% para América, existiendo variaciones notorias entre los diferentes países de estas regiones (Sy y Jamal, 2006). En el Uruguay no existen datos sobre la prevalencia de la infección por VHC en la población general. Los datos estimados por tamizaje en Bancos de Sangre muestran una seroprevalencia menor a 0,3% (Servicio Nacional de Sangre, Montevideo, Uruguay, 2005).

Transmisión de VHC

Las vías de transmisión más frecuentes son las transfusiones de sangre, el uso de drogas intravenosas (al compartir jeringas), exposición a sangre por profesionales de la salud y en menor medida por vía materna y contacto sexual que está en discusión.

Las transfusiones de sangre así como de otros hemoderivados han sido históricamente la mayor causa de transmisión del VHC. Esta vía ha disminuido mucho en los países desarrollados debido principalmente a los grandes avances realizados a nivel de las metodologías de tamizaje. Sin embargo la incidencia de las hepatitis post-transfusionales sigue siendo alta en otras zonas del mundo. (Sy y Jamal, 2006).

La transmisión de VHC está asociada también al uso de drogas intravenosas, drogas percutáneas y al hábito de compartir jeringas. El Hepatitis C European Network for Co-Operative Research (HENCORE) ha reportado la prevalencia de VHC en el 80% de los drogadictos intravenosos (Touzet et al., 2000). Esta transmisión ha crecido rápidamente, con cerca del 80% de los individuos infectados con VHC luego de dos años de inyectarse las drogas (Thomas et al., 1995).

Otro grupo de riesgo son los profesionales de la salud expuestos a sangre como cirujanos, dentistas, patólogos, técnicos laboratoristas, etc. Aproximadamente el 10% de los accidentes con punción de aguja infectada resultan en la transmisión del virus (Mitsui et al., 1992).

En lo que respecta a la vía materna ocurre en menos del 5% de madres infectadas (Thomas et al., 1998). El rol del contacto sexual en la transmisión de VHC está actualmente en discusión, algunos estudios sugieren que la transmisión sexual existe, y puede confirmarse mediante la comparación de la variabilidad de la región HVR1 del VHC (Lai et al., 2004), aunque las últimas evidencias sugieren que es poco frecuente (Sy y Jamal, 2006).

Patogénesis de VHC

VHC infecta preferentemente células hepáticas, pero a pesar de ser éste el sitio principal de replicación viral, existen evidencias de reservorios

extra-hepáticos dentro de los cuales se encuentran los linfocitos, células epiteliales del intestino y sistema nervioso central.

A veces, la hepatitis C aguda evoluciona a la cronicidad, mientras que en otros casos la hepatitis C crónica puede aparecer de forma independiente. Por lo general la hepatitis C crónica es más complicada, pero los pacientes que la sufren pueden experimentar diversos grados de severidad.

La hepatitis C aguda puede comenzar de forma gradual o instantánea, pero tiene un curso limitado, rara vez dura más de uno o dos meses y puede durar un máximo de seis meses. El daño celular hepático en el caso de la hepatitis C aguda es muy pequeño y rara vez causa daños que pongan en riesgo la vida.

La forma crónica de hepatitis persiste por períodos prolongados de tiempo. La hepatitis C crónica se clasifica, en base a su severidad, como hepatitis crónica persistente, que suele ser leve y no progresiva o lentamente progresiva, causando un daño limitado en el hígado y la hepatitis crónica activa, que implica gran daño hepático y de células más allá del tracto portal.

La historia natural de la hepatitis C sigue siendo un tema controvertido debido a la falta de esclarecimiento de los pronósticos a largo plazo. Aunque es ampliamente aceptado que aproximadamente el 80% de las personas que se infectan no eliminan el virus y progresan a la infección crónica, la incertidumbre en el pronóstico ha llevado a puntos de vista divergentes. Algunas personas infectadas se recuperan completamente; otros permanecen con viremia de VHC sin evidencia bioquímica de daño hepático; algunos parecen tener una forma estática de la hepatitis crónica caracterizada por niveles persistentemente elevados de aminotransferasas sin síntomas manifiestos o avance la enfermedad; algunos pacientes progresan en un período difícil de definir a fibrosis histológica y cirrosis; otros tienen cirrosis estable a largo plazo

identificada sólo a través de la biopsia de hígado; algunos desarrollan cirrosis progresiva que culmina en insuficiencia hepática; y, por último, algunos desarrollan carcinoma hepatocelular. Las incertidumbres se encuentran en las frecuencias relativas y las tasas de desarrollo de estas diversas secuelas (Bostan y Mahmood, 2010).

Algunos de los factores que pueden aumentar la severidad y/o disminuir el tiempo de progresión de la enfermedad son un alto nivel de viremia, la infección con el genotipo 1 (más específicamente el 1b), la transfusión como vía de transmisión, deficiencias en el sistema inmune, el exceso de alcohol, coinfección con otros virus como el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la Inmunodeficiencia Adquirida Humana (VIH), el grado de variabilidad genética viral, la edad superior a los 40 años y el sexo masculino (Bostan y Mahmood, 2010)

Del 80 % de las personas infectadas que progresan a la cronicidad, el 20% llegan a padecer cirrosis y hasta un 5% pueden sufrir hepatocarcinoma celular (Mindikoglu et al., 2009).

Tratamiento de VHC

El hecho de que la infección crónica con VHC puede llegar a causar cirrosis y hepatocarcinoma, crea la necesidad de desarrollar fármacos que erradiquen eficazmente la infección. Actualmente la terapia consiste en Interferón α pegilado (INF- α -peg) y Ribavirina (RBV).

La Ribavirina como agente antiviral

Dado que los virus de ARN viven en el borde de la variabilidad máxima, un aumento en la tasa de mutación es probable que fuerce al virus más allá de la frecuencia de mutación tolerable llevándolo a una “catástrofe de error”. Un mutágeno como la RBV, la cual es un antiviral análogo de

nucleósido y es mutagénico para varios virus ARN, se incorpora en el genoma viral causando mutagénesis letal y una subsiguiente disminución en la infectividad específica (Vignuzzi et al., 2005).

En el caso de VHC la RBV ejerce un efecto antiviral directo tanto por medio de la mutagénesis como a nivel de la replicación del ARN viral. Se ha demostrado que los moldes de ARN que contienen RBV son poco favorecidos a la hora de su replicación y pueden detener el proceso de replicación (Vo et al., 2003).

Tratamiento con INF- α -peg

El tratamiento con INF- α -peg reduce efectivamente la carga viral, pero la completa erradicación del virus se logra únicamente en menos del 20% de los pacientes tratados (Poynard et al., 1998). El INF- α -peg produce simultáneamente una activación de la respuesta inmunitaria del hospedador y la inhibición de la multiplicación del virus.

Combinación INF- α -peg y RBV

La combinación del INF- α -peg con RBV incrementa la frecuencia de erradicación del virus en pacientes que inicialmente respondieron al INF pero tiene un efecto limitado en aquellos pacientes que no respondieron al mismo (Hu et al., 2001). Los diferentes genotipos y subtipos difieren en su respuesta al tratamiento con INF- α -peg o INF- α -peg/RBV. La tasa de desaparición de la enfermedad es mayor en genotipos 2 o 3 que en aquellos pacientes infectados con genotipo 1 de VHC (Zeuzem et al., 2009).

El tratamiento anti-VHC en los pacientes con cirrosis es menos efectivo que en pacientes no cirróticos. La erradicación viral reduce el riesgo de complicaciones hepáticas y aumenta supervivencia en pacientes no

cirróticos. Sobre la base de datos de eficacia y tolerabilidad, la terapia tiene un efecto significativo en los pacientes con cirrosis compensada, mientras que los pacientes descompensados necesitan ponderar los riesgos versus los beneficios del tratamiento (Vezali et al., 2010).

Las guías actuales recomiendan que los pacientes con genotipos 2 y 3, se traten con INF- α -peg y dosis bajas de RBV durante 24 semanas, lo que resulta en una respuesta virológica sostenida de aproximadamente el 80%. Teniendo en cuenta estas altas tasas de respuesta, varios ensayos recientes han evaluado si el tratamiento más corto (12-16 semanas) podría ser rentable en estos pacientes (Petta y Caxì, 2011). El genotipo 4 ha sido considerado como difícil de tratar basado en la baja respuesta virológica sostenida (RVS), datos obtenidos basados en regimenes convencionales con INF- α -peg. El tratamiento con INF- α -peg más RBV aumenta más del 60% la tasa de respuesta virológica sostenida para este genotipo (Kamal, 2011).

El genotipo 1 es tratado con INF- α -peg más RBV obteniendo baja respuesta virológica sostenida, por lo tanto la detección temprana de pacientes que no responden al tratamiento de VHC limita la exposición innecesaria a los tratamientos y sus efectos secundarios. Un algoritmo que combina anticuerpos basales contra la NS4a y una PCR cuantitativa durante el tratamiento identifica pacientes no respondedores a una combinación de INF- α -peg y RBV después de 1 semana de tratamiento. La decisión de interrumpir la terapia a pacientes crónicos con genotipo 1 tratados con INF- α -peg y RBV puede ser hecha con confianza después de 4 semanas de tratamiento basada en la ausencia de anticuerpos basales contra la NS4a y una cantidad de ARN viral por encima de 100.000 UI / ml (Orlent et al., 2010).

Nuevos blancos

Se ha avanzado mucho sobre los nuevos blancos para el tratamiento de la enfermedad, ya que se ha descrito la emergencia de mutantes resistentes a la RBV en pacientes sometidos a esta terapia. En todos los casos la mutación consiste en un único cambio en la posición 415 de la polimerasa viral de Fenilalanina a Tirosina, lo que estaría confirmando el efecto de la RBV a nivel de la replicación viral (Young et al., 2003). Otra de las razones es la baja respuesta (mayoritariamente por pacientes con VHC de genotipo 1) al tratamiento con INF- α -peg tanto como a la terapia combinada INF- α -peg/RBV.

Las nuevas drogas antivirales están dirigidas a la inhibición de proteínas virales fundamentales para la replicación y propagación de VHC, habiéndose reportado grandes avances a nivel de los inhibidores de proteasas (Nelson, 2011).

El Virus de la Hepatitis C

Clasificación

VHC es miembro del género Hepacivirus de la familia Flaviviridae. La estructura y organización del VHC se asemeja de forma más cercana a las de los Flavivirus y los Pestivirus pero a su vez difiere de la mayoría de los miembros de esta familia, los cuales son transmitidos por vectores, en algunos detalles de su organización genómica y en la composición nucleotídica de sus genomas, es por eso que pertenece a un género separado dentro de la familia (Cuthbert, 1994; Takamizawa et al., 1991), (ver figura 1).

Generalidades

El VHC fue el primer virus descubierto por técnicas moleculares. Aunque la Hepatitis C, como enfermedad, fue reconocida por primera vez en 1975 (Feistone et al., 1975), todos los medios disponibles para identificar el agente causante de la enfermedad fallaron hasta 1989, cuando el grupo de Choo y colaboradores clonaron y secuenciaron un fragmento del genoma de VHC (Choo et al., 1989).

Es un virus envuelto, cuyo genoma está constituido por una única cadena de ARN de polaridad positiva (Bostan y Mahmood, 2010). Las partículas virales son esféricas y tienen un diámetro de entre 50 y 65 nm con finas proyecciones en forma de punta de 6 nm de longitud. También puede circular como partículas desnudas con un tamaño de entre 30 y 40 nm. Estas partículas corresponden al core y presentan una morfología icosaédrica con simetría hexagonal (Kaito et al., 1994; Kaito et al., 2006).

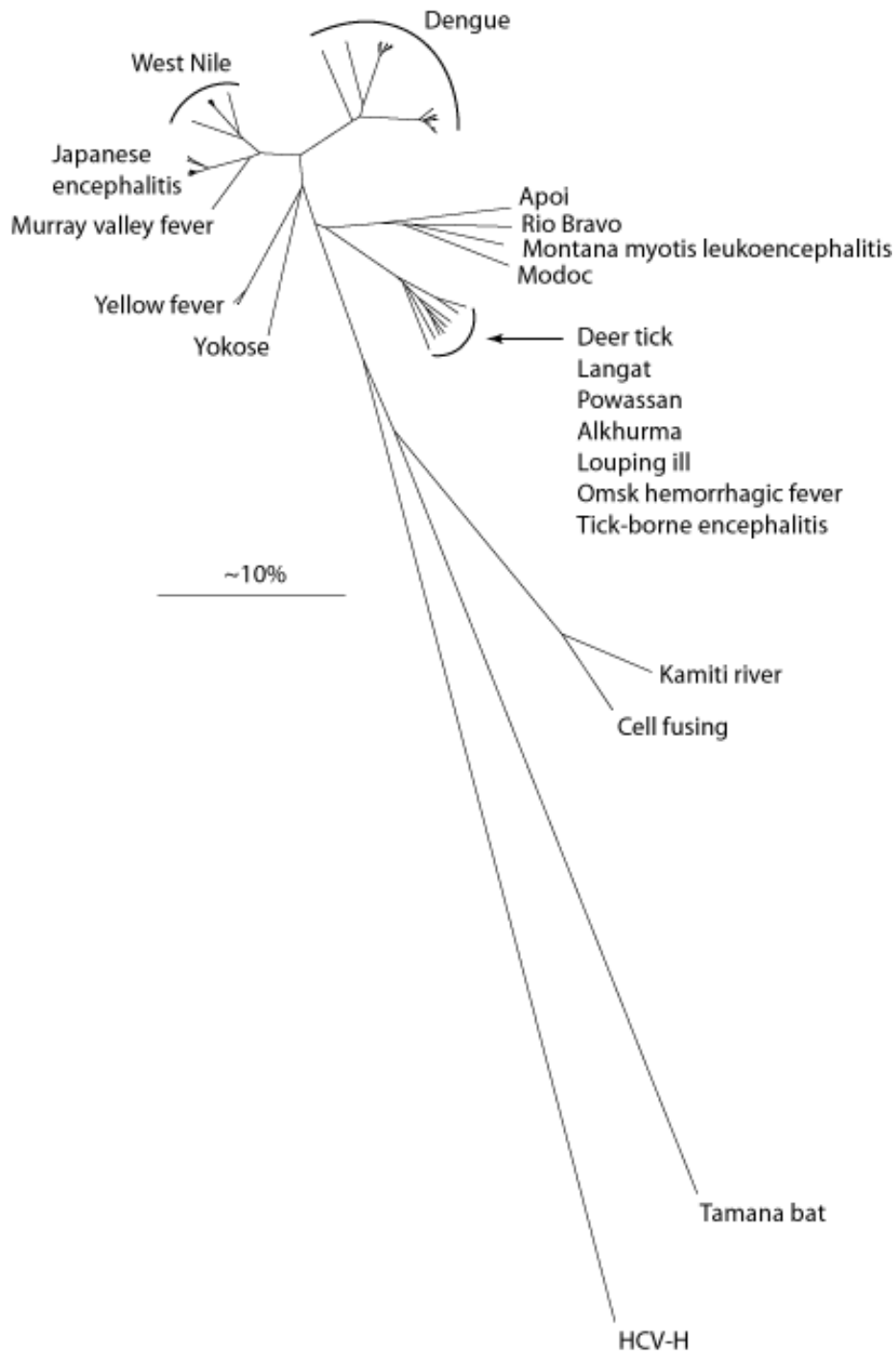


Figura 1. Árbol Neighbor-joining de la familia Flaviviridae.

Árbol filogenético realizado a partir del alineamiento con secuencias de todos los miembros de la familia Flaviviridae. Se observa la distancia genética de VHC con el resto de los miembros de la familia. (Árbol extraído de la base de datos “Los Alamos National Laboratory (LANL)”, www.hcv.lanl.gov).

Estructura y organización del genoma

El genoma del VHC está constituido por una única molécula de ARN de aproximadamente 9,6 kb con polaridad positiva y un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica una poliproteína de unos 3.000 aminoácidos aproximadamente variando según el aislado y el genotipo. El ORF está flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR) en los extremos 5' y 3' respectivamente. La poliproteína precursora es co-traduccionalmente y post-traduccionalmente procesada por proteasas celulares y virales a nivel de la membrana del retículo endoplásmico para producir 10 proteínas maduras, divididas desde el extremo 5' al 3' en 3 estructurales, core, E1 y E2, una proteína, p7, que separa las proteínas estructurales de las no estructurales y 6 proteínas no estructurales (NS), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Lindenbach y Rice, 2001) (ver Figura 2).

Si bien VHC tiene un único marco abierto de lectura, se ha reportado un segundo producto de traducción generado por un corrimiento en el marco a nivel del gen core (+ 1), el cual produce una nueva proteína denominada F (Walewski et al., 2001).

Regiones no Codificantes (NCR)

El ORF está flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR) en los extremos 5' y 3' de 341 y aproximadamente 230 nucleótidos respectivamente. Ambas regiones tienen estructuras de ARN altamente conservadas esenciales para la traducción de la poliproteína y la replicación del genoma.

El extremo 5' NCR se compone de cuatro dominios altamente estructurados y contiene el sitio interno de entrada ribosomal (IRES) que se une a la subunidad 40S ribosomal e inicia la traducción de la poliproteína de manera cap-independiente.

La región 3'NCR consiste en estables estructuras tallo-bucle y un tracto interno poli (U) / poliprimidina (Bostan y Mahmood, 2010)

Proteínas Estructurales

La proteína del core se encuentra localizada en el extremo aminoterminal de la poliproteína y forma un complejo ribonucleoproteico con el genoma viral, por lo que es considerada la proteína de la cápside (Hijikata et al., 1991). Aparte de su aparente rol en el ensamblaje viral se ha descrito su interacción con numerosas proteínas celulares, afectando de esta manera las funciones de la célula huésped como la transcripción, el metabolismo lipídico, apoptosis y otras vías de señalización celular, jugando un rol clave en la patogénesis (Tellinghuisen y Rice, 2002)

E1 y E2 son glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular del virus (Kaito et al., 2006). Ambas son proteínas transmembrana y se encuentran asociadas de forma no covalente formando heterodímeros a nivel de la envoltura viral (Miyamura y Matsuura, 1993). Debido a que la función principal de estas proteínas es la interacción con el receptor celular y la fusión de la membrana endosomal luego de la endocitosis, dichas glicoproteínas son un buen blanco para el desarrollo de moléculas antivirales que bloqueen la entrada del virus. Dentro de la proteína E2, se encuentran regiones muy variables de suma importancia tanto para la infectividad como para la integridad estructural y la función del heterodímero glicoproteína E2 de VHC, llamadas región hipervariable 1 (HVR1), región hipervariable 2 (HVR2) y la región variable intergenotípica (IgVR) (Mc Caffrey et al., 2011).

Proteínas No Estructurales

En la unión entre la región estructural y la no estructural se localiza una región que codifica para una proteína de 63 aa denominada p7. Esta es una proteína integral de membrana, la cual se oligomeriza para formar una canal catiónico y parece ser de importancia en el ensamblado del virus y en consecuencia en la infectividad (Cook y Opella, 2010).

Luego hacia el extremo 3' encontramos la región que codifica para las restantes 6 proteínas no estructurales: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

La proteína NS2 es una proteína hidrofóbica transmembrana. Los dos tercios del extremo carboxi-terminal de la NS2 contienen un dominio catalítico de una cisteín proteasa. El clivaje NS2-NS3 requiere de estos residuos así como de la expresión downstream del dominio serín proteasa de la NS3. Sin embargo se ha demostrado que la actividad proteasa NS3-4A es dispensable para el procesamiento de la NS2-3. El requerimiento de la NS3 probablemente debe estar relacionado con el correcto plegado de esta proteína ya que el clivado de la NS2-3 es potenciado por la presencia del ion Zn^{2+} el cual tiene un importante rol estructural en estabilizar el plegado de la NS3 (Lindenbach y Rice, 2005).

La proteína NS3 tiene aproximadamente 70 KDa y es una proteína multifuncional. Esta proteína tiene un dominio serín proteasa en su extremo N-terminal y un dominio ARN helicasa/NTPasa en su extremo C-terminal indispensable para la replicación viral (Lindenbach y Rice, 2005).

La región NS4 de la poliproteína comprende dos proteínas denominadas NS4A y NS4B. La proteína NS4A es la proteína no estructural más pequeña, conformada por 54 aa. Esta proteína es la encargada del anclaje de la NS3 a la membrana intracelular y es requerida como cofactor para la actividad serín proteasa de la misma. La proteína NS3 complejada con la NS4A es una proteasa encargada del clivaje entre las proteínas no estructurales. La NS4A es importante también en la hiperfosforilación de la NS5A (Lindenbach y Rice, 2005; Lindenbach et al., 2007; Beran et al., 2007). La NS4B es una proteína altamente hidrofóbica lo que sugiere que estaría implicada en el anclaje del complejo de replicación al retículo endoplasmático. (Lindenbach y Rice, 2005)

La región NS5 de la poliproteína también se encuentra conformada por dos proteínas la NS5A y la NS5B las cuales están asociadas al complejo de replicación.

La proteína NS5A está involucrada, junto a las demás proteínas no estructurales, en la formación del complejo de replicación viral. La formación de este complejo multi-proteico requiere interacciones específicas entre los componentes individuales. En este aspecto, se ha comprobado, tanto por experimentos *in vitro* como en células transfectadas, que la NS5A se une a la NS5B. (Lindenbach y Rice, 2005). La NS5B es una ARN polimerasa ARN dependiente encargada de la síntesis de ARN de cadena (-) utilizando el genoma viral como molde y la subsecuente síntesis de ARN de cadena (+) a partir de este como molde.

Marco alternativo de lectura (Proteína F)

VHC tiene un marco de lectura alternativo (ARF) que se superpone con el gen de la proteína del core. El marco de lectura superpuesto distingue VHC de todos sus parientes virales conocidos, con la posible excepción del virus B GB (GBV-B). El ARF se expresa durante infecciones naturales por VHC y estimula las respuestas inmunitarias específicas. Al igual que varios genes esenciales en otros virus (por ejemplo, la polimerasa del virus de inmunodeficiencia humana), el ARF carece de un codón de inicio AUG dentro del marco, lo que sugiere que su expresión implica eventos inusuales a nivel de la traducción. Los estudios “*in vitro*” indican que el cambio del marco por los ribosomas puede ser uno de varios procesos que pueden llevar a la traducción de la ARF. El cambio de marco produce proteínas quiméricas que tienen segmentos codificados en el gen del core unidos covalentemente a los aminoácidos codificados en el ARF. Aún no se ha establecido una nomenclatura coherente para los productos de la proteína ARF. Las funciones de las

proteínas del marco alternativo de lectura (ARFPs) en el ciclo de vida del VHC no se conocen aún. Hay una posibilidad significativa de que las ARFPs puedan ser responsables de algunos de los efectos atribuidos a la proteína del core, dado que la mayoría de los estudios encaminados a definir la función de la proteína del core han empleado materiales que pueden contener una combinación de la proteína núcleo y ARFPs. Los efectos observados de la proteína del núcleo incluyen la inducción de cáncer de hígado, la transformación de las células, y las alteraciones de la respuesta inmune. Se considera también la posible utilidad de ARFPs en las vacunas (Branch et al., 2005; Cristina et al., 2005).

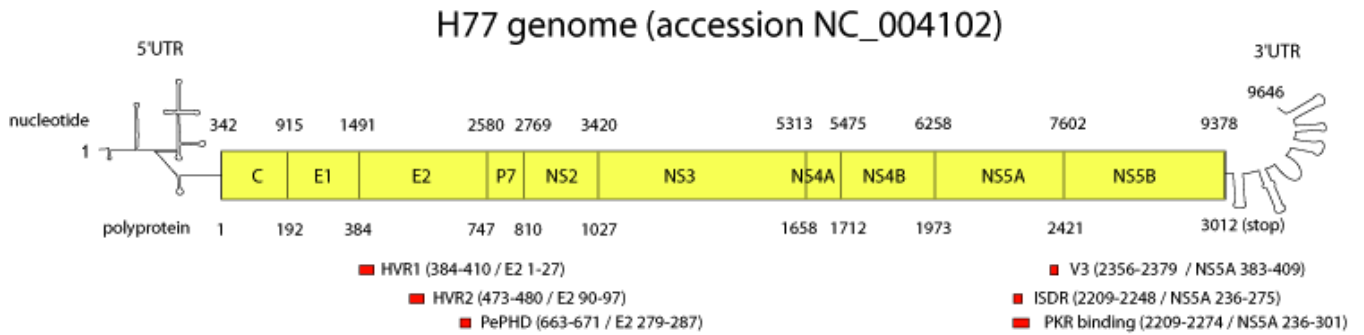


Figura 2. Genoma del Virus de la Hepatitis C.

Esquema del genoma completo de VHC. En amarillo se muestra el marco abierto de lectura con sus respectivas proteínas, estructurales y no estructurales. En ambos extremos se muestran las regiones no codificantes con sus respectivas estructuras secundarias. En la parte superior se indican las posiciones nucleotídicas y abajo las posiciones aminoacídicas de la poliproteína. Tomado de la base de datos LANL, www.hcv.lanl.gov.

La proteína p7

Generalidades

p7 es una pequeña proteína de membrana de 63 aminoácidos de longitud, que forma un canal iónico, más precisamente catiónico, en las bicapas lipídicas. La estructura es principalmente alfa helicoidal, tiene siete secciones identificables de las cuales cuatro son helicoidales y dos segmentos transmembrana con un corto loop interhelicoidal separándolo (Wozniak et al., 2010; Cook y Opella, 2010; Montserret et al., 2010). Pertenece a la familia de las viroporinas, que son una familia de proteínas virales capaces de formar poros en las membranas de las células infectadas. Estas proteínas, de pequeño tamaño (50-120 aminoácidos), son muy hidrofóbicas y tienden a interaccionar consigo mismas para dar lugar a la formación de poros hidrofílicos (con diferentes grados de oligomerización) en las membranas celulares. Aunque generalmente no son esenciales para la replicación de los virus, juegan un papel importante en los procesos de maduración y gemación de los viriones en las etapas finales de la infección.

En células infectadas, como consecuencia de la expresión de las viroporinas, se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática a iones y moléculas de bajo peso molecular (<1KDa). Varios laboratorios ya han demostrado que las viroporinas Vpu (del virus de la inmunodeficiencia humana), M2 (virus de la gripe tipo A), NB (virus de la gripe tipo B), E (virus del SARS), p7 (virus de la hepatitis C) y 6K (alfavirus) forman canales iónicos selectivos a cationes en membranas lipídicas artificiales (Wozniak et al., 2010; Hyser et al., 2010).

Esta actividad de canal iónico junto a la proteína no estructural NS2, son esenciales para la infectividad del virus, y son requeridas para el ensamblado y liberación de los nuevos virus pero cómo éstas son capaces de influir en estos procesos no está claro aún su rol. Sin

embargo, la presencia de p7 orienta a la proteína NS2 a sitios estrechamente asociados a complejos de replicación viral.

Por otro lado, estudios muestran que existe interacción física entre NS2 y NS5A y esta interacción está mediada tanto por p7 como también por la serina 168 dentro de la proteína NS2 misma (Tedbury et al., 2010).

p7 como blanco para nuevos tratamientos

La terapia actual estándar de atención para la infección por el VHC, que comprende una combinación de INF- α -peg y RBV, no es eficaz en más del 50% de los pacientes, y se asocia con mal cumplimiento del paciente y alto costo. El reciente desarrollo de un sistema de cultivo infeccioso para el VHC ha permitido a los investigadores recuperar el ciclo de vida completo del virus en un intento por desarrollar nuevos medicamentos específicos contra el virus. Compuestos específicos para blancos clásicos del virus, tales como la proteasa y la polimerasa viral, han llegado a la fase II / III de ensayos clínicos, y los alentadores resultados han indicado que estos compuestos específicos contra el virus pueden complementar y sustituir el tratamiento con INF- α -peg y RBV. Sin embargo, la naturaleza variable del VHC (cuasiespecies y la variación de genotipo) y el número limitado de compuestos desarrollados hasta el momento han llevado a que la investigación apunte a expandir el repertorio de objetivos disponibles, por ejemplo el proceso de ensamblaje viral como blanco terapéutico. El canal de iones viral p7 es fundamental para la liberación de viriones de VHC, y la sensibilidad de este canal a inhibidores hace a p7 una prometedora diana para nuevos tratamientos. Los inhibidores de p7, aunque se encuentran en una fase temprana de desarrollo, bloquean la producción de viriones en cultivos con eficacia. Datos clínicos limitados y controvertidos debido a los efectos antivirales variables observados, sugieren que los inhibidores de p7 podrían representar

adiciones eficaces para las terapias de combinación con otras drogas virus específicas (Griffin, 2010).

La región hipervariable 1

Generalidades

La región hipervariable 1 (HVR1) del VHC es una secuencia de 27 aminoácidos localizada en el extremo N terminal de la glicoproteína E2 (Alfonso et al., 2004; Vieyres et al., 2010). HVR1 muestra marcada variabilidad de secuencia, posiblemente correspondiente a la aparición de mutantes de escape inmune. Este escape inmunológico es aceptado como el mecanismo responsable para la persistencia del virus en el hospedero.

Variabilidad de la región

Como se mencionó anteriormente el VHC es un virus ARN que replica con una alta tasa de mutación. La variación máxima se limita a esta corta secuencia de la glicoproteína de membrana E2, y se ha designado como la región hipervariable 1. A pesar de la alta variabilidad de esta región, hay una fuerte selección negativa en contra de algunas sustituciones de aminoácidos, ya que en la mayoría de los codones hay selección para el reemplazo conservativo de aminoácidos, que apunta a un papel biológico en el ciclo de vida del virus (Alfonso et al., 2004).

Desde un marco de análisis fenotípico, HVR1 ha sido considerada como estructuralmente flexible y variable antigénicamente. La variación se distribuye de manera desigual dentro de la región, lo que resulta en algunas posiciones invariables, con las demás muy variables pero limitadas a discretas sustituciones de aminoácidos. Este fenómeno indica que la selección positiva está impulsando los mecanismos de sustitución en la mayoría de las posiciones y que una presión negativa también se ejerce en contra de las sustituciones en otras posiciones.

La evolución de la región HVR1 está principalmente guiada por la selección de sustituciones no sinónimas. Puede proceder de un patrón de sustitución puntual reflejando la fijación de mutaciones al azar o del

cambio de una variante de población de cuasiespecies a otra (Alfonso et al., 2004).

Se ha demostrado que, independientemente de la complejidad o la diversidad de las poblaciones virales antes del tratamiento (terapia con INF), éstas evolucionan hacia una diversificación genética después de una presión selectiva. Una vez que el medio ambiente se convierte en estable (luego del tratamiento con INF), las poblaciones tienden a la homogeneidad. Se podría deducir que, la evolución de la HVR1 de la proteína E2 más probable, está dirigida por la selección de subpoblaciones claramente diferentes (modificación del equilibrio de cuasiespecies), en lugar de un continuo mecanismo relacionado con la acumulación sucesiva de mutaciones puntuales (Alfonso et al., 2004; Xiu et al., 2010).

VHC circula dentro de un huésped infectado como una población heterogénea que contiene virus genéticamente variantes distintas, pero estrechamente relacionados, conocidos como cuasiespecies. La naturaleza de cuasiespecies del VHC puede conferir importantes propiedades biológicas al virus, incluyendo escape inmunológico, persistencia viral y resistencia a los agentes antivirales. La diversidad de cuasiespecies y su relación con la progresión de la enfermedad hepática y el tratamiento con interferón ha sido estudiada en gran parte por la conformación del polimorfismo de cadena sencilla o la secuenciación de HVR1. Sin embargo, debido a la gran variabilidad antigénica de HVR1, la respuesta humoral contra HVR1 no ha podido ser fácilmente caracterizada en la infección crónica por VHC. Las primeras observaciones han sugerido que el HVR1 es un dominio de neutralización crítica. Se ha demostrado que los anticuerpos contra HVR1 en suero humano bloquean la adhesión del virus y protegen a los chimpancés de la infección por el VHC. En las infecciones virales, la aparición de anticuerpos neutralizantes es generalmente un pronóstico marcador que

coincide con el inicio de la recuperación de la enfermedad y la eliminación del virus de la circulación (Xiu et al., 2010).

HVR1 y la enfermedad

Aunque una respuesta temprana anti-HVR1 está asociada con una auto-limitada infección aguda, los anticuerpos anti-HVR1 son con frecuencia producidos en la mayoría de los individuos infectados crónicamente y parecen coexistir con las variantes de HVR1. Se ha reportado que los anticuerpos anti-HVR1 en los individuos infectados por el VHC podrían reaccionar con más de una variante de HVR1 (Xiu et al., 2010). Xiu y colaboradores sugieren que la reactividad cruzada de anticuerpos contra HVR1 en hepatitis moderada y cirrosis hepática es más amplia que en la hepatitis crónica leve e indican que la amplia reactividad cruzada de anticuerpos anti-HVR1 se asocia con la enfermedad hepática avanzada, y es la reacción inmune la que responde a la heterogeneidad de las cuasiespecies del VHC en el momento en determinados pacientes crónicos.

Mondelli y colaboradores (Mondelli et al., 1999) encontraron que la heterogeneidad de los anticuerpos de reacción cruzada fue significativamente mayor en los pacientes con hepatitis crónica que en aquellos con hepatitis aguda. Esto sugiere que es la reactividad cruzada en líneas generales de los anticuerpos contra HVR1 que se asocian con la progresión de la enfermedad hepática y puede ser un nuevo marcador en el estudio pronóstico de la infección crónica por el VHC, pero no la aparición de anticuerpos anti-HVR1.

La amplia reactividad cruzada de anticuerpos anti-HVR1 naturales generados en pacientes con el VHC no puede neutralizar el virus, lo que resulta en una infección persistente en pacientes con hepatitis crónica. La reactividad cruzada por lo tanto, en lugar de la presencia de

anticuerpos anti-HVR1 en el suero de VHC, se asocia con la progresión de la enfermedad hepática (Xiu et al., 2010; Mondelli et al., 1999).

Es importante adquirir anticuerpos anti-HVR1 con amplia reactividad cruzada para el desarrollo de vacunas contra el VHC. De todas formas, una reacción cruzada de anticuerpos anti-HVR1 en los pacientes crónicos no pudo despejar la infección viral. Recientemente, el mecanismo de interferencia de anticuerpos neutralizantes fue creado usando dos diferentes anticuerpos contra la E1. Esto significa que la presencia de una gran cantidad de anticuerpos neutralizantes interfieren con la actividad neutralizante al VHC (Xiu et al., 2010).

La infectividad del VHC resultante del cultivo de células es suprimida por las deleciones tanto de la región hipervariable 2 (HVR2) así como también de la región variable intergenotípica (igVR), ambas de la glicoproteína E2, mientras que la supresión de HVR1 reduce la infectividad de 5-10 veces. Sin embargo, ninguna deleción tuvo efecto en la replicación viral. Estos resultados sugieren que HVR2 e igVR, pero no HVR1, son esenciales para la integridad estructural y la función del heterodímero glicoproteína E2 de VHC (McCaffrey et al., 2011).

HVR1 y cuasiespecies

La HVR1 del VHC tiene una distribución de cuasiespecies en individuos infectados. Su complejidad genética es significativamente mayor en los receptores de transfusiones que en usuarios de drogas por vía intravenosa, lo que sugiere que el tamaño del inóculo inicial afecta a la aparición más tarde y desarrollo de cuasiespecies virales. La complejidad genética de HVR1, junto con la carga viral y el título anti-VHC IgM, son predictores independientes de una respuesta virológica sostenida al IFN alfa en pacientes con hepatitis crónica (Pawlotsky et al., 1998).

La proteína NS4A

Generalidades y funciones

La NS4A es la proteína no estructural más pequeña con 54 aminoácidos de longitud. A pesar de su tamaño, tiene múltiples funciones en el ciclo de vida viral. La región hidrofóbica N-terminal de la NS4A es responsable de anclar el complejo NS3-4A al retículo endoplasmático y a la membrana externa mitocondrial. La región central de la NS4A sirve como cofactor de la serín proteasa NS3-4A, la cual es responsable del clivaje en las uniones NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A, NS5A/5B. Además de su papel en el procesamiento de la poliproteína viral, la serín proteasa NS3-4A puede regular, disminuyendo, la respuesta innata antiviral del hospedero escindiendo las proteínas celulares TRIF e IPS-1 (también conocidas como MAVS, VISA, o Cardif) (Lindenbach et al., 2007). La NS4A también aumenta la actividad ARN helicasa de la NS3, posiblemente a través de interacciones entre los dominios helicasa y serín proteasa. Aunque no está claro si la NS4A se encuentra fuera del complejo NS3-4A en células infectadas por el VHC, la sobreexpresión de NS4A libre inhibe la traducción y puede conducir a daño mitocondrial. Por otra parte, la hiperfosforilación de NS5A depende de la expresión de NS4A, y mutaciones en NS3, NS4A, o NS4B pueden alterar la hiperfosforilación de NS5A (Lindenbach et al., 2007).

Mientras que las actividades de anclaje a las membranas y cofactor para la serín proteasa están codificadas dentro de los primeros 34 aminoácidos de la NS4A, la región C-terminal tiene un rol importante en la replicación del ARN del VHC (Lindenbach et al., 2007). Un aspecto importante en el modelo estructural de la región C-terminal es que varios residuos ácidos deben ser neutralizados para que se pliegue como una alfa hélice, ya sea alterando el pH o mediante la interacción con otra proteína con superficie cargada positivamente. La identidad de esta unión

permanece aún desconocida, aunque vale destacar que NS5A contiene varias superficies básicas, incluyendo un presunto surco de unión a ARN, así como una región propuesta para participar en la mediación de la interacción con NS4A. Lindenbach y colaboradores (Lindenbach et al., 2007) encontraron que varias mutaciones en la región C-terminal de NS4A reducen la aptitud de replicación del VHC. Los fenotipos más graves fueron exhibidos por Y1702A, R1703A, R1703D y F1705A, cada uno de los que han eliminado la formación de colonias. Es de destacar que dos de estos sitios, Y1702 y F1705, son invariantes entre numerosas cepas del VHC. Ya que los residuos Gln o Glu se producen con frecuencia en la posición 1703 en otras cepas del VHC, los requisitos de secuencia en esta posición aún no están claros y pueden covariar con otras posiciones dentro del genoma del VHC. Por otra parte, varios residuos invariantes fueron sorprendentemente tolerante de sustituciones, incluyendo E1704A, E1704R, E1709A, E1709R y E17010A y E17010R (Lindenbach et al., 2007). Sobre la base del modelo estructural de Lindenbach y colaboradores (2007), estas mutaciones deberían afectar el umbral de pH para la formación de alfa-hélice. Sin embargo, el gran número de residuos ácidos en esta región puede ser capaz de compensar los cambios en las posiciones individuales.

Se ha demostrado que mutaciones en NS3 pueden conducir a la adaptación del cultivo celular y el aumento de la replicación del ARN del VHC. De hecho, las mutaciones en Q1112, P1115, y A1226 se ha señalado anteriormente en otros replicones adaptados en cultivos celulares, aunque su contribución relativa a la aptitud de replicación no se abordó específicamente. Se encontró que P1115R y R1187L no aumenta la replicación del replicón Con1 de tipo salvaje, mientras que Q1112R y S1369R sólo potenciaron moderadamente la eficiencia de replicación de Con1. Por lo tanto, la capacidad de estas mutaciones para suprimir drásticamente los defectos de replicación de los mutantes NS4A

probablemente refleja su capacidad para compensar un cambio en la conformación NS3-4A y / o la capacidad de interactuar con otra pareja, en lugar de como potenciadores generales de la replicación. Esto sugiere, además, que estos sitios pueden estar directamente implicados en la interacción con NS4A u otro componente de la replicasa (Lindenbach et al., 2007).

Además, parece que la mutación R1703A puede inhibir la replicación por un proceso distinto a la alteración de la hiperfosforilación de NS5A (Lindenbach et al., 2007). La dinámica de la hiperfosforilación de NS5A puede dar lugar a ciclos de alternancia de la replicación del ARN y la infección silenciosa, que puede conferir una ventaja a las infecciones virales persistentes en vivo.

Dado que las mutaciones NS4A que bloquean la hiperfosforilación también bloquean la replicación del ARN y que estos efectos se sienten aliviados por mutaciones supresoras de segundo sitio en NS3, se postula que NS4A probablemente actúa corriente arriba de la caseína quinasa I y que la conformación de NS3-4A mediada por NS4A puede influir en esta interacción NS5A-quinasa. Este modelo está en consonancia con estudios anteriores que muestran que se requiere NS4A para hiperfosforilación NS5A y que la hiperfosforilación de NS5A es bloqueada por el agrupado de sustituciones Ala en el dominio ácido NS4A C-terminal. En conclusión, la región C-terminal ácida de NS4A codifica una o más actividades que son críticas para la hiperfosforilación de NS5A y la replicación del VHC, que los cambios de segundo sitio en NS3 pueden compensar los cambios en esta región, y que el plegamiento alfa helicoidal de esta región depende de las interacciones electrostáticas locales y podría actuar como un interruptor molecular (Lindenbach et al., 2007).

NS3-4A es un complejo enzimático de unión a membrana que exhibe actividades de serín proteasa, ARN helicasa y ATPasa ARN estimulada.

Este complejo es esencial para la replicación del genoma viral y recientemente se ha implicado en el ensamblado de la partícula viral.

El defecto de replicación por la mutación de NS4A F48A fue suprimida en parte por la mutación de NS4B I7F, lo que indica que la interacción genética entre NS4A y NS4B contribuye a la replicación del ARN. Por otra parte, el defecto de ensamblaje del virus por la mutación en NS4A K41A fue suprimida por la mutación en NS3 Q221L, una mutación implicada en la superación de los defectos de ensamblado en otros virus. En conjunto, estos datos revelan interacciones entre NS4A y NS4B que controlan la replicación del genoma, y entre NS3 y NS4A que controlan el ensamblado del virus (Phan et al., 2011).

En flavivirus y virus de la hepatitis C (VHC), el gen NS3 codifica para la N-terminal proteasa (NS3pro) y la helicasa C-terminal (NS3hel). En el VHC, NS4A exhibe un motivo EFDEMEE conservado corriente abajo el cual es requerido para la actividad NS3pro. Shiryaev y colaboradores sugieren que el motivo EFDEMEE es esencial para la regulación de la actividad ATPasa de la NS3hel. Es probable que este motivo interfiera con el sitio de unión a ATP de NS3hel. Es cada vez más evidente las funciones NS4A como cofactor de ambas, proteínasa y helicasa, de VHC (Shiryaev et al., 2010).

Las interacciones NS3-NS4A consisten en una de alta afinidad y otra de baja afinidad, las cuales contribuyen igualmente a la unión global. Al inmovilizar NS3 sola o junto con NS4A se demostró que todos los inhibidores tenían una mayor afinidad por NS3 en presencia de NS4A. NS4A por lo tanto tiene un efecto directo en la unión de los inhibidores de NS3 y no sólo en la catálisis (Geitmann et al., 2011).

Ciclo de vida viral

Unión y entrada a la célula: El primer paso en el ciclo de vida de un virus es la unión de la partícula infecciosa a la célula hospedera y para esto es requerida la interacción entre un receptor de la superficie celular hospedera y una proteína de unión en la superficie de la partícula viral. CD81 fue identificado como receptor de VHC en base a su fuerte interacción con E2 (proteína de unión de VHC), así como con las partículas virales in vitro. Aparte de esta ruta, el VHC puede entrar en la célula por unión a receptores de la lipoproteína de baja densidad LDL. E1 está involucrada en la fusión de membranas. E2 actúa también como una chaperona para E1, la cual en ausencia de E2 forma agregados mal plegados.

Traducción y procesamiento de la poliproteína: Una vez dentro del citoplasma, el ARN genómico se traduce directamente ya que es gran ARNm. La traducción del ARN viral no está mediada por un mecanismo cap-dependiente sino por la iniciación interna de la traducción a través del “Internal Ribosome Entry Site (IRES)”. Dirigida por el IRES, la poliproteína se traduce en el retículo endoplasmático rugoso y se escinde co- y post-traduccionalmente por señalases de célula huésped y dos proteasas virales.

Replicación del ARN: La polimerasa codificada por el gen NS5B (gen de la ARN polimerasa ARN dependiente viral) cataliza la síntesis tanto de la hebra negativa como de la positiva. Secuencias en el extremo 3' se pueden plegar intramolecularmente y formar una horquilla que permite hibridizar y generar un extremo 3' que funciona como cebador y es utilizado para la elongación. Utilizando las altas concentraciones de GTP o ATP, la NS5B puede sintetizar un primer de ARN. Otros factores virales y celulares son necesarios como la helicasa NS3 que elimina

estructuras estables en el molde de ARN y facilita la replicación o la fosfoproteína NS5A que está envuelta en la regulación de la replicación del ARN. Además, un componente celular, PTB, interactúa con las secuencias en el extremo 3'. La Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se une a la secuencia poli (U) en el extremo 3'. Otras proteínas celulares involucradas en la replicación son las llamadas p87 y p130. Proteínas de otros virus también podrían potenciar la replicación al activar la transcripción de genes celulares.

Ensamblaje y liberación del virus: La formación de partículas puede ser iniciada por proteínas del core que interactúan con el genoma de ARN. Dicha interacción, no sólo puede alcanzar un embalaje selectivo del genoma de cadena positiva sino que también parece reprimir la traducción a través del IRES, lo que sugiere un potencial mecanismo para cambiar de traducción/replicación a ensamblado. La nucleocápside viral adquiere su envoltura (E1 y E2) por gemación a través de las membranas del RE y en este caso el virus es exportado a través de la vía secretora constitutiva. El virus transita a través del Golgi y es eliminado al espacio extracelular (Bostan y Mahmood, 2010).

Variabilidad Genética de VHC

VHC tiene una variabilidad de secuencia de aproximadamente 30% entre sus principales genotipos y del 20% en los diferentes subtipos dentro de cada genotipo, cuando comparamos todo el genoma viral. La región 5'NCR es la que contiene el grado de conservación más alto del genoma con un 90% de similitud, sin embargo, la región se compone de dominios altamente conservados entremezclados con dominios variables. En las regiones codificantes del genoma, los cambios ocurren sobre todo en sitios sinónimos (sitios que no cambian el aminoácido codificado).

La región del Core está relativamente bien conservada, con similitud de secuencias de nucleótidos que van desde 81% (máxima diversidad) y el 88% (mínima diversidad) entre los aislamientos de diferentes genotipos.

La región amino-terminal de E2 constituye una región hipervariable. El segmento de 28 aminoácidos de esta región presenta más del 50% de variación en los distintos aislados.

Regiones muy variables son también la hipervariable 2 de E2 al igual que la NS5A, E1 y E2. Por otro lado, regiones conservadas son NS5B y NS3.

Una tasa de mutación de aproximadamente $1,4 \times 10^{-3}$ sustituciones de bases por nucleótido por año ha sido estimada para todo el genoma. La tasa de mutación de la mayoría de los virus de ARN varía de 10^{-1} a 10^{-4} sustituciones por sitio por año, que se considera un reflejo de la falta de capacidad de corrección de ARN polimerasa ARN dependiente. La expectativa de la teoría neutral que la diversificación se produce a un ritmo constante en el tiempo está implícito en los intentos de utilizar esta tasa para calcular los tiempos de propagación del VHC.

De todas formas, evidencia tanto de evolución "Darwiniana" como de evolución neutral es encontrada en las secuencias del VHC. Un posible ejemplo de cambio adaptativo en el VHC es la rápida evolución de la

región hipervariable de la glicoproteína de la envoltura E2 para impedir el reconocimiento por los anticuerpos inducidos por la infección. Por el contrario, la deriva 'neutral' de la secuencia, sin duda, representa gran parte de la diversidad genética que se observa entre las poblaciones geográficamente o epidemiológicamente separadas del VHC. Este proceso de divergencia resultante de la fijación de cambios en la secuencia neutrales no altera el fenotipo de los virus en gran medida.

A pesar de la diferencia de secuencia de >30% que se observa entre los genotipos del VHC, cada uno conserva un ciclo de replicación similar en el huésped humano. De hecho, su capacidad compartida de establecer infecciones persistentes en los seres humanos con títulos de alta infectividad en la sangre y causar una infección lentamente progresiva y asintomática en gran parte son factores clave en la transmisión. Esta falta de innovación fenotípica durante un período muy largo de evolución divergente demuestra, tal vez, cómo la evolución del VHC está conformada y limitada en su totalidad por su adaptación a las células que infecta.

Al igual que otros virus de ARN, el genoma del VHC en un paciente individual es una población mixta de especies, denominada quasiespecies, con una secuencia consenso dominante para la mayoría de los aislados (Cuthbert, 1994; Simmonds, 2004).

Genotipos

En base a la variabilidad genética VHC ha sido clasificado en seis grandes clados que definen los genotipos principales y dentro de cada clado un número mucho mayor de subtipos. Basado en este tipo de análisis filogenético, nuevos genotipos como 7, 8, 9 y 11 han sido asignados como miembros del clado 6 y el genotipo 10 se ha asignado al

clado 3. (Mellor et al., 1995; Mizokami et al., 1996; de Lamballerie et al., 1997; Simmonds et al., 2005).

La diferencia se encuentra en si la clasificación se basa en estudios filogenéticos, los genotipos 7, 8, 9 y 11 se agrupan dentro del cluster 6 y el genotipo 10 dentro del cluster 3, pero si se basa en la similitud de secuencia, entonces cada genotipo se agrupa por separado (Mellor et al., 1995).

Distribución geográfica de cada genotipo.

Genotipo 1: Se encuentra principalmente en América del Norte, América del Sur y en Australia. A su vez el sub-tipo 1a es común en el Reino Unido y el 1b se encuentra mayormente en Europa, Asia, Japón y América del Sur.

Genotipo 2: El genotipo 2a es más común en Japón y China. En Japón, Taiwán y China también se encuentran 1b y 2b, a su vez 2b es el subtipo más común en los Estados Unidos y norte de Europa y el genotipo 2c es el subtipo más común en Europa occidental y meridional, Pakistán e India.

Genotipo 3: Predomina en Escocia y otras partes del Reino Unido, Europa y en menor grado en los Estados Unidos. El subtipo 3a es altamente prevalente en Australia y Asia meridional.

Genotipo 4: Es más común en Oriente Medio y África septentrional y central. El subtipo 4a es frecuente en Egipto y el 4c es altamente prevalente en África Central.

Genotipo 5: Este genotipo 5 es frecuente sólo en el sur de África.

Genotipo 6: Se encuentra principalmente en Asia y Hong Kong. El subtipo 6a se limita a Hong Kong (donde representa un tercio de las infecciones), Macao y Vietnam.

Genotipo 7: Los subtipos poco conocidos 7a y 7b son comunes en Tailandia.

Genotipo 8, 9, 10 y 11: Los subtipos menos conocidos 8a, 8b y 9a son prevalentes en Vietnam y 10a y 11a son frecuentes en Indonesia. (Bostan y Mahmood, 2010)

Los genotipos y subtipos más ampliamente distribuidos y presentes en la mayoría de los países occidentales son los genotipos 1a, 1b y 3a. El genotipo predominante en Uruguay es el 1. Estudios realizados por nuestro grupo han revelado una diversificación del genotipo 1 en la región Latinoamericana (Colina et al., 1999; Cristina, 2005).

Recombinación

La recombinación es el intercambio de secuencias nucleotídicas entre diferentes moléculas de ARN genómico. Es una característica de muchos virus ARN y es un importante mecanismo para la producción de nuevos genomas que pueden tener “saltos evolutivos” importantes. Entre los virus de ARN simple hebra de cadena positiva, la recombinación está mejor documentada en la familia Picornaviridae. La recombinación entre diferentes enterovirus en especies B es conocida por generar un gran número natural de virus recombinantes con nuevas combinaciones de la cápside (determinación del serotipo) y proteínas no estructurales, que puede mostrar diferencias sutiles en la patogenicidad en modelos de ratón (Simmonds, 2004)

La recombinación ocurre en muchas familias de virus de ARN y su ocurrencia requiere tanto de oportunidades epidemiológicas como de compatibilidad biológica. En virus de ARN de cadena positiva, la recombinación se produce generalmente a través de un proceso de cambio de genoma durante la replicación del ARN genómico. La ARN polimerasa copia primero el extremo 3' de una hebra parental (+) y entonces intercambia un molde por otro en la posición correspondiente en una segunda hebra (+) parental. Para detectar estos hechos, una célula debe estar infectada por dos o más variantes genéticamente identificables del virus. “In vivo”, esto requiere la coinfección de la misma célula con más de una de esas variantes, a fin de que las formas recombinantes sean detectadas. La epidemiología genotípica y la historia natural de la infección por el VHC cumplen claramente con ambos criterios (Simmonds, 2004)

Una amplia gama de genotipos circula en los principales grupos de riesgo para el VHC en los países occidentales, incluyendo 1a y 3a en los usuarios de drogas inyectables (UDI) y 1b, 2a-2c y 4a en toda la zona

Mediterránea. En éstas áreas, la infección se caracteriza por múltiples exposiciones cercanas al momento de la infección primaria, como repetir con frecuencia el uso compartido de agujas con varias personas infectadas en breves períodos de tiempo en el caso de los UDIs y la contaminación de productos de la sangre, como el factor coagulante VIII concentrado a partir de varias unidades de plasma positivos para VHC. De hecho, incluso en curso, la infección por VHC crónica no protege de una posible reinfección (Simmonds, 2004).

La viabilidad y patogenicidad de recombinantes inter e intra-genotipo son difíciles de evaluar y tienden a variar considerablemente entre las familias de virus. Hay poca información experimental sobre la viabilidad potencial de recombinantes inter o intra-genotipo de VHC, a pesar de que recientemente se ha observado que la mayoría de las combinaciones de secuencias de genotipo 1a y 1b en la región no estructural del genoma no logran generar un replicón viable (Gates et al., 2004), lo que implica la existencia de incompatibilidades entre las variantes que muestran una divergencia de aproximadamente 20% de secuencia. A pesar de estas observaciones “in vitro”, formas recombinantes del VHC se han observado en la naturaleza tanto intra como inter-genotipo en distintas regiones geográficas: en San Petersburgo, Rusia (2k/1b) (Kalinina et al., 2002; 2004), Perú (1a/1b) (Colina et al., 2004), Vietnam (2/6) (Noppornpanth et al., 2006), Filipinas (2b/1b) (Kageyama et al., 2006), Francia (2/5) (Legrand-Abravanel et al., 2007), Uzbekistan (2k/1b) (Kurbanov et al., 2008), Japón (1a/1c) (Cristina y Colina, 2006), Irlanda (Moreau et al., 2006) y Uruguay (1a/1b) (Moreno et al., 2009).

A pesar del número de estudios que se han llevado a cabo para investigar este problema, la verdadera frecuencia de recombinación del VHC puede ser considerablemente subestimada. Por ejemplo, la recombinación no se detecta fácilmente entre variantes dentro del mismo subtipo, intra-subtipo, (por ejemplo, entre dos cepas infectantes subtipo 1a en un UDI).

Del mismo modo, es difícil documentar recombinantes inter-subtipo (o intra-genotipo) donde VHC es muy diverso, como por ejemplo dentro del genotipo 2 en el oeste de África, porque en estas regiones, no existe un catálogo completo de variantes de secuencia dentro de la cual observar los eventos de recombinación (Simmonds, 2004).

La existencia de recombinación generalizada es una limitación considerable cuando se usan ensayos de genotipado que se basan en regiones individuales del genoma, como la 5' NCR, Core o NS5B.

Sólo la genotipificación basada en las regiones del genoma que determinan la susceptibilidad al IFN sería capaz de predecir la respuesta al tratamiento, que es una de las principales aplicaciones de los ensayos de genotipificación (Simmonds, 2004).

Coinfección VHC-VIH

Dentro de las aproximadamente 170 millones de personas infectadas con VHC, de 4 a 5 millones están coinfectadas con VIH, del 20-33% de la población infectada con VIH está coinfectada con VHC (Alter, 2006; Rotman y Liang, 2009; Operskalski y Kovacs, 2011).

La coinfección de VHC y VIH ha tomado mayor importancia desde la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART del inglés Highly Active Anti-Retroviral Therapy) y la mejora dramática en la esperanza de vida del paciente infectado con VIH, así como también el impacto del VHC sobre la mortalidad y el desarrollo del carcinoma hepatocelular (HCC) se ha hecho más evidente (Mohsen et al., 2002).

Estudios recientes en aquellos coinfectados con VIH-1 y VHC han demostrado que la Hepatitis C es la principal causa no-SIDA de muerte, en personas coinfectadas y la enfermedad hepática en fase terminal debido a la infección por el VHC representa hasta el 50% de todas las muertes (Mohsen et al., 2002).

En los Estados Unidos y Europa, entre las personas infectadas por el VIH, la prevalencia del VHC es del 98% en pacientes hemofílicos (Mohsen et al., 2002), del 72% al 95% entre usuarios de drogas de inyección (IDU), 1% a 12% en hombres que tienen sexo con hombres (MSM) y 9% a 27% en heterosexuales (Operskalski y Kovacs, 2011; Torriani et al., 2003; Rotman y Liang, 2009).

Sin embargo, incluso estos datos pueden subestimar la verdadera prevalencia del VHC entre pacientes VIH positivos ya que al menos el 4% de los pacientes coinfectados no tienen anticuerpos detectables en presencia de viremia de VHC, o como resultado de inmunosupresión hayan perdido anticuerpos detectables en suero a pesar de la persistente viremia (Mohsen et al., 2002).

Ambos virus comparten vías comunes de transmisión, especialmente la vía parenteral y como resultado de esto las tasas de coinfección en usuarios de drogas intravenosas y hemofílicos son especialmente elevadas. Otras vías de transmisión del VHC no parenterales son también importantes, ya que existe una creciente evidencia de que la vía sexual y la transmisión de madre a hijo son facilitadas por la coinfección con VIH (Mohsen et al., 2002).

La enfermedad hepática asociada a VHC, incluyendo fibrosis, cirrosis y la enfermedad en fase terminal del hígado (ESLD, del inglés end-stage liver disease), se acelera en personas infectadas por el VIH. La progresión a cirrosis es tres veces superior en pacientes coinfectados que en mono infectados y aproximadamente el 33% progresa a cirrosis en menos de 20 años (Kim y Lauer, 2007; Operskalski y Kovacs, 2011).

HCC ocurre a una edad más temprana in pacientes coinfectados comparados con aquellos que sólo se encuentran infectados con VHC (Mohsen et al., 2002).

El tratamiento contra VHC de personas coinfectadas con VIH es una prioridad por su progresión más rápida a ESLD, y un mayor riesgo de hepatotoxicidad.

Existen guías para el tratamiento de VHC en pacientes coinfectados publicadas, pero existe también una falta de consenso en cuanto a los factores clave que podrían informar el inicio y duración del tratamiento, incluyendo la etapa de la enfermedad de VIH, la carga viral y genotipo del VHC, grado de fibrosis hepática y preparación del paciente a tolerar y adherirse al tratamiento (Operskalski y Kovacs, 2011).

Justificación

En la región existen muy pocos estudios de los genes p7 y NS4A, y más precisamente en el caso de nuestro país, no se encuentran registros de secuencias ni estudios de la variabilidad genética de los mismos. Al igual que estos genes, la región hipervariable de E2 está también escasamente estudiada en la región Sudamericana. Los registros de secuencias existentes en la base de datos de Los Alamos (www.hcv.lanl.gov) corresponden a secuencias de genomas completos de Brasil y Venezuela por lo que es importante obtener la secuencia de genomas completos provenientes de nuestro país a fin de poder compararlos con los de la región e incluso con genomas de distintas regiones geográficas del mundo.

De la misma manera es aún más interesante realizar estudios de secuencias a partir de muestras de pacientes de nuestro país coinfectados VHC/VIH, con todas las implicancias que esto acarrea como la progresión acelerada de las enfermedades hepáticas y el tratamiento diferenciado que estos pacientes requieren.

A su vez, el estudio de recombinantes es sumamente importante ya que a la hora del tratamiento de los pacientes éste también depende del genotipo y subtipo y el mismo puede no ser el más adecuado en el caso que se trate de un recombinante.

Objetivos

Objetivo General

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la variabilidad genética de VHC en pacientes uruguayos coinfectados con el VIH, mediante el diseño de una estrategia que permita obtener secuencias del genoma viral completo, a fin de determinar las relaciones genéticas existentes con respecto a estirpes de la región y el mundo.

Objetivos Específicos

- Genotipificación de las muestras 406 y 409 mediante el análisis filogenético de la región 5'NCR y NS5B.
- Estudio de posibles eventos de recombinación genética en las muestras 406 y 409 utilizando las secuencias de distintas regiones del genoma.
- Estudio del grado de variabilidad genética de VHC para los genes p7 y NS4A y la región hipervariable 1 del gen E2, para los cuales no hay estudios en la región Sudamericana.
- Desarrollar una metodología efectiva que permita la amplificación de genomas completos de VHC.

Materiales y Métodos

Muestras estudiadas

Se analizaron 2 sueros de pacientes con marcadores serológicos positivos para VHC y VIH, provenientes de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos.

Las muestras de los pacientes fueron identificadas arbitrariamente con los números 406 y 409.

Ambos pacientes han sido identificados como positivos para VHC y VIH desde hace más de 10 años. Han sido tratados con IFN α e INF- α -peg y RBV; así como también con las respectivas drogas para controlar la infección por VIH.

Las muestras fueron procesadas siguiendo el algoritmo mostrado en la figura 3.

Extracción del ARN viral

El ARN total fue obtenido a partir de 140 μ l de suero, utilizando el kit QIAmp Viral RNA Mini Kit de QIAGEN, de acuerdo con instrucciones suministradas por los fabricantes. El ARN obtenido, fue almacenado a -20°C.

Transcripción reversa (RT)

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 5 μ l del ARN obtenido a partir de la extracción, utilizando hexámeros al azar.

La RT se realizó en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 5 μ l de ARN; buffer de reacción 1x (Invitrogen); 500 μ M de dNTP's; 0,01 M de DTT; 200 U de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen); 20 pmoles del

hexámero y H₂O-DEPC. La reacción se inició con la desnaturalización del ARN durante 5 min. a 65°C y luego de agregada la mezcla de reacción se incubó a 42°C durante 50 min. Posteriormente se procedió a la inactivación de la reacción calentando a 75°C durante 15 min.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En el marco del desarrollo de un método para la amplificación del genoma completo de VHC, se utilizaron dos protocolos previamente publicados por Bracho y colaboradores (2006) y Yao y colaboradores (2005). Para realizar la amplificación de los genomas se utilizaron oligonucleótidos cuyas secuencias son las publicadas en ambos trabajos.

En todos los casos se utilizó un control negativo para evitar falsos positivos debido a contaminación, la cual es elevada en los casos de nested-PCR, además se trabajó en un laboratorio con dos zonas definidas, una de pre-amplificación y otra post-amplificación.

El ADNc obtenido fue posteriormente amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos cebadores específicos para la amplificación de las regiones (Bracho et al., 2006; Yao et al., 2005). Las condiciones de amplificación fueron optimizadas para cada región.

Para la región 5'NCR se amplifica una banda esperada de 326 pares de bases (pb) que comprende la región entre el nucleótido 1 y el 326.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 95°C durante 2 min.

Luego 35 ciclos de amplificación:

- Desnaturalización a 95°C durante 1 min.
- Annealing a 61°C durante 1 min.
- Extensión a 72°C durante 1 min.

Por último, una extensión final a 72°C durante 10 min. y terminar la reacción a 4°C.

Para el gen NS5B se amplifica una banda esperada de 350 nucleótidos correspondiente la región central de la misma que va desde el nucleótido 8260 al 8615.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 94°C durante 2 min.

Luego 30 ciclos de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C durante 1 min.
- Annealing a 50°C durante 1 min.
- Extensión a 72°C durante 1 min.

Por último, una extensión final a 72°C durante 10 min. y terminar la reacción a 4°C.

Para la región comprendida por la 5'NCR y el Core se amplifica una banda esperada de 700 nt que va desde el nt 51 al 751.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 95°C durante 2 min.

Luego 30 ciclos de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C durante 1 min.
- Annealing a 50°C durante 1 min.
- Extensión a 72°C durante 1 min.

Por último, una extensión final a 72°C durante 10 min. y terminar la reacción a 4°C.

Para el gen NS4A se amplifica una banda esperada de 3000 nucleótidos que va desde la posición 4877 al 7858, dentro de la cual se encuentra el gen completo NS4A que va desde la posición 5313 a la 5475 (figura 4).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 95°C durante 2 min.

Luego 40 ciclos de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C durante 1 min.
- Annealing a 50°C durante 1 min.
- Extensión a 72°C durante 3 min.

Por último, una extensión final a 72°C durante 10 min. y terminar la reacción a 4°C.

Para el gen p7 se amplifica una banda esperada de 2500 nucleótidos que va desde la posición 2346 al 5060, dentro de la cual se encuentra el gen completo p7 que va desde la posición 2580 a la 2769 (figura 5).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 95°C durante 2 min.

Luego 40 ciclos de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C durante 1 min.
- Annealing a 50°C durante 1 min.
- Extensión a 72°C durante 3 min.

Por último, una extensión final a 72°C durante 10 min. y terminar la reacción a 4°C.

Para la región que comprende la HVR1 del gen E2 la banda amplificada esperada es de 600 nt y va desde el nucleótido 1278 al 1861. La HVR1 es la comprendida en los primeros 27 aa de la glicoproteína E2, desde el nt 1491 al 1572 (figura 6).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 94°C durante 2 min.

Luego 40 ciclos de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C durante 30 seg.
- Annealing 53°C durante 1 min.
- Extensión a 72°C durante 1 min.

Por último, una extensión final a 72°C durante 10 min. y terminar la reacción a 4°C.

Las posiciones en el genoma de VHC mencionadas anteriormente para cada una de las regiones amplificadas están establecidas de acuerdo a la respectiva posición en el genoma de referencia AF009606.

Las mezclas de reacción para las PCR fueron preparadas en un volumen final de 50 µL conteniendo: buffer de reacción 1x; 1,5mM de cloruro de magnesio; 0,1 mM de dNTP's; 25 pmol de cada cebador específico; 2,5 U de la enzima Taq Platinum (Invitrogen) y H₂O bidestilada y deionizada. A los 45 µL de la mezcla de reacción se le adicionaron 5 µL de ADNc.

Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados en un procesador de imágenes.

Purificación de los productos de PCR

La purificación se realizó directamente del producto de PCR con el kit QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN o a partir del gel de agarosa con QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN y Gel Extraction Kit de Fermentas. Las purificaciones se realizaron de acuerdo a los protocolos suministrados por los fabricantes.

Secuenciación de los productos de PCR

La secuenciación de los productos de PCR se realizó en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. Cada producto de PCR fueron secuenciados bidireccionalmente utilizando los mismos

primers de la PCR (en el caso de las nested-PCR se utilizaron los primers internos).

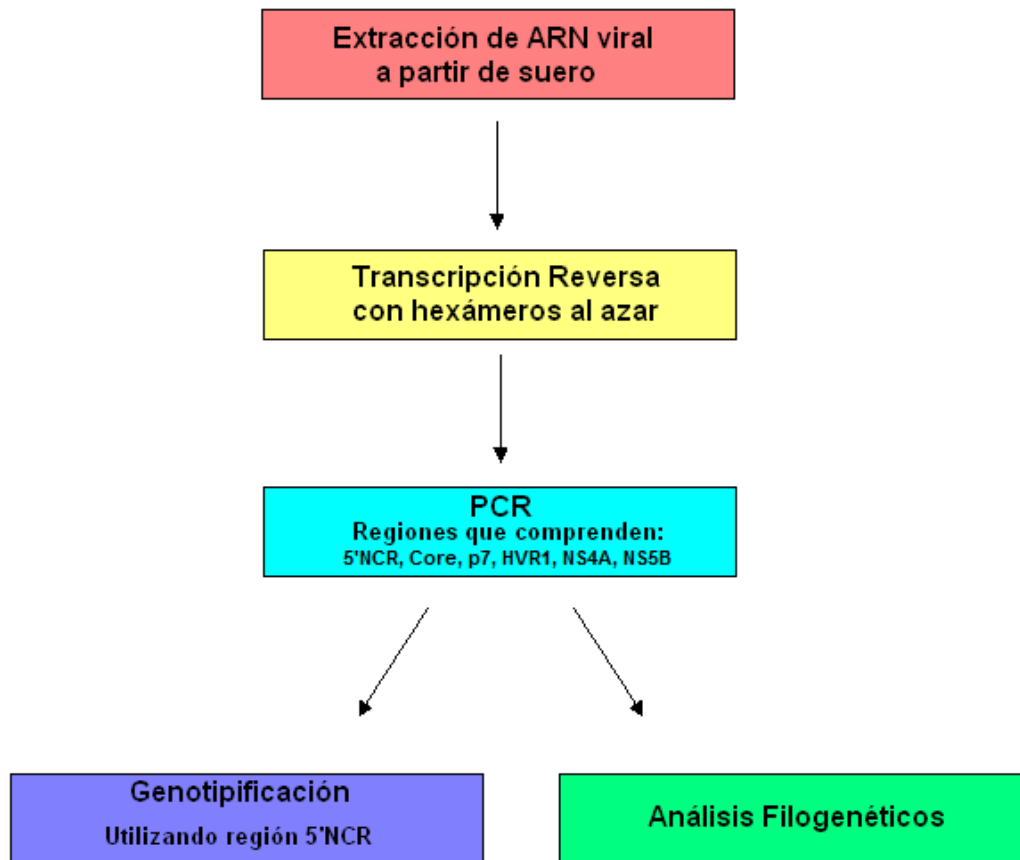


Figura 3. Esquema del procesamiento de la Muestra.

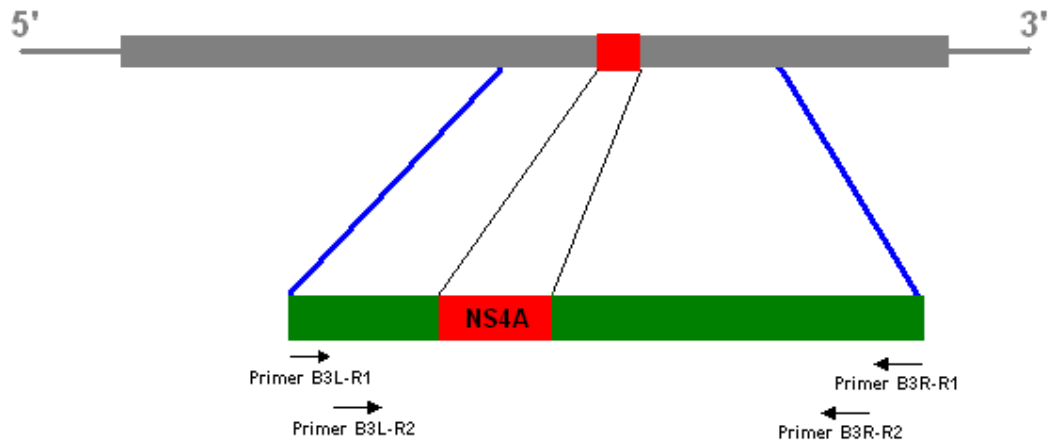


Figura 4. Esquema de localización de los primers (cebadores) para la amplificación de la región NS4A.

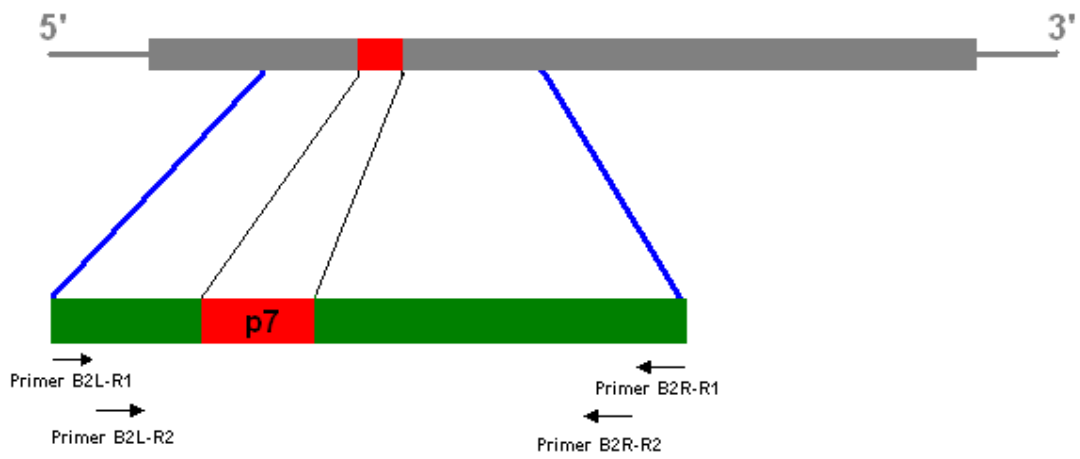


Figura 5. Esquema de localización de los primers (cebadores) para la amplificación de la región p7.

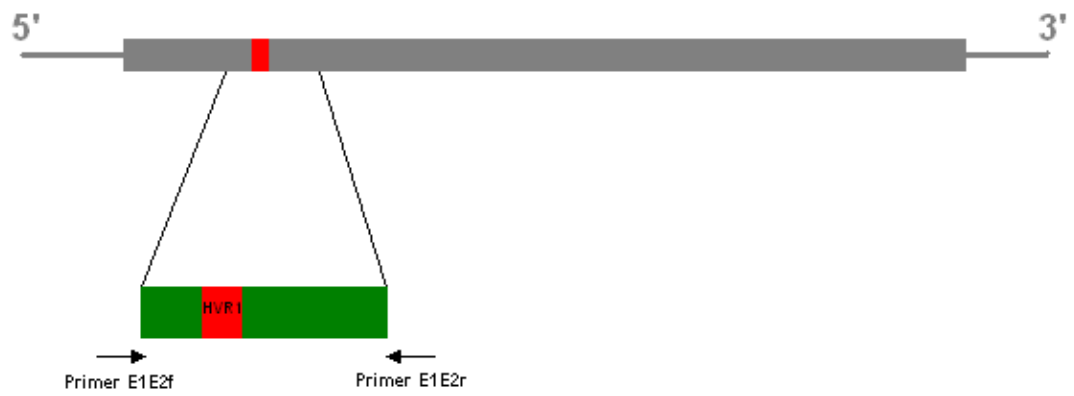


Figura 6. Esquema de localización de los primers (cebadores) para la amplificación de la HVR1 de E2.

Análisis de las secuencias obtenidas

Análisis Filogenéticos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la edición con el programa Chromas Lite 2.01 de los cromatogramas correspondientes a cada región así como aquellas secuencias obtenidas de la Base de Datos de VHC de Los Alamos (HCV LANL database) (Kuiken et al., 2005) fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson et al., 1994). Clustal W es un programa que permite hacer alineamientos globales de nucleótidos y crea alineamientos múltiples de un grupo de secuencias empleando alineamiento progresivo de pares de bases. Una vez alineadas las secuencias se realizaron los análisis filogenéticos.

Con el fin de genotipificar nuestras muestras se construyeron árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA 4. Utilizando el método de Neighbor-joining, se generaron árboles filogenéticos, cuyo apoyo estadístico se calculó realizando 1000 pseudo-replicas por medio del método de bootstraps.

Para el estudio de los genes p7, NS4A y la región HVR1 se utilizó el programa Find Model de la base de datos “The Los Alamos HCV Sequence Database” (www.hcv.lanl.gov/) a fin de determinar el modelo evolutivo que mejor describía nuestros datos el cual utiliza el criterio informativo de Akaike (AIC) y el logaritmo Likelihood. En el caso de los genes NS4A y p7 el AIC indicó que el modelo de sustitución General Time Reversible + Gamma (GTR + γ) era el que mejor describía nuestros datos de secuencia, para el caso de HVR1 el modelo que se ajustaba mejor fue Tamura-Nei + Gamma (TrN + γ).

Una vez obtenido el modelo, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) utilizando el programa PhyML (Guidon et al., 2005) (disponible en: http://www.phylogeny.fr/version2.cgi/simple_phylogeny.cgi). Como

medida de la robustez de cada rama de los árboles filogenéticos se utilizó un Approximate Likelihood Ratio Test (aLRT), que demuestra que la rama estudiada provee un likelihood significativo contra la hipótesis nula que involucra colapsar esa rama del árbol pero dejar el resto de la topología del árbol idéntica (Anisimova & Gascuel, 2006).

Con el fin de confirmar los genotipos se procedió al análisis por el método disponible en el NCBI, Genotyping tool: <http://www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>. Este enfoque permite la visualización de las similitudes de cualquier parte de la secuencia de consulta y, por tanto, es especialmente útil para el análisis de secuencias recombinantes (Rozanov et al., 2004).

Análisis de eventos de recombinación

Para determinar la existencia de recombinación se utilizó el programa Simplot.

Las posibles estirpes recombinantes, así como los probables parentales fueron determinados mediante cálculos de índices de similaridad entre distintas regiones del genoma de estas cepas (Lole y cols. 1999). Simplot calcula y grafica el porcentaje de identidad de la secuencia problema con un panel de secuencias de referencia utilizando un sistema de ventana móvil (200pb), la cual se mueve a lo largo de la secuencia en pasos de 20 nucleótidos.

A efectos de confirmar la existencia de un evento de recombinación, las mismas secuencias fueron sometidas a un estudio de bootscanning (Salminen y cols. 1995). El Bootscanning se basa en que un mosaicismo está sugerido cuando se observa alto grado de relación filogenético entre la secuencia problema y más de una secuencia de referencia. Con este fin para ambas muestras se concatenaron las secuencias correspondientes a la región 5'NCR y el Core.

Estas secuencias fueron analizadas con respecto a secuencias pertenecientes a cepas de referencia tanto 1a como 1b (obtenidas de la base de datos de Los Alamos y NCBI) y también con una cepa 2a necesaria para el estudio de BootScan.

Finalmente para confirmar por otros métodos utilizamos los programas disponibles en www.datamonkey.org, el programa GARD (Genetic Algorithm for Recombination Detection) y el SBP (Single Breakpoint Recombination).

El GARD está diseñado para detectar discordancias filogenéticas en alineamientos de secuencias y estima el número y localización de los posibles puntos de recombinación asegurando el resultado basándose en un criterio informativo, tal como el AIC (Kosakovsky y cols. 2006). El SBP está diseñado para responder a la pregunta de si existe evidencia de recombinación en el alineamiento que se está analizando.

Resultados

Amplificación y secuenciación de genomas completos de las muestras 406 y 409

Se logró amplificar hasta el momento el 80% del genoma de ambas muestras, restan dos regiones en el extremo 3' del genoma para las cuales se están optimizando las condiciones. La secuenciación ha sido en menor porcentaje debido al tamaño de los fragmentos amplificados y la necesidad de diseñar primers internos para su completa secuenciación.

Ambas muestras han sido amplificadas desde el nt 1 hasta el 7800 y desde el 8200 al 8600 aproximadamente.

Las secuencias obtenidas para la muestra 406 fueron las siguientes:

14-716, 1335-1883, 1943-2294, 2457-3089, 4377-4980, 5019-5663, 7069-7706, 8294-8613.

Para la muestra 409 las secuencias obtenidas fueron las siguientes:

14-716, 1334-1813, 1866-2346, 2463-2971, 4335-4956, 5011-5654, 7152-7690, 8275-8631.

Las secuencias utilizadas en esta tesina provienen de la secuenciación de los fragmentos mencionados anteriormente para cada una de las muestras.

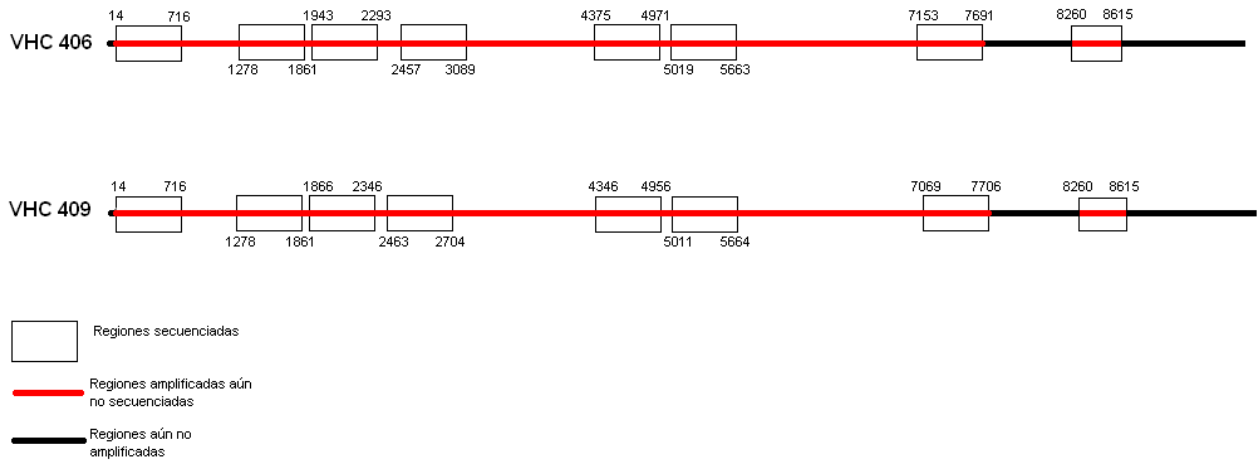


Figura 7. Esquema de representación de las regiones amplificadas y secuenciadas.

En la figura se muestran esquemáticamente las regiones amplificadas con línea roja, las regiones aún no amplificadas con línea negra y en los recuadros se muestran las regiones de las cuales ya se obtuvieron las secuencias.

Genotipificación de las muestras 406 y 409 mediante el análisis filogenético de las regiones 5'NCR y NS5B

Para la genotipificación de VHC se sugiere analizar al menos dos regiones del genoma de modo de obtener una efectiva asignación del genotipo y su respectivo subtipo. Por esta razón se estudió la región 5'NCR y la NS5B.

Las secuencias de la región 5'NCR de las cepas en estudio y las correspondientes provenientes de cepas de referencia para esta misma región obtenidas de la base de datos de Los Alamos fueron alineadas y a partir de este alineamiento se construyeron matrices de datos y posteriormente los respectivos árboles filogenéticos utilizando los métodos de Neighbor-joining y Minimum-evolution. Estos estudios demuestran que nuestras muestras se agruparon en un cluster junto a las pertenecientes al genotipo 1 y dentro de éste con las del subtipo 1b (Ver figura 8 y 9).

Luego las secuencias de la región NS5B de las muestras en cuestión fueron alineadas con secuencias provenientes de cepas de referencia para esta región obtenidas de la base de datos de Los Alamos; y se generaron árboles filogenéticos por el método de maximum likelihood. El resultado de estos análisis revela que nuestras cepas se agrupan en un mismo cluster con las estirpes pertenecientes al genotipo 1 pero con las del subtipo 1a (Ver figura 10). Estos hallazgos revelan la existencia de una discordancia en la asignación de los subtipos en ambas regiones. A modo de confirmar estos resultados se procedió a realizar un nuevo análisis utilizando la herramienta bioinformática "Genotyping tool". Los resultados obtenidos por cada región por separado son discordantes entre sí al igual que los obtenidos por filogenia, siendo para la región 5'NCR el subtipo 1b el de mayor apoyo estadístico y para el resto de las regiones analizadas el subtipo 1a (Datos no mostrados). Se procedió

entonces al análisis por este mismo método pero de todas las regiones secuenciadas hasta el momento de nuestras muestras, las cuales fueron concatenadas entre sí. Los resultados revelan la existencia de un posible evento de recombinación en la región ubicada al final de la 5'NCR y el comienzo del Core (Ver figuras 11 y 12).

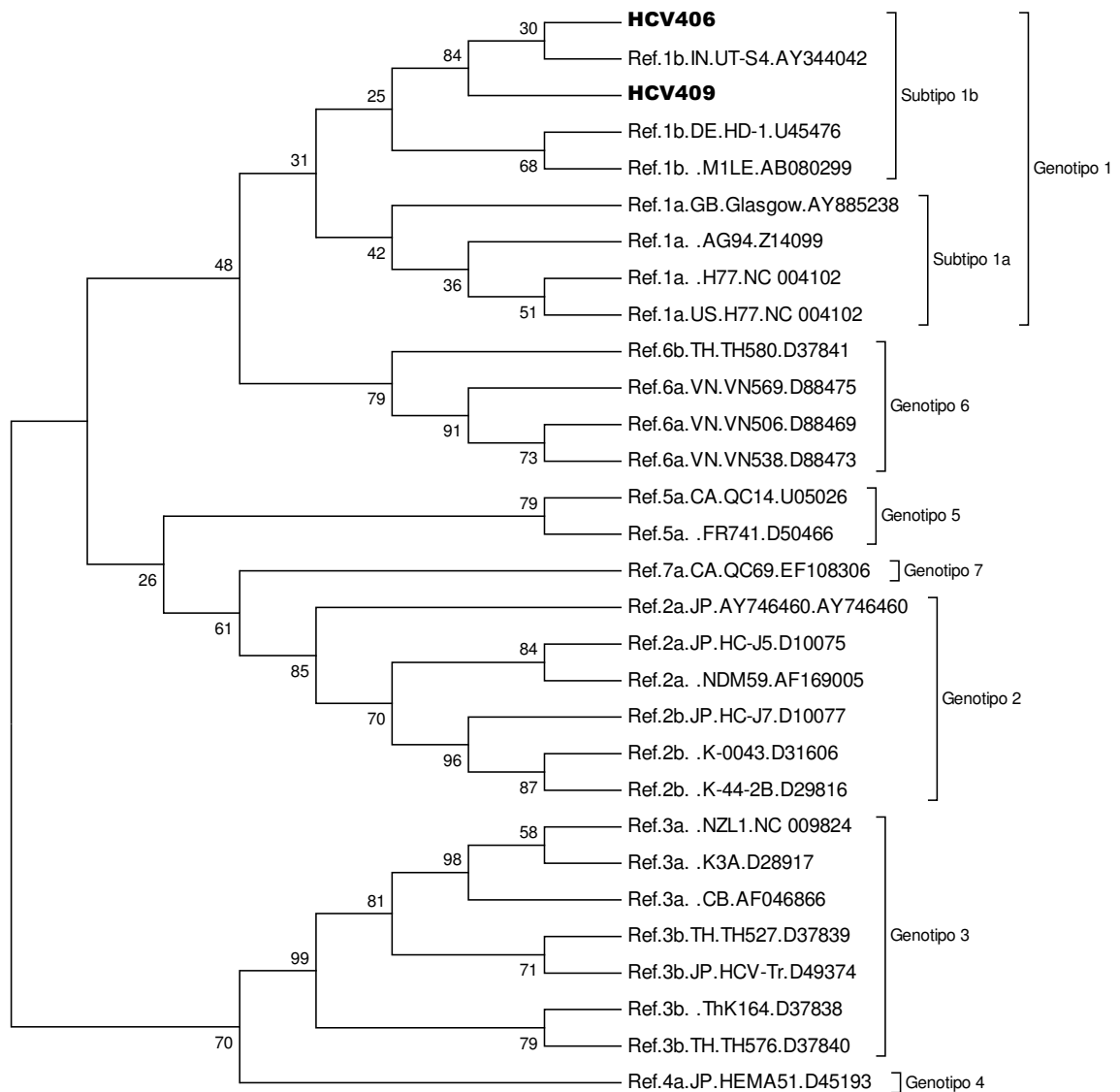


Figura 8. Análisis filogenético por el método de Neighbor-Joining de la región 5'NCR.

Se observa el árbol filogenético realizado utilizando el método de Neighbor-Joining. Las diferentes cepas se indican por su genotipo y subtipo, el país con el código de dos letras, seguido por el nombre de la cepa y su número de acceso. Las cepas en estudio se muestran por su nombre y en negrita. Los números en cada nodo indican los valores del soporte estadístico.

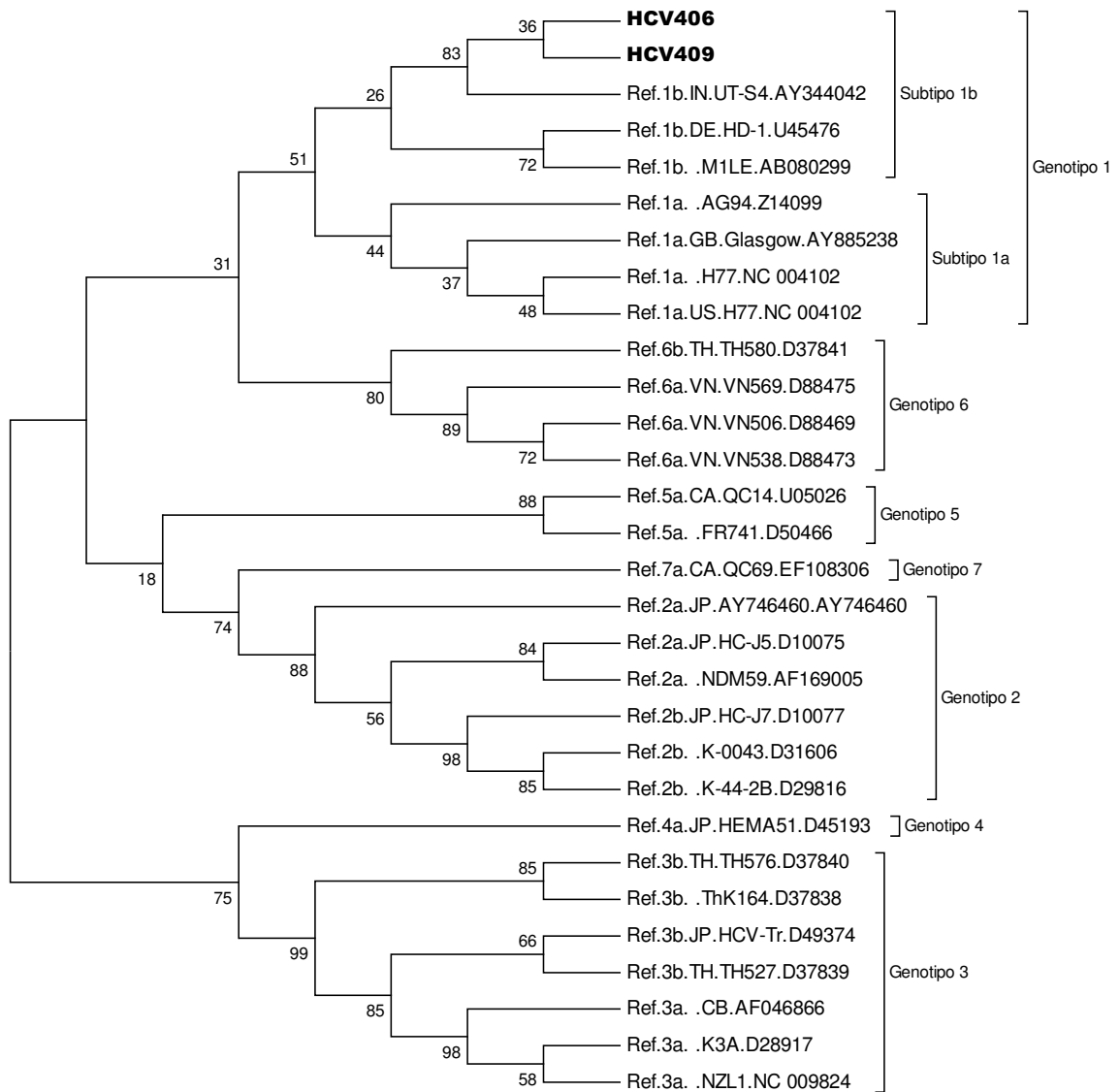


Figura 9. Análisis filogenético por el método de Minimum Evolution de la región 5'NCR.

Se observa el árbol filogenético realizado utilizando el método de Minimum Evolution. Las diferentes cepas se indican por su genotipo y subtipo, el país con el código de dos letras, seguido por el nombre de la cepa y su número de acceso. Las cepas en estudio se muestran por su nombre y en negrita. Los números en cada nodo indican los valores del soporte estadístico.

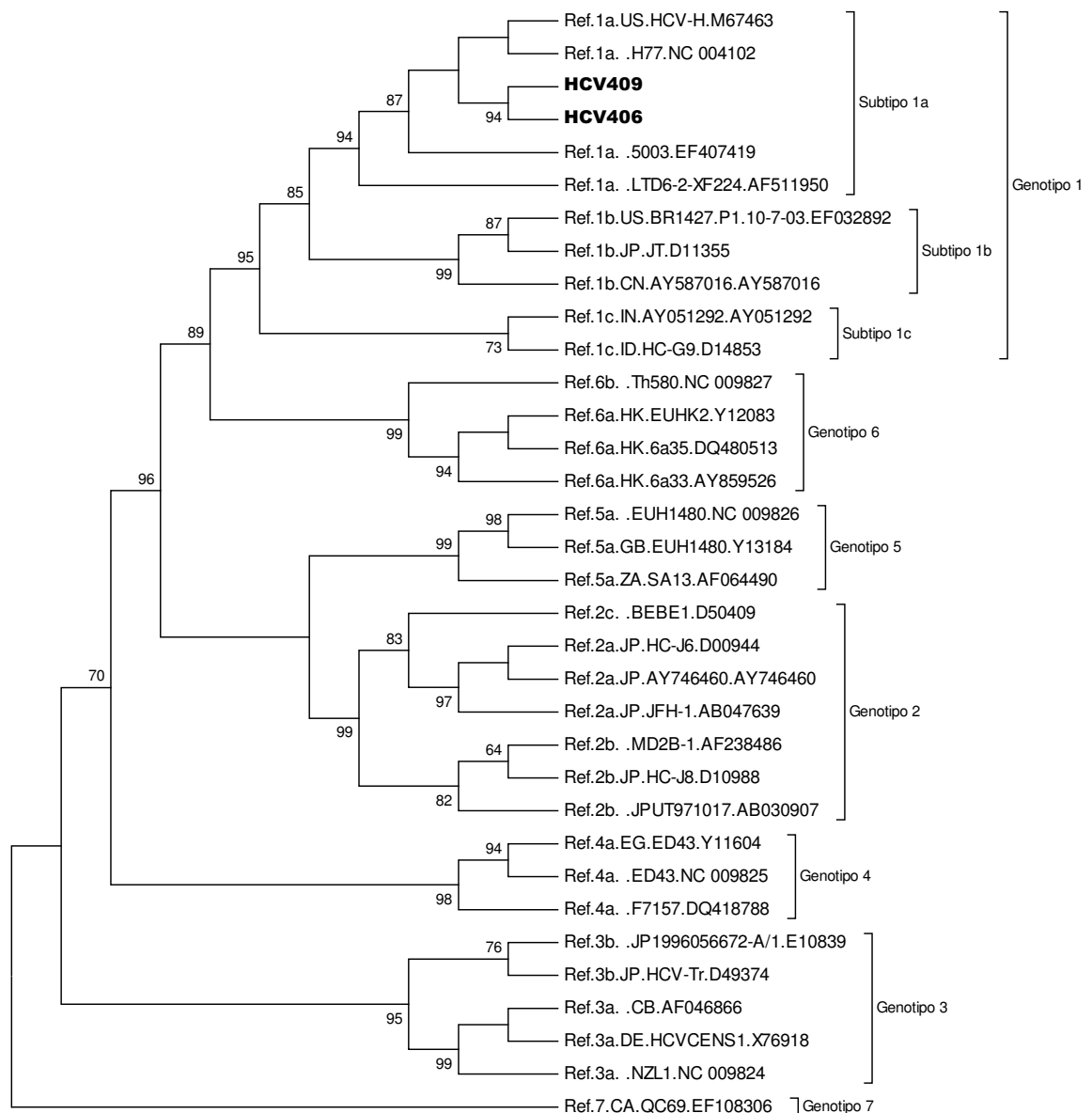


Figura 10. Análisis filogenético de máxima verosimilitud de la región NS5B del genoma de VHC.

Se observa el árbol filogenético realizado utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo evolutivo GTR + γ . Las diferentes cepas se indican por su genotipo y subtipo, el país con el código de dos letras, seguido por el nombre de la cepa y su número de acceso. Las cepas en estudio se muestran por su nombre y en negrita. Los números en cada nodo son los valores del soporte estadístico aLTR.

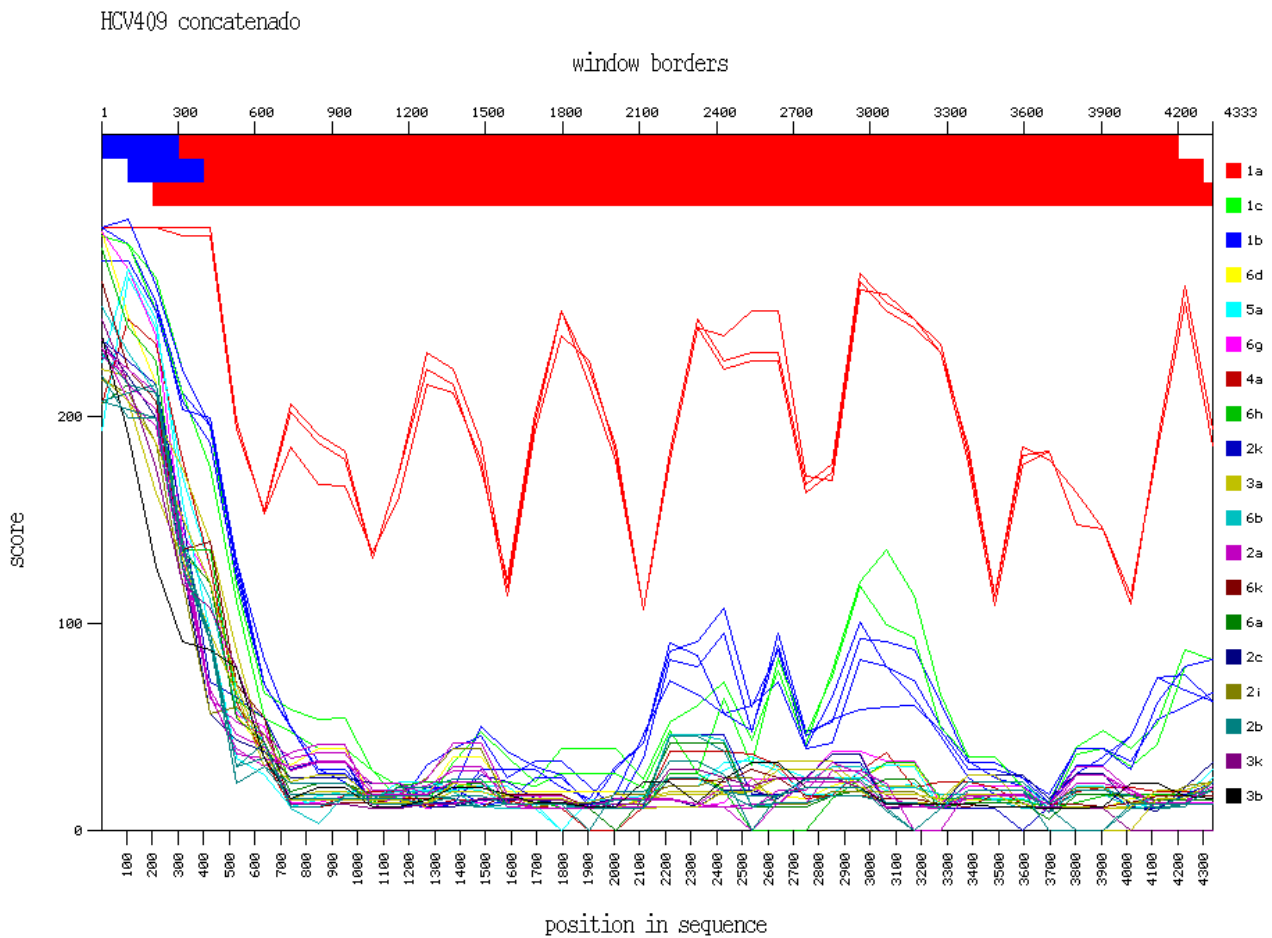


Figura 11. Genotipaje de HCV409 a través de la herramienta Genotyping tool.

En la figura se muestra el estudio del genotipo y subtipo de HCV409 (secuencia parcial concatenada) a través del método Genotyping tool del NCBI. Se utilizaron las cepas de referencia y los parámetros preestablecidos que son ventanas móviles de 300 nt que se desplazan de a 100 nt. La parte superior del gráfico muestra para cada ventana el código del color para la secuencia de referencia con el mayor score. A la derecha de la imagen se observan los colores correspondientes a cada subtipo de VHC.

406 concatenada

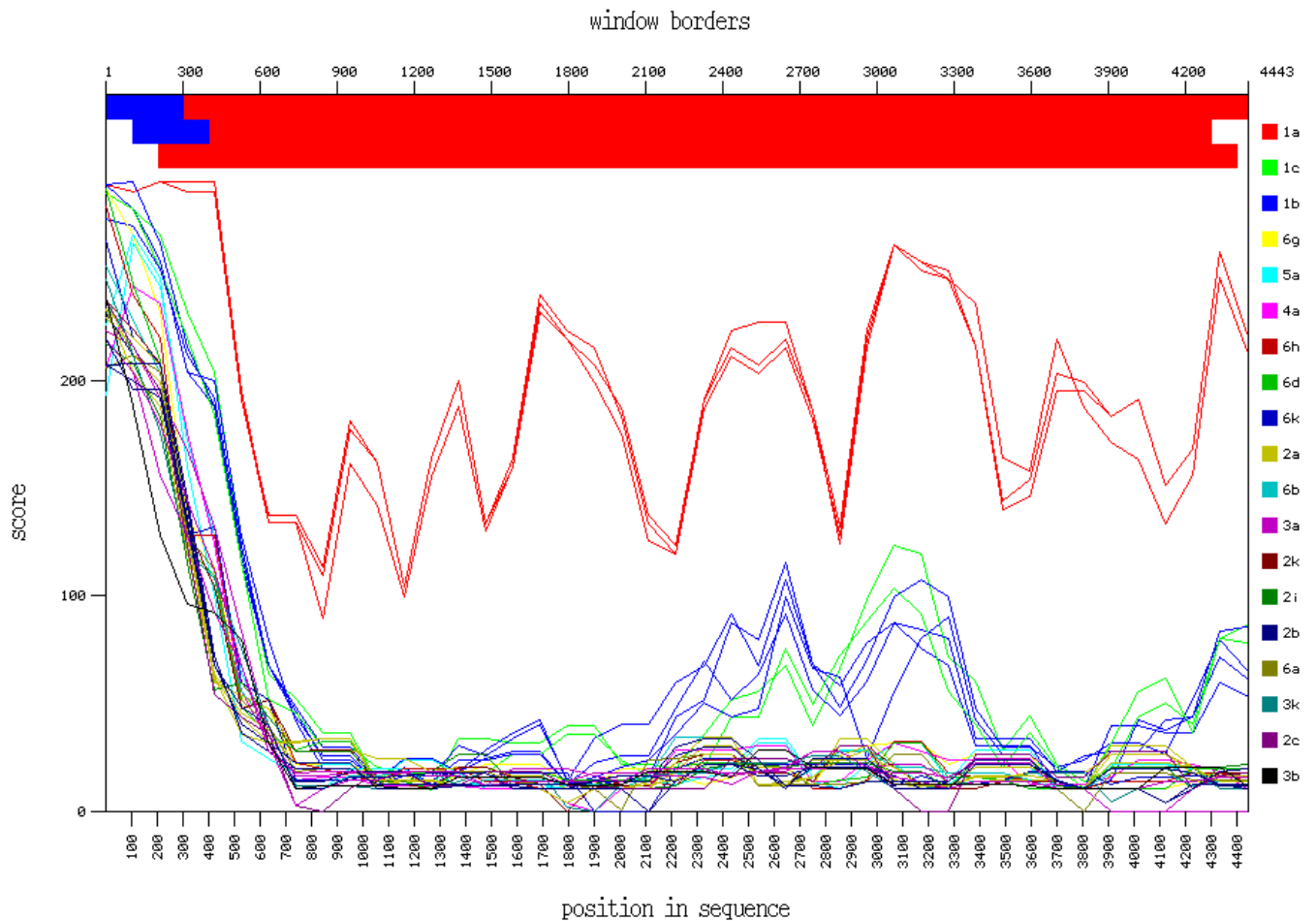


Figura 12. Genotipaje de HCV406 a través de la herramienta Genotyping tool.

En la figura se muestra el estudio del genotipo y subtipo de HCV406 (secuencia parcial concatenada) a través del método Genotyping tool del NCBI. Se utilizaron las cepas de referencia y los parámetros preestablecidos que son ventanas móviles de 300 nt que se desplazan de a 100 nt. La parte superior del gráfico muestra para cada ventana el código del color para la secuencia de referencia con el mayor score. A la derecha de la imagen se observan los colores correspondientes a cada subtipo de VHC.

Estudio de eventos de recombinación en VHC en las muestras 406 y 409.

Con el fin de confirmar un posible evento de recombinación y determinar la posición en la cual ocurre este evento procedimos a realizar los siguientes estudios. Los resultados previos indicaban la existencia de un evento de recombinación en la región comprendida entre el extremo 3' de la región 5'NCR y el extremo 5' del Core.

En primer lugar, se concatenaron las secuencias de las regiones 5'NCR y Core para las muestras 406 y 409. De ésta manera se obtuvieron secuencias que van desde el nucleótido 14 al 716.

Luego las mismas fueron analizadas utilizando el programa SimPlot, y fueron estudiadas con respecto a las cepas parentales de referencia D11355 y AF009606, 1b y 1a respectivamente, ya que la recombinación se presumía que era 1b/1a.

Los resultados obtenidos indicaron la existencia de un único evento de recombinación para ambas muestras (no mostrado). Luego utilizamos una segunda opción dentro del programa Simplot, llamada BootScan, con la cual confirmamos la existencia de recombinación y como era esperado ésta es en ambos casos 1b/1a (Figuras 13 y 14).

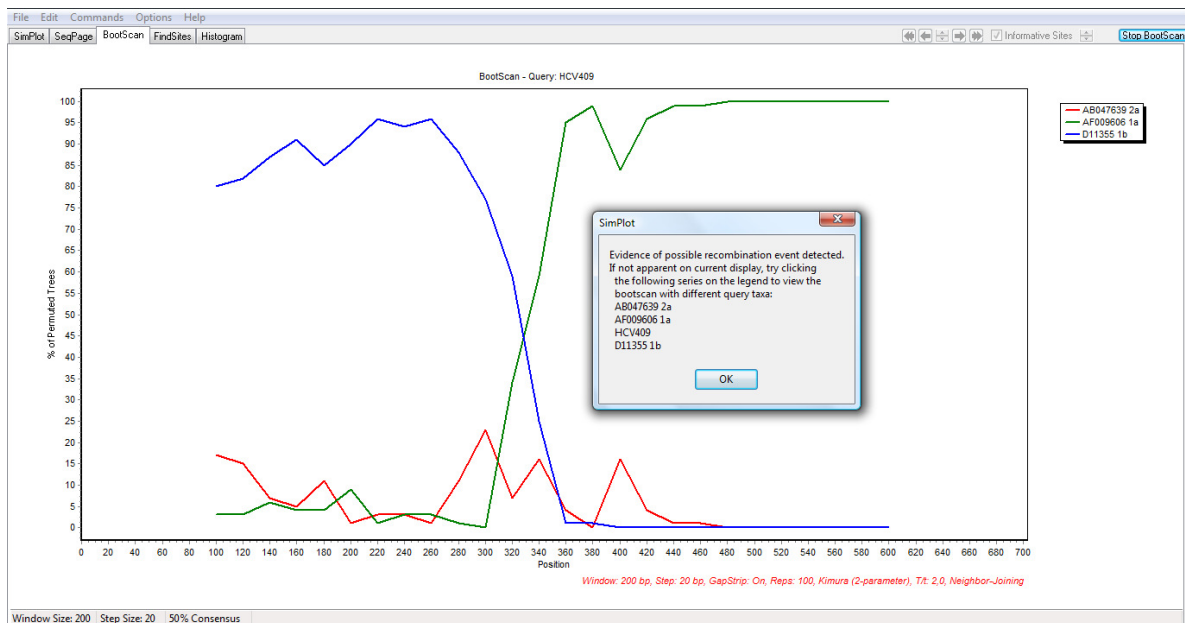


Figura 13. Estudio de recombinación en la cepa HCV409 por el programa SimPlot.

En la figura se muestra el resultado del análisis BootScan para la cepa HCV409. El programa genera una gráfica del porcentaje de árboles permutados obtenidos utilizando una ventana móvil de 200 nt que se mueven de a 20 nt. Esta aproximación permite observar el nivel de relación filogenética entre la secuencia problema y las de referencia a lo largo de la misma. Para el estudio se utilizaron como posibles parentales las cepas de referencia D11355 y AF009606 (1b y 1a respectivamente). Las referencias para cada cepa se muestran a la derecha de la gráfica.

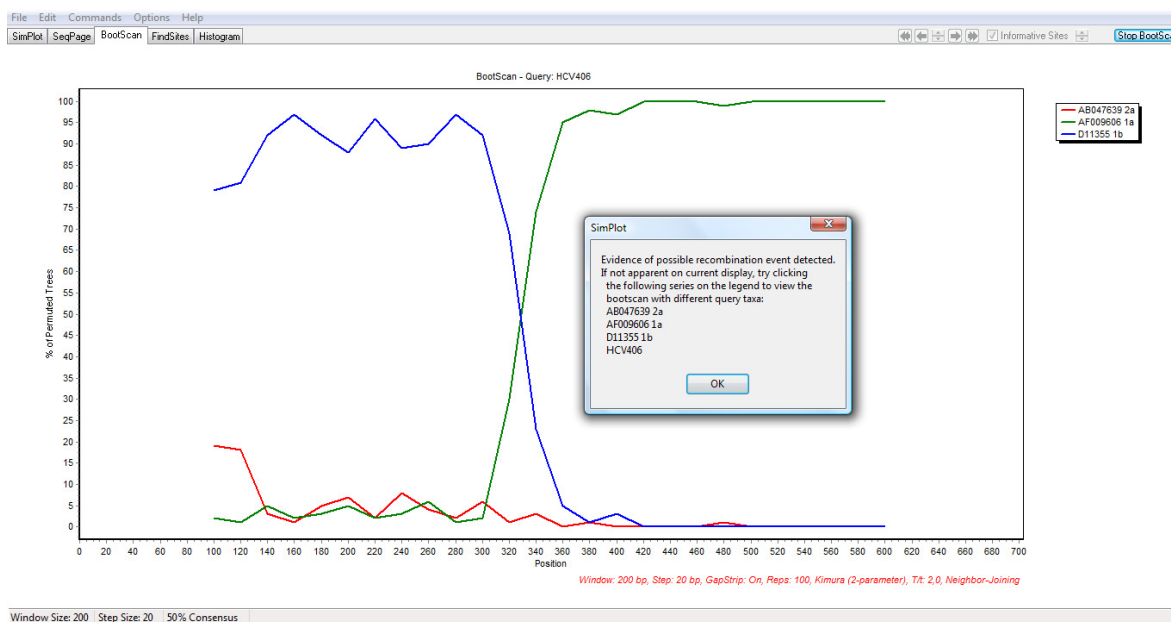


Figura 14. Estudio de recombinación en la cepa HCV406 por el programa SimPlot.

En la figura se muestra el resultado del análisis BootScan para la cepa HCV406. El programa genera una gráfica del porcentaje de árboles permutados obtenidos utilizando una ventana móvil de 200 nt que se mueven de a 20 nt. Esta aproximación permite observar el nivel de relación filogenética entre la secuencia problema y las de referencia a lo largo de la misma. Para el estudio se utilizaron como posibles parentales las cepas de referencia D11355 y AF009606 (1b y 1a respectivamente). Las referencias para cada cepa se muestran a la derecha de la gráfica.

Finalmente con el objetivo de establecer con exactitud el punto de recombinación para ambas estirpes utilizamos el algoritmo “Genetic Algorithms for Recombinant Determination (GARD)” y el “Single Breakpoint Recombination (SBP)”. Estos métodos permiten confirmar posibles eventos de recombinación, y estimar su ubicación en el alineamiento utilizado.

El SBP confirmó la presencia de recombinación en ambos casos con una confianza del 100% según el apoyo estadístico cAIC (resultados no mostrados).

A su vez, el GARD no solo confirmó la recombinación sino que también estimó los puntos donde ésta tuvo lugar (Figuras 15 y 16). Para la cepa 406 este punto se ubicó en el nucleótido 364 y para la 409 en el nucleótido 374. En ambas cepas la recombinación tuvo lugar al comienzo del Core, en una región altamente conservada, donde además se encuentra codificada la proteína F del marco alternativo de lectura.

Todos los resultados sobre la recombinación son concordantes entre sí, confirmándola para ambos casos.

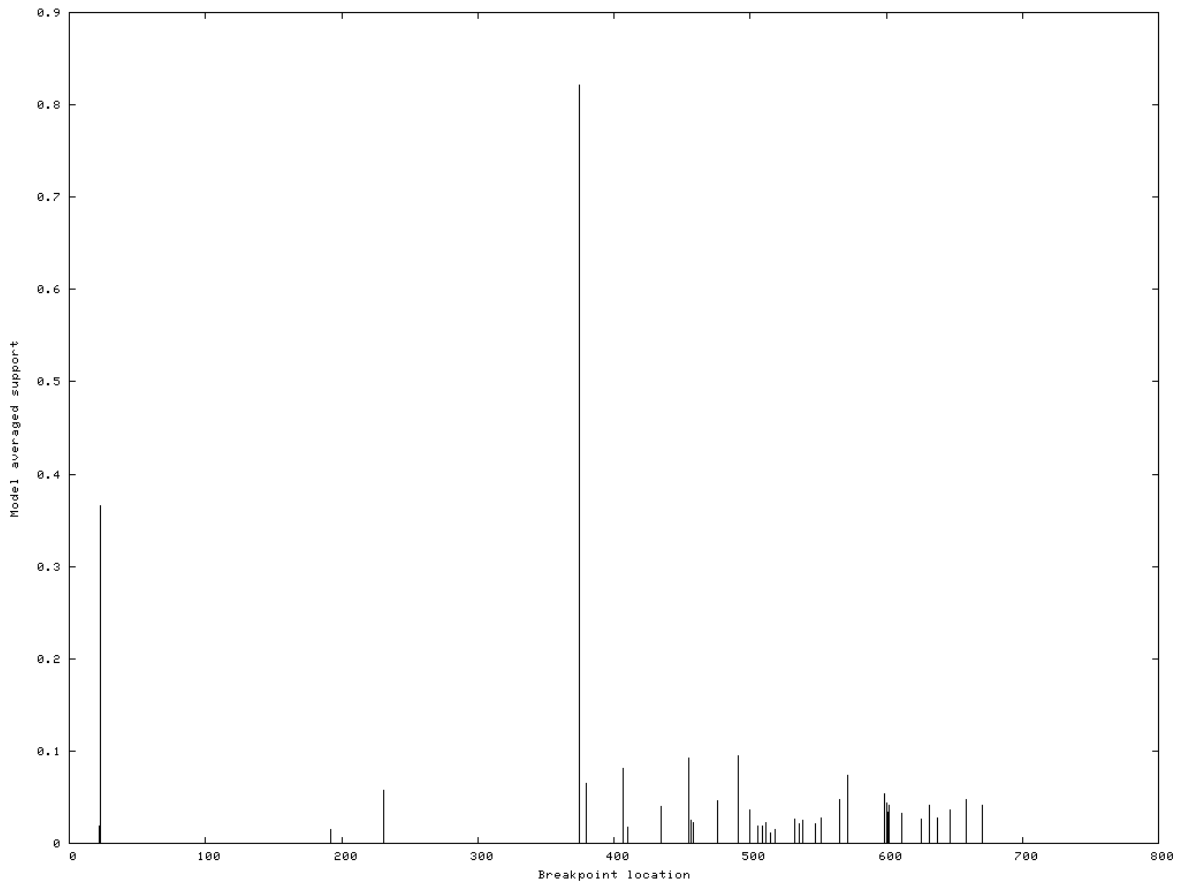


Figura 15. Determinación del punto de recombinación en HCV409 mediante GARD.

Este método permite estimar eventos de recombinación, si ocurrió alguno y en que posición del alineamiento es el o los eventos de recombinación. Se muestra en la gráfica el soporte estadístico para un evento de recombinación en función de la posición nucleotídica del alineamiento. Las secuencias utilizadas fueron obtenidas de la base de datos de Los Alamos y son las de referencia AF009606 y D11355.

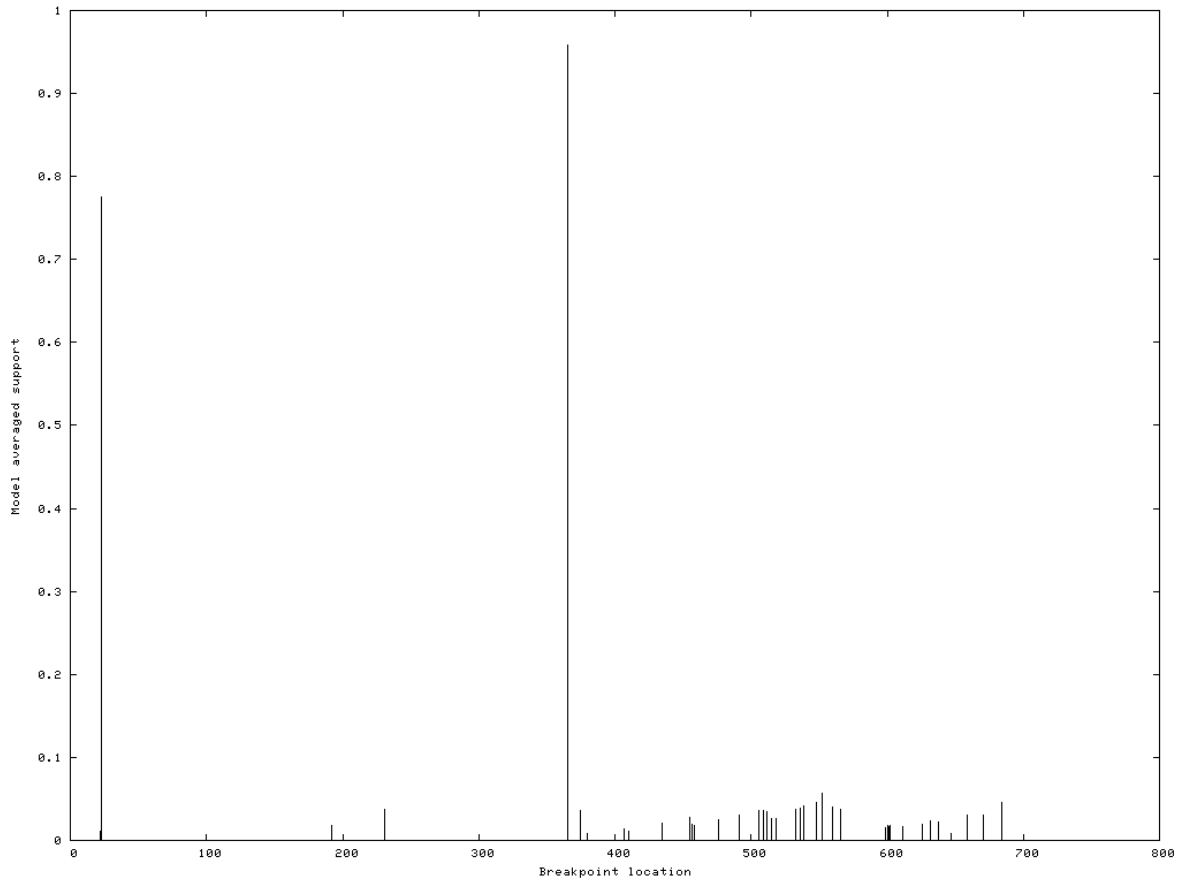


Figura 16. Determinación del punto de recombinación en HCV406 mediante GARD.

Este método permite estimar eventos de recombinación, si ocurrió alguno y en que posición del alineamiento es el o los eventos de recombinación. Se muestra en la gráfica el soporte estadístico para un evento de recombinación en función de la posición nucleotídica del alineamiento. Las secuencias utilizadas fueron obtenidas de la base de datos de Los Alamos y son las de referencia AF009606 y D11355.

Análisis de la variabilidad genética de las regiones p7 y NS4A en las muestras 406 y 409.

Se efectuó un primer análisis con las cepas de referencia de cada genotipo para las regiones p7 y NS4A a fin de establecer a qué genotipo pertenecían nuestras muestras. Los resultados establecieron que ambas cepas pertenecen al genotipo 1 subtipo 1a para ambas regiones (no mostrado).

Para el estudio de la variabilidad genética a nivel de los genes p7 y NS4A de las cepas provenientes de pacientes uruguayos coinfectados con VIH se utilizaron cepas 1a de diferentes regiones del mundo obtenidas de la base de datos LANL, y así observar su similitud con estirpes de otras regiones.

Enfocados en la región p7, los resultados (Figura 17) muestran que las cepas uruguayas se agrupan con cepas provenientes de Europa, más precisamente de Alemania y Francia, mientras que otras cepas de la región Sudamericana (Brasil) se agrupan con cepas de China y en un cluster aparte.

La región NS4A muestra resultados similares (Figura 18) a los correspondientes a p7 ya que las cepas estudiadas también se agrupan con estirpes provenientes de Alemania, aunque en este caso también en el mismo cluster se encuentran cepas de Estados Unidos, mientras que otras cepas 1a de la región Sudamericana nuevamente se agrupan separadas, tanto en un cluster aparte como con cepas australianas.

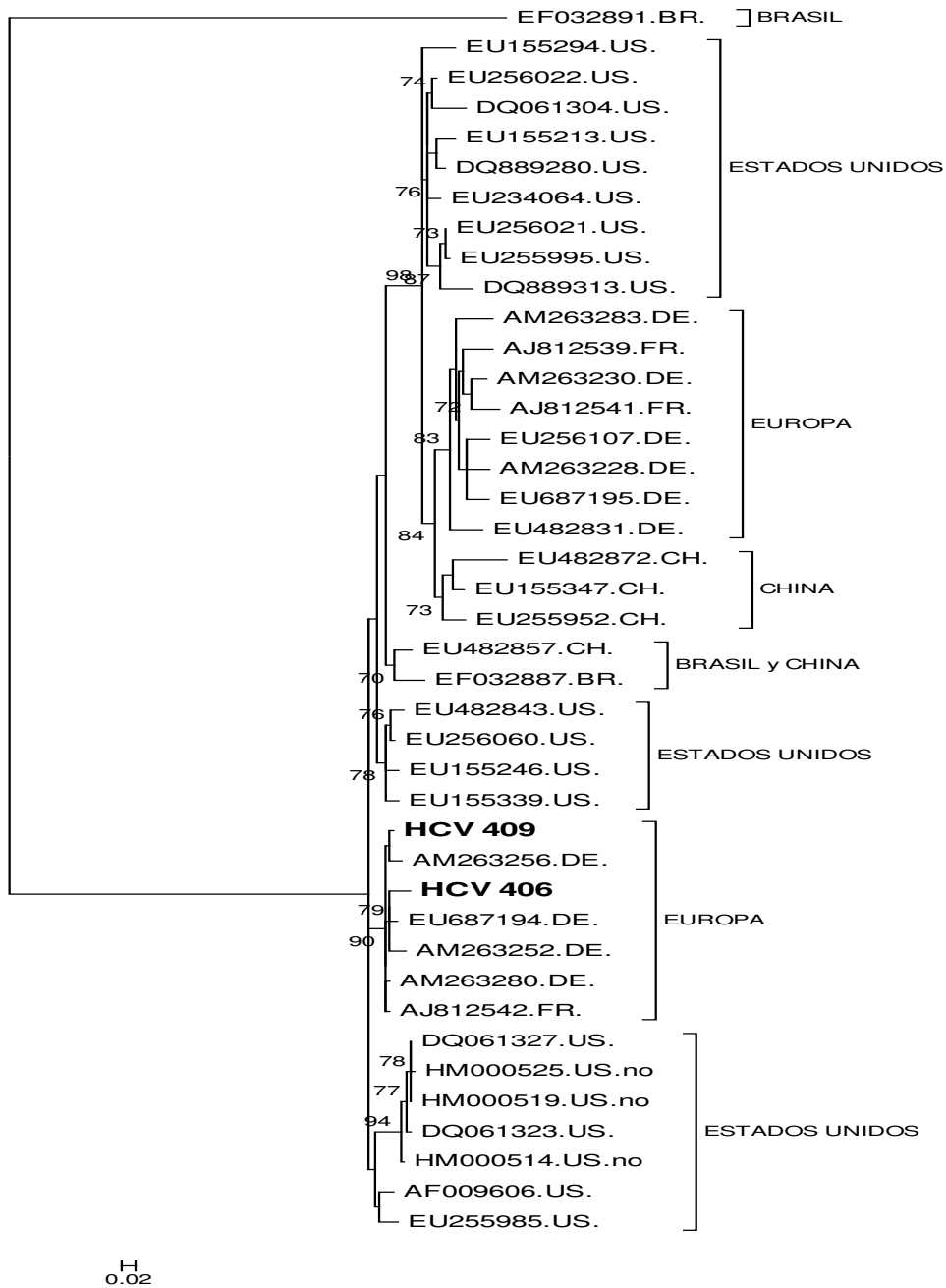


Figura 17. Estudio de la variabilidad genética de la región p7 de VHC en pacientes Uruguayos.

Árbol filogenético de máxima verosimilitud con el modelo GTR + γ con cepas de diferentes regiones del mundo. Las cepas se indican por su número de acceso, seguido por el código de dos letras del país y en caso que exista información sobre coinfección se indica al final con yes o no si la cepa proviene de un paciente coinfectado o si no lo hace respectivamente. Se muestran los valores de aLTR en los nodos mayores a 70.

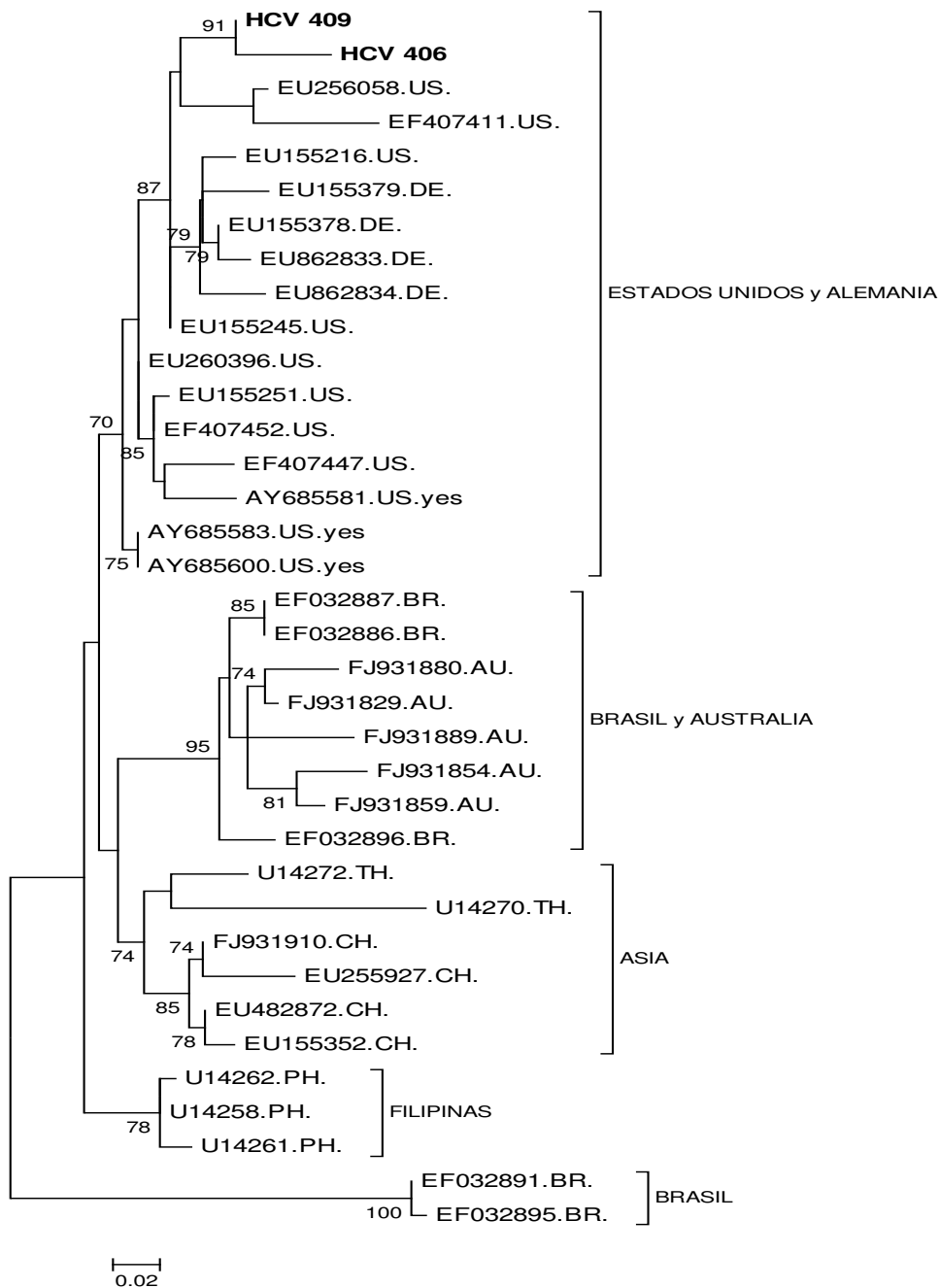


Figura 18. Estudio de la variabilidad genética de la región NS4A de VHC en pacientes Uruguayos.

Árbol filogenético de máxima verosimilitud con el modelo GTR + γ con cepas de diferentes regiones del mundo. Las cepas se indican por su número de acceso, seguido por el código de dos letras del país y en caso que exista información sobre coinfección se indica al final con yes o no si la cepa proviene de un paciente coinfectado o si no lo hace respectivamente. Se muestran los valores de aLTR en los nodos mayores a 70.

Análisis de firmas particulares en secuencias de la región hipervariable 1 de la proteína E2

Con el propósito de estudiar la existencia de una firma particular en la secuencia aminoacídica de la región hipervariable 1 de VHC que pudiera identificar a los pacientes coinfectados de aquellos que no lo son se realizó el análisis mediante el uso del programa VESPA (Viral Epidemiology Sequence Pattern Analysis) disponible en <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/P-vespa/vespa.html>.

Este estudio se realizó sobre todas las secuencias disponibles con información sobre coinfección con VIH del Banco de datos de LANL. Para ello un grupo de secuencias de la región hipervariable 1 de la proteína E2 pertenecientes a 97 cepas de VHC (genotipo 1a) aisladas de pacientes coinfectados con VIH fue analizado contra otro grupo de 46 secuencias aminoacídicas pertenecientes a cepas de VHC (genotipo 1a) aisladas de pacientes que no tenían coinfección con VIH.

Se encontraron diferencias en la composición de aa entre ambos grupos en nueve posiciones particulares (12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21 y 22) (Ver figura 19). Cuatro posiciones (12, 15, 20 y 22) mostraron una diferencia significativa entre pacientes coinfectados y no coinfectados. La comparación de las frecuencias obtenidas para cada posición aminoacídica correspondiente al patrón encontrado en ambos grupos se muestra en la figura 19. Como se puede observar en la figura 19, los pacientes no coinfectados se caracterizan por tener en la posición 12 de la secuencia de la proteína E2 una Glicina (G) como aminoácido más frecuente mientras que en los pacientes coinfectados se encuentra tan sólo en un 3%. Algo similar ocurre en la posición 15 donde el aminoácido más frecuente en los pacientes no coinfectados es una Treonina (T) mientras que se encuentra en tan solo un 3% de los pacientes coinfectados. En la posición 22 también se observa una marcada

diferencia entre pacientes no coinfectados donde el aminoácido mayoritario es una Leucina (L) mientras que se encuentra en el 8% de los pacientes coinfectados. La posición 20 de la región hipervariable 1, que se corresponde con la posición 20 de la proteína E2 presenta la mayor diferencia entre ambos grupos. En el caso de los pacientes coinfectados el aminoácido mayoritario es una Fenilalanina (F) con un 97% mientras que tan solo el restante 3% se corresponde con una Leucina (L) contrariamente a lo que se observa en los pacientes no coinfectados donde el aminoácido mayoritario es la Leucina con 67% y la Fenilalanina solamente 33%.

A)

Coinfectados -----TT-G-ASLFSP-----
 No coinfectados -----GA-T-VGFLTL-----

B)

Posición	Frecuencia de aa más frecuente en grupo de no Coinfectados	Frecuencia de aa más frecuente en grupo de Coinfectados	Cantidad de aa en grupo de no Coinfectados	Cantidad de aa en grupo de Coinfectados
12	0.522 G	0.629 T	5 A, 24 G, 1 I, 16 T	25 A, 3 G, 1 N, 4 P, 1 R, 2 S, 61 T
13	0.652 A	0.608 T	30 A, 15 T, 1 V 1 A, 17 G, 3 R, 1 S,	30 A, 2 M, 1 R, 59 T, 5 V 3 A, 67 G, 1 K, 5 R, 7 S,
15	0.522 T	0.691 G	24 T 13 A, 1 G, 2 S, 3 T,	3 T, 11 V
17	0.587 V	0.505 A	27 V	49 A, 1 S, 34 T, 13 V 3 A, 29 G, 15 K, 12 N, 6 R,
18	0.696 G	0.299 G, 0.299 S	1 D, 32 G, 3 N, 2 R, 8 S	29 S, 3 T
19	0.565 F	0.701 L	26 F, 2 I, 17 L, 1 M	16 F, 11 I, 68 L, 1 P, 1 T
20	0.674 L	0.969 F	15 F, 31 L 1 A, 3 N, 1 R, 14 S,	94 F, 3 L 8 A, 1 D, 1 E, 9 K, 7 N, 1 Q,
21	0.587 T	0.381 S	27 T 24 L, 15 P, 1 Q, 2 R,	1 R, 37 S, 32 T 1 A, 8 L, 51 P, 6 Q, 15 R,
22	0.522 L	0.526 P	3 S, 1 T	3 S, 12 T, 1 V

Figura 19. Resultados del VESPA.

A) Esquema la secuencia de la región hipervariable 1 de la proteína E2 y los cambios aminoacídicos entre los dos grupos analizados por el programa VESPA. Los guiones indican similitud, las letras corresponden a los cambios de aminoácidos y su código de una letra. B) La tabla muestra los aa más frecuentes para cada grupo en las posiciones diferentes (coinfectados y no coinfectados) , la frecuencia encontrada para los mismos, todos los aa encontrados en esas posiciones y su cantidad.

Discusión

Genotipificación de las muestras 406 y 409 mediante el análisis filogenético de las regiones 5'NCR y NS5B

Con el fin de determinar a que genotipos y subtipos virales pertenecen nuestras muestras, se procedió a estudiar regiones distantes entre sí. La región 5'NCR está en el extremo 5' terminal del genoma, mientras que el gen NS5B está en el extremo 3', siendo el último gen no-estructural de VHC.

La determinación del genotipo a través del estudio filogenético de la región 5'NCR indicó que ambas cepas pertenecen al genotipo 1 subtipo b, mientras que para la región NS5B pertenecen al genotipo 1 subtipo a. En cuanto al genotipo, los resultados están de acuerdo con el genotipo predominante en la región, (Bostan y Mahmood, 2010). Sin embargo, fue sorprendente descubrir que ambas muestras pertenecían a subtipos virales distintos según la región del genoma estudiada. Debido a esto se recomienda el estudio de varias regiones o el genoma completo para una asignación correcta del genotipo y subtipo.

El resultado de genotipado, entonces, otorgó resultados discordantes entre las regiones 5'NCR (1b) y la NS5B (1a), dando un indicio de un posible evento de recombinación. Los eventos de recombinación han sido reportados previamente para VHC, (Colina et al., 2004, Kalinina et al., 2003, Moreno et al., 2009), sin embargo aún no se habían observado en pacientes co-infectados con VIH.

Con el fin de confirmar la determinación de los genotipos y sus respectivos subtipos, se procedió al análisis por el método disponible en el [NCBI, Genotyping tool: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi). Este enfoque permite la visualización de las similitudes de cualquier parte de la

secuencia de consulta y, por tanto, es especialmente útil para el análisis de secuencias recombinantes (Rozanov et al., 2004).

En esta herramienta de genotipificación, una ventana se desliza a lo largo de la secuencia de consulta, y cada ventana se compara por BLAST con las secuencias de referencia para los subtipos de virus diferentes. Los resultados del BLAST para cada secuencia de referencia se representan con uno de los colores específicos de los subtipos que se proporcionan en el lado derecho de la gráfica. La "barra de subtipo" en la parte superior consta de rectángulos, uno para cada ventana de BLAST. Cada rectángulo se pinta con un color que corresponde a la mejor puntuación acumulada si ésta es superior a un límite establecido. El genotipo con la más alta calificación se muestra para cada ventana a medida que el ratón pasa sobre ella, ya sea en forma de descripción al lado del puntero, o como una etiqueta en la barra de estado, dependiendo del navegador. Debido a la presencia de colores similares o patrones de color para designar los diferentes subtipos, se recomienda que cuando el ratón pasa sobre la barra de subtipo, se preste atención a los valores de subtipo.

Estudio de eventos de recombinación en VHC en las muestras 406 y 409

Este resultado no es el esperado en primera instancia y podría deberse a una coinfección o a un evento de recombinación por lo que deben ser estudiadas con mayor profundidad para poder determinar de qué se trata. El estudio de otras regiones fue concordante con los resultados obtenidos para la región NS5B, agrupándose con las del subtipo 1a. En la región del Core ya se agrupan con las cepas de subtipo 1a por lo que se presume que si hay algún evento de recombinación sea en la región 5'NCR-Core.

Por este motivo se basó el análisis en esta parte del genoma.

A efectos de determinar la recombinación es necesario encontrar el punto aproximado donde las cepas parentales recombinaron para dar lugar a la nueva cepa recombinante. Para esto existen varios programas y métodos tanto para determinar si existe o no recombinación y algunos que determinan, en caso de que exista la misma, el punto aproximado en el cual se produjo la recombinación.

Debido a los resultados incongruentes de la genotipificación se procedió al estudio de eventos de recombinación. Es importante a la hora de realizar este tipo de estudios obtener la mayor secuencia del genoma, nuevamente el genoma completo sería el ideal, ya que es necesario encontrar el punto donde ocurrió la recombinación el cual es desconocido. De todas formas si se obtienen distintas regiones del genoma se puede aproximar en qué región es que se dio la misma y realizar el estudio enfocado en esa misma región del genoma. En este caso, la recombinación debería ser en la región comprendida entre la 5'NCR y el Core, ya que el estudio del genotipo en el Core otorgó como resultado que era subtipo 1a, por lo tanto ya a nivel de esta región los resultados son incongruentes.

A su vez el análisis a través del Genotyping Tool mostró indicios de recombinación y también lo aproximó a esta región del genoma.

Debido a esto, el estudio de recombinación se enfocó en este fragmento del genoma.

El análisis con el programa SimPlot, tanto el Simplot como el BootScan, evidenciaron la posible presencia de un evento de recombinación. Para confirmar este hecho, se analizaron ambas cepas por los métodos disponibles en Datamonkey, el SBP y el GARD, confirmando ambos métodos para ambos casos que existió un evento de recombinación. Estos resultados son coherentes con lo obtenido anteriormente, explicando la recombinación intratípica, las diferencias en el subtipo

observadas en distintas regiones del genoma. La recombinación es importante estudiarla ya que una incorrecta asignación del genotipo puede influir en la respuesta al tratamiento ya que ésta depende de cual genotipo es con el que se encuentra infectado el paciente.

En este caso, y al ser una recombinación intratípica del genotipo 1, el cual tiene mayor resistencia a la terapia antiviral que el resto, no presentaría grandes problemas ni diferencias en cuanto al tratamiento (el tratamiento para genotipo 1 difiere mínimamente entre subtipo 1a y 1b), ambos tienen una tasa muy baja de respuesta a la terapia, de todas formas sería interesante estudiar este tipo de pacientes en cuanto a su respuesta al tratamiento y la severidad de la enfermedad ocasionada.

A su vez es muy importante el estudio de recombinación en pacientes coinfectados con VIH ya que no se encontró en la literatura reportes de este tipo de eventos en pacientes coinfectados.

Análisis de la variabilidad genética de las regiones p7 y NS4A en las muestras 406 y 409.

Para establecer a qué linaje se encontraban emparentadas las cepas en estudio se realizó el análisis filogenético con cepas de diferentes zonas del mundo.

Ambas cepas fueron agrupadas con las pertenecientes a Europa, principalmente Alemania.

En el caso de p7 también se agruparon con cepas francesas. Se observó también que las cepas pertenecientes a Estados Unidos se agruparon en 3 clusters separados, un cluster separado con otras cepas de Alemania y Francia, otro perteneciente a cepas chinas y por último, otras cepas Sudamericanas provenientes de Brasil se agruparon con cepas chinas y en un cluster aparte.

Para la región NS4A, si bien se agruparon con cepas alemanas, también lo hicieron con cepas provenientes de Estados Unidos. Este cluster agrupó todas las cepas alemanas y estadounidenses junto a las uruguayas, nuevamente quedando por fuera del mismo las cepas brasileras. Se observa un cluster claramente asiático con cepas de China y Tailandia así como también otro con cepas de las Islas Filipinas. Las cepas brasileras se agruparon con cepas australianas y nuevamente también como cluster aparte.

Estos resultados muestran no solamente que las cepas dentro la región Sudamericana son muy variables sino que también se asemejan a cepas de diferentes regiones del mundo, según sean uruguayas o brasileras.

Análisis de firmas particulares en secuencias de la región hipervariable 1 de la proteína E2

Este análisis identifica sitios variables particulares en un alineamiento de nucleótidos o aminoácidos que son significativamente representativos en un determinado grupo en comparación con otro grupo de referencia.

El estudio de firmas particulares de secuencia de esta región, comparando cepas de pacientes coinfectados con otras de pacientes que no lo están otorgó como resultado que existen diferencias entre ambos grupos. Estas firmas pueden ser útiles a la hora de determinar coinfecciones y puede ser una posible explicación a la mayor severidad de la enfermedad en pacientes coinfectados o una evidencia de posibles interacciones entre los virus.

Las posiciones 12, 15, 20 y 22 fueron las que mostraron una marcada diferencia entre pacientes coinfectados y no coinfectados.

Los pacientes no coinfectados se caracterizaron por tener en la posición 12 de la secuencia de la proteína E2 una Glicina (G) como aminoácido más frecuente mientras que en los pacientes coinfectados el aminoácido

más frecuente es una Treonina (T), la glicina es un aminoácido hidrófobo mientras que la treonina es hidrofílico.

Contrariamente a lo que ocurre en la posición 12, en la posición 15 el aminoácido más frecuente en los pacientes no coinfectados es una Treonina (T) mientras que en los pacientes coinfectados es una Glicina (G). Conjuntamente ambos cambios se contrarrestarían dentro de la proteína.

En la posición 22 también se observa una marcada diferencia entre pacientes no coinfectados donde el aminoácido mayoritario es una Leucina (L) mientras que se encuentra en menos del 8% de los pacientes coinfectados siendo en estos pacientes una Prolina (P) el aminoácido mayoritario, si bien el cambio en el aminoácido es notorio, ambos aminoácidos son similares.

La posición 20 de la región hipervariable 1, que se corresponde con la posición 20 de la proteína E2 presenta la mayor diferencia entre ambos grupos. En el caso de los pacientes coinfectados el aminoácido mayoritario es una Fenilalanina (F) con un 97% mientras que tan solo el restante 3% se corresponde con una Leucina (L) contrariamente a lo que se observa en los pacientes no coinfectados donde el aminoácido mayoritario es la Leucina con 67% y la Fenilalanina solamente 33%. La fenilalanina es un aminoácido aromático mientras que la leucina es un aminoácido alifático. Esta posición es altamente informativa a la hora de hablar de coinfección o no.

Conclusiones

1- El genotipo para ambos pacientes otorgó resultados incongruentes entre distintas regiones del genoma, apoyando la idea de que para una correcta asignación del genotipo es recomendable la utilización de dos o más regiones diferentes del genoma

2- Se encontraron dos recombinantes en pacientes coinfectados con VIH, demostrando que en este tipo de pacientes la recombinación también es un mecanismo de diversidad

3- El estudio de las regiones p7 y NS4A de los pacientes uruguayos con estirpes de otras regiones del mundo nos indicó que las cepas uruguayas son similares a las que circulan en Europa, relacionándolas aún más con esas y no con otras que circulan en la región.

4- Se encontraron cuatro mutaciones diferenciales importantes entre cepas provenientes de pacientes coinfectados con otras de pacientes no coinfectados

5- La mutación, en los pacientes coinfectados, en la posición aminoacídica 20 de la proteína E2, dentro de la región hipervariable 1, podría estar indicando una posible interacción entre los virus a nivel de sus proteínas de superficie.

6- Se amplificó el 80% y se obtuvo el 50% de la secuencia de los genomas de ambas muestras.

Bibliografía

Alfonso V, Flichman DM, Sookoian S, Mbayed VA, Campos RH. Evolutionary study of HVR1 of E2 in chronic hepatitis C virus infection. *J Gen Virol*. 2004 Jan;85(Pt 1):39-46.

Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol*. 2006;44(1 Suppl):S6-9. Epub 2005 Nov 21.

Beran RK, Lindenbach BD, Pyle AM. The NS4A protein of hepatitis C virus promotes RNA-coupled ATP hydrolysis by the NS3 helicase. *J Virol*. 2009 Apr;83(7):3268-75. Epub 2009 Jan 19.

Bostan N, Mahmood T. An overview about hepatitis C: a devastating virus. *Crit Rev Microbiol*. 2010 May;36(2):91-133.

Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis*. 2005 Feb;25(1):105-17.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):359-62.

Colina R, Azambuja C, Uriarte R, Mogdasy C, Cristina J. Evidence of increasing diversification of hepatitis C viruses. *J Gen Virol*. 1999 Jun;80 (Pt 6):1377-82.

Colina R, Casane D, Vasquez S, García-Aguirre L, Chunga A, Romero H, Khan B, Cristina J. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2004 Jan;85(Pt 1):31-7.

Cook GA, Opella SJ. Secondary structure, dynamics, and architecture of the p7 membrane protein from hepatitis C virus by NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun;1808(6):1448-53. Epub 2010 Aug 18.

Cristina J, Colina R. Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. *Virol J*. 2006 Jun 30;3:53.

Cristina J, Lopez F, Moratorio G, López L, Vasquez S, García-Aguirre L, Chunga A. Hepatitis C virus F protein sequence reveals a lack of

functional constraints and a variable pattern of amino acid substitution. *J Gen Virol.* 2005 Jan;86(Pt 1):115-20.

Cristina J. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus in the Latin American region. *J Clin Virol.* 2005 Dec;34 Suppl 2:S1-7.

Cuthbert JA. Hepatitis C: progress and problems. *Clin Microbiol Rev.* 1994 Oct;7(4):505-32.

de Lamballerie X, Charrel RN, Attoui H, De Micco P. Classification of hepatitis C virus variants in six major types based on analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B genome regions and complete polyprotein sequences. *J Gen Virol.* 1997 Jan; 78 (Pt 1):45-51.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 1975 Apr 10;292(15):767-70.

Gates AT, Sarisky RT, Gu B. Sequence requirements for the development of a chimeric HCV replicon system. *Virus Res.* 2004 Mar 15;100(2):213-22.

Geitmann M, Dahl G, Danielson UH. Mechanistic and kinetic characterization of hepatitis C virus NS3 protein interactions with NS4A and protease inhibitors. *J Mol Recognit.* 2011 Jan;24(1):60-70.

Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jul 1;88(13):5547-51.

Hu KQ, Vierling JM, Redeker AG. Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2001 Jan;8(1):1-18.

Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK. Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroporin Activity. *MBio.* 2010 Nov 30;1(5). pii: e00265-10.

Kageyama S, Agdamag DM, Alesna ET, Leño PS, Heredia AM, Abellanosa-Tac-An IP, Jereza LD, Tanimoto T, Yamamura J, Ichimura H. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol.* 2006 Nov;78(11):1423-8.

Kaito M, Ishida S, Tanaka H, Horiike S, Fujita N, Adachi Y, Kohara M, Konishi M, Watanabe S. Morphology of hepatitis C and hepatitis B virus particles as detected by immunogold electron microscopy. *Med Mol Morphol*. 2006 Jun;39(2):63-71.

Kaito M, Watanabe S, Tanaka H, Fujita N, Konishi M, Iwasa M, Kobayashi Y, Gabazza EC, Adachi Y, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. *Int J Mol Med*. 2006 Oct;18(4):673-8.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*. 1994 Jul;75 (Pt 7):1755-60.

Kalinina O, Norder H, Magnius LO. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation. *J Gen Virol*. 2004 Jul;85(Pt 7):1853-7.

Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnius LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol*. 2002 Apr;76(8):4034-43.

Kamal SM. Hepatitis C virus genotype 4 therapy: progress and challenges. *Liver Int*. 2011 Jan;31 Suppl 1:45-52. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02385.x

Kim AY, Lauer GM. Pathogenesis of HIV-HCV Coinfection. *Curr Infect Dis Rep*. 2007 Jul;9(4):331-7.

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):362-4

Kurbanov F, Tanaka Y, Avazova D, Khan A, Sugauchi F, Kan N, Kurbanova-Khudayberganova D, Khikmatullaeva A, Musabaev E, Mizokami M. Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. *Hepatol Res*. 2008 Apr 22;38(5):457-464. Epub 2007 Nov 21.

Lai KW, Young KC, Cheng PN, Chen SH, Chang TT. Interspousal transmission of hepatitis C virus: application of comparing the variability

of HVR1 nucleotide region. *Hepatogastroenterology*. 2004 May-Jun;51(57):791-5.

Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, Pasquier C, Izopet J. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol*. 2007 Apr;81(8):4357-62. Epub 2007 Jan 31.

Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, Rice CM. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol*. 2007 Sep;81(17):8905-18. Epub 2007 Jun 20.

Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology, Knipe DM, Howley, PM (eds). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2001, 991-1042.

Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*. 2005 Aug 18;436(7053):933-8.

McCaffrey K, Gouklani H, Boo I, Pountourios P, Drummer HE. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *J Gen Virol*. 2011 Jan;92(Pt 1):112-21. Epub 2010 Oct 6.

Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol*. 1995 Oct;76 (Pt 10):2493-507.

Mindikoglu AL, Miller RR. Hepatitis C in the elderly: epidemiology, natural history, and treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Feb;7(2):128-34; quiz 124. Epub 2008 Dec 12.

Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Yamazaki C, Okamoto H, Tsuda F, Tanaka T, Mishiro S. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology*. 1992 Nov;16(5):1109-14.

Miyamura T, Matsuura Y. Structural proteins of hepatitis C virus. *Trends Microbiol*. 1993 Sep;1(6):229-31.

Mizokami M, Gojobori T, Ohba K, Ikeo K, Ge XM, Ohno T, Orito E, Lau JY. Hepatitis C virus types 7, 8 and 9 should be classified as type 6 subtypes. *J Hepatol.* 1996 May; 24(5):622-4.

Mohsen AH, Easterbrook P, Taylor CB, Norris S. Hepatitis C and HIV-1 coinfection. *Gut.* 2002 Oct;51(4):601-8.

Mondelli MU, Cerino A, Lisa A, Brambilla S, Segagni L, Cividini A, Bissolati M, Missale G, Bellati G, Meola A, Bruniercole B, Nicosia A, Galfrè G, Silini E. Antibody responses to hepatitis C virus hypervariable region 1: evidence for cross-reactivity and immune-mediated sequence variation. *Hepatology.* 1999 Aug;30(2):537-45.

Montserret R, Saint N, Vanbelle C, Salvay AG, Simorre JP, Ebel C, Sapay N, Renisio JG, Böckmann A, Steinmann E, Pietschmann T, Dubuisson J, Chipot C, Penin F. NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *J Biol Chem.* 2010 Oct 8;285(41):31446-61. Epub 2010 Jul 28.

Moreau I, Hegarty S, Levis J, Sheehy P, Crosbie O, Kenny-Walsh E, Fanning LJ. Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland. *Virol J.* 2006 Nov 15;3:95.

Moreno P, Alvarez M, López L, Moratorio G, Casane D, Castells M, Castro S, Cristina J, Colina R. Evidence of recombination in Hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virol J.* 2009 Nov 18;6:203.

Nelson DR. The role of triple therapy with protease inhibitors in hepatitis C virus genotype 1 naïve patients. *Liver Int.* 2011 Jan;31 Suppl 1:53-7. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02391.x.

Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol.* 2006 Aug;80(15):7569-77.

Operskalski EA, Kovacs A. HIV/HCV co-infection: pathogenesis, clinical complications, treatment, and new therapeutic technologies. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011 Mar;8(1):12-22.

Orlent H, Desombere I, Hansen B, Van Vlierberghe H, Haagmans B, De Knecht RJ, Schalm SW, Leroux-Roels G, Janssen HL; DITTO-HCV Study Group. Baseline anti-NS4a antibodies in combination with on-treatment quantitative HCV-RNA reliably identifies nonresponders to pegylated

interferon-ribavirin combination therapy after 4 weeks of treatment. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Dec;22(12):1443-8.

Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, Roudot-Thoraval F, Germanidis G, Bastie A, Darthuy F, Rémiré J, Soussy CJ, Dhumeaux D. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 1998 Apr;54(4):256-64.

Petta S, Craxi A. Optimal therapy in hepatitis C virus genotypes 2 and 3 patients. *Liver Int*. 2011 Jan;31 Suppl 1:36-44. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02382.x.

Phan T, Kohlway A, Dimberu P, Pyle AM, Lindenbach BD. The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly. *J Virol*. 2011 Feb;85(3):1193-204. Epub 2010 Nov 3.

Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet*. 1998 Oct 31;352(9138):1426-32.

Rosen HR, Gretch DR. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Mol Med Today*. 1999 Sep;5(9):393-9.

Rotman Y, Liang TJ. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. *J Virol*. 2009 Aug;83(15):7366-74. Epub 2009 May 6.

Rožanov M, Plikat U, Chappay C, Kochergin A, Tatusova T. A web-based genotyping resource for viral sequences. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W654-9.

Shiryaev SA, Chernov AV, Shiryaeva TN, Aleshin AE, Strongin AY. The acidic sequence of the NS4A cofactor regulates ATP hydrolysis by the HCV NS3 helicase. *Arch Virol*. 2011 Feb;156(2):313-8. Epub 2010 Oct 27.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG,

Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005 Oct;42(4):962-73.

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol*. 2004 Nov;85(Pt 11):3173-88.

Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. 2006;3(2):41-6. Epub 2006 Apr 1.

Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*. 1991 Mar;65(3):1105-13.

Tedbury P, Welbourn S, Pause A, King B, Griffin S, Harris M. The subcellular localization of the hepatitis C virus non-structural protein NS2 is regulated by an ion channel-independent function of the p7 protein. *J Gen Virol*. 2011 Apr;92(Pt 4):819-30. Epub 2010 Dec 22.

Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Aug;5(4):419-27.

Thomas DL, Villano SA, Riester KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH, Hollinger FB, Davenny K, Riley L, Diaz C, Tang HB, Quinn TC. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis*. 1998 Jun;177(6):1480-8.

Thomas DL, Vlahov D, Solomon L, Cohn S, Taylor E, Garfein R, Nelson KE. Correlates of hepatitis C virus infections among injection drug users. *Medicine (Baltimore)*. 1995 Jul;74(4):212-20.

Torriani FJ, Ribeiro RM, Gilbert TL, Schrenk UM, Clauson M, Pacheco DM, Perelson AS. Hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) dynamics during HCV treatment in HCV/HIV coinfection. *J Infect Dis*. 2003 Nov 15;188(10):1498-507. Epub 2003 Nov 13.

Touzet S, Kraemer L, Colin C, Pradat P, Lanoir D, Bailly F, Coppola RC, Saulea S, Thursz MR, Tillmann H, Alberti A, Braconier JH, Esteban JI, Hadziyannis SJ, Manns MP, Saracco G, Thomas HC, Trépo C. Epidemiology of hepatitis C virus infection in seven European Union countries: a critical analysis of the literature. HENCORE Group.

(Hepatitis C European Network for Co-operative Research. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Jun;12(6):667-78.

Vežali E, Aghemo A, Colombo M. A review of the treatment of chronic hepatitis C virus infection in cirrhosis. *Clin Ther*. 2010 Dec;32(13):2117-38.

Vieyres G, Dubuisson J, Patel AH. Characterization of antibody-mediated neutralization directed against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Gen Virol*. 2011 Mar;92(Pt 3):494-506. Epub 2010 Nov 17.

Vignuzzi M, Stone JK, Andino R. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res*. 2005 Feb;107(2):173-81.

Vo NV, Young KC, Lai MM. Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry*. 2003 Sep 9;42(35):10462-71.

Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*. 2001 May;7(5):710-21.

Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, Weinman SA. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog*. 2010 Sep 2;6(9):e1001087.

Xiu BS, Feng XY, He J, Wang GH, Zhang XY, Zhang HQ, Song XG, Chen K, Ling SG, Zhu CX, Wei L, Rao HY. Evaluation of cross-reactive antibody response to HVR1 in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2010 Sep 21;16(35):4460-6.

Young KC, Lindsay KL, Lee KJ, Liu WC, He JW, Milstein SL, Lai MM. Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology*. 2003 Oct;38(4):869-78.

Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Mauss S, Wedemeyer H, Sarrazin C, Hueppe D, Zehnter E, Manns MP. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2009 Feb;16(2):75-90. Epub 2008 Aug 28.