

Tesis de Maestría

PEDECIBA - Área: Biología – Sub-área: Biología celular y
Molecular.

Variabilidad genética de la región NS3 del genoma de Hepatitis C en pacientes uruguayos

Gabriela Natividad Betancour Curutchet

Orientador de Tesis: Dra. Pilar Moreno.

Co-orientador de Tesis: Dr. Juan Cristina.

Laboratorio de ejecución: Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias.

Montevideo – Uruguay

Julio de 2018

Variabilidad genética de la región NS3 del genoma de Hepatitis C en pacientes uruguayos

Gabriela Natividad Betancour Curutchet

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado de PEDECIBA en el Área Biología,
Sub-área Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de La
República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magister
en Ciencias Biológicas.

Integrantes del tribunal de defensa de tesis:

Dra. Yanina Panzera,

Dr. Fernando López Tort

Dr. Santiago Mirazo

Montevideo – Uruguay

Julio de 2018

A mi madre, quien me enseñó que la vida es alma, corazón y lucha.

Agradecimientos

Tras haber finalizado esta gran etapa de formación profesional y crecimiento personal, los agradecimientos son necesarios y muy sentidos.

Primeramente, quiero agradecer al Dr. Juan Cristina por darme la posibilidad de desarrollar mi trabajo de maestría en el Laboratorio de Virología Molecular, laboratorio que genera gran orgullo para mí a nivel científico y en el cual recibí calidez día a día.

Agradecer enormemente a la Dra. Pilar Moreno, mi orientadora, por compartir juntas este camino y guiarme por él, por estar siempre, por los consejos, los intercambios y la paciencia.

A Natalia Echeverría, quien supo acompañarme en mi formación profesional, donde ha sido un gran ejemplo, pero también así en la parte humana, siempre con un consejo, siempre justa.

Al grupo humano del Laboratorio de Virología Molecular, las y los del comienzo de esta historia, la familia actual del LVM, el hermoso grupo humano de siempre (Naty Echeverría, Álvaro, Martín, Pato, Vicky, Sabri, Fabián, Nati Larnaudie, Fabi, Pili, Gonza), quienes me han acompañado en el camino, sinuoso, de confiar en mi crecimiento personal.

Al MSc. Martín Sónora por el trabajo conjunto realizado para esta tesis. Al MSc Darío Porley por su tiempo dedicado para poder desarrollar de mejor manera parte de mi trabajo.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, quién me benefició con la beca de maestría e hizo de este modo a la facilidad para culminar mi trabajo.

A los integrantes del tribunal de defensa de tesis por haber aceptado corregir este trabajo, por su tiempo y dedicación: Dra. Yanina Panzera, Dr. Fernando López Tort y Dr. Santiago Mirazo.

A las y los amigos del camino y de siempre. A las amigas a las que la vida nos hizo fuertes juntas. A Elisa. A las y los amigos que la vida me dio para crecer, los que mí querida Facultad de Ciencias me dio, a las y los que además de amigos son compañeros de lucha todos los días y que codo a codo vamos por un mundo mejor.

A mi familia, a pesar de los tiempos y las distancias.

A mi madre, mi compañera incondicional en la vida, a quien más amo.

Resumen

El virus de la Hepatitis C (VHC), principal agente causante de hepatitis post-transfusionales, parenteralmente adquiridas y esporádicas no A no B, genera cronicidad (80% de los casos), cirrosis (5-20%) y hepatocarcinoma (1-5%), por lo que es una de las indicaciones más frecuentes de trasplante de hígado. Actualmente, el tratamiento involucra nuevas drogas directas cuyos blancos son proteínas virales (DAAs–*Direct Acting Agents*): la serín-proteasa NS3/4A, la polimerasa NS5B o la fosfoproteína NS5A. En Uruguay, el Fondo Nacional de Recursos ha aprobado algunas de estas drogas para su uso, sin embargo, la gran mayoría no están financiados.

VHC se caracteriza por su alta variabilidad genética, donde su alta tasa mutacional hace que el virus circule, como una nube de variantes genéticas estrechamente relacionadas denominada cuasiespecie. Esto dificulta encontrar estrategias antivirales efectivas, dada la presencia y emergencia de variantes asociadas a resistencia en pacientes naïve a DAAs.

Teniendo presente lo antedicho, el objetivo de esta tesis fue el estudio de la variabilidad genética de la región del genoma de VHC que codifica para la proteasa NS3 en pacientes infectados crónicamente y naïve al tratamiento con DAAs. Para abordar este objetivo se realizaron, en una primera instancia, estudios filogenéticos con el fin de genotipificar las cepas virales analizadas en este trabajo, así como la búsqueda de alguna firma de secuencia que pudiera caracterizar a nuestras muestras. Posteriormente, se realizó la búsqueda de sustituciones de resistencia (RASs) tanto en la secuencia consenso como en variantes de baja frecuencia dentro de la cuasiespecie. Se analizaron por mapeo en la estructura secundaria y terciaria de NS3 aquellas sustituciones presentes en las muestras uruguayas pero que no habían sido previamente asociadas a resistencia y posteriormente se realizaron análisis por *docking* molecular de sustituciones de interés.

Los resultados obtenidos muestran que de los 15 pacientes analizados en este trabajo, 13 se encontraban infectados con VHC subtipo 1a y 2 con subtipo 1b, constatándose la existencia de una firma de secuencia que podría indicar la diversificación local de VHC. A nivel de secuencia aminoacídica, se observó una gran conservación de la tríada catalítica y de la región de interacción con el Zn y con el cofactor NS4A. Por otra parte, se observó la presencia de RAS a inhibidores de NS3 en el 26,6% de los pacientes analizados. Respecto a

la diversidad de las cuasiespecies, se encontraron variantes con diversas sustituciones, encontrándose una única variante que portaba una RAS (R123G, resistencia a Asunaprevir). Esta sustitución fue utilizada para los estudios de *docking* molecular a fin de determinar su posible efecto en la unión de NS3 al Paritaprevir, evidenciando así que esta herramienta podría ser útil como *screening* inicial de RASs.

Palabras clave: DAAs, NS3, RASs.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV), the main causative agent of post-transfusional, parenterally acquired and sporadic non-A non-B hepatitis, generates chronicity (80% of cases), cirrhosis (5-20%) and hepatocellular carcinoma (1-5%), reason why it is one of the most frequent indications for liver transplantation. At present, the treatment involves new direct-acting antiviral agents (DAAs) that target viral proteins: the NS3/4A serine protease, the NS5B polymerase or the NS5A phosphoprotein. In Uruguay, a few DAAs are approved and the vast majority is not subsidized.

HCV is characterized by its high genetic variability and, due to the high mutational rate, the virus circulates as a cloud of closely related genetic variants named quasispecies. This feature makes it difficult to find effective antiviral strategies, due to the presence and emergence of resistance associated variants in DAAs naïve patients.

Considering all the above, the objective of this thesis was to study the genetic variability of the HCV genome region that codes for the NS3 protease in chronically infected DAA treatment naïve patients. To address this objective, phylogenetic studies were performed in order to genotype the isolates, substitutions were mapped in the secondary and tertiary structure of NS3, a search for sequence signatures of Uruguayan strains was carried out, resistance associated substitutions (RASs) present as low frequency variants within the quasispecies were found by cloning of a partial region of NS3 subtype 1a, and subsequent analysis by molecular docking were performed with variants of interest.

The results obtained show that 13 patients were infected with HCV subtype 1a and 2 with HCV subtype 1b. At a sequence level, a great conservation of the catalytic triad and the contact region with the Zn ion and with the NS4A cofactor was observed. 26,6% of the patients presented RASs to NS3 inhibitors. Additionally, a sequence signature pattern (subtype 1a) was found, that might suggest a local diversification of HCV. Regarding quasispecies diversity, several substitutions were found among which there was only one RAS (R123G conferring resistance to Asunaprevir), which, by molecular docking studies, suggested to affect Paritaprevir binding and proved that this tool could be a useful one for initial screening of RASs.

Keywords: DAAs, NS3, RASs.

Lista de tablas

Tabla 1 – Datos de los pacientes	31
Tabla 2 – <i>Primers</i> utilizados para la amplificación y secuenciación de NS3	36
Tabla 3 – Sustituciones aminoacídicas en la región NS3 de VHC, asociadas a resistencia a DAAs, encontradas en pacientes uruguayos naïve al tratamiento	55
Tabla 4 – Sustituciones aminoacídicas en la región NS3 de VHC, no reportadas <i>a priori</i> como resistentes a DAAs, encontradas en pacientes uruguayos naïve al tratamiento	58
Tabla 5 – Resultados de las medidas evaluadas en las distintas etapas de análisis por <i>docking</i> molecular	81

Lista de figuras

Figura 1 – Modelo de la partícula de VHC	5
Figura 2 – Árbol filogenético de una región parcial que codifica para la polimerasa de miembros representativos de los cuatro géneros de la familia <i>Flaviviridae</i>	7
Figura 3 – Organización del genoma de VHC y procesamiento de la poliproteína.....	9
Figura 4 – Estructura del dominio proteasa de NS3 en un complejo con el cofactor NS4A y un sustrato peptídico.....	11
Figura 5 – Cuasiespecies virales.....	13
Figura 6 – Árbol filogenético de la región codificante del genoma de VHC.....	15
Figura 7 – Genoma de VHC y blancos de las nuevas drogas antivirales directas...	21
Figura 8 – Esquema de la localización de los <i>primers</i> utilizados para la amplificación de la región que codifica para la proteasa NS3 de VHC...	35
Figura 9 – Estructura del vector pGEM®-T <i>Easy</i> (Promega).....	42
Figura 10 – Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de PCR de NS3.....	49
Figura 11 – Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región NS3 del genoma de VHC.....	51
Figura 12 – Representación del análisis de patrón de firma de secuencia (VESPA) por Weblogo.....	53
Figura 13 – Análisis de las secuencias aminoacídicas de las secuencias subtipo 1a utilizando el programa ESPript 3.0.....	59
Figura 14 – Mapeo de las sustituciones, no asociadas <i>a priori</i> con resistencia, encontradas en la proteasa NS3 de las cepas de VHC uruguayas.....	60
Figura 15 – Mapeo de las sustituciones marcadas como de interés en la proteasa NS3 de las cepas de VHC uruguayas.....	61
Figura 16 – Mapeo de sustituciones en la región de interacción con APOBEC3G, cercanas al sitio de unión al Zn y al sitio de unión a NS4A.....	63

Figura 17 – Estudio de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 624.....	67
Figura 18 – Estudio de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 983.....	68
Figura 19 – Estudio de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 1019.....	69
Figura 20 – Representación de la distribución de las sustituciones en las cuasiespecies de las muestras	70
Figura 21 – Análisis de escalamiento multidimensional de las variantes de la cuasiespecie de las tres cepas subtipo 1a seleccionadas.....	72
Figura 22 – Análisis de escalamiento multidimensional de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 624.....	72
Figura 23 – Análisis de escalamiento multidimensional de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 983.....	73
Figura 24 – Análisis de escalamiento multidimensional de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 1019.....	73
Figura 25 – Mapeo de las sustituciones halladas en clones de la muestra 624.....	74
Figura 26 – Mapeo de las sustituciones halladas en clones de la muestra 983.....	75
Figura 27 – Mapeo de las sustituciones halladas en clones de la muestra 1019.....	76
Figura 28 – Estructura del inhibidor macrocíclico de la proteasa NS3 de tercera generación Paritaprevir, componente del pack comercial Viekira.....	77
Figura 29 – <i>Docking</i> molecular entre la estructura de NS3 4A92 sin mutaciones y el Paritaprevir.....	78
Figura 30 – <i>Docking</i> molecular entre la estructura de NS3 4A92 con la mutación D168Y y el Paritaprevir.....	79
Figura 31 – <i>Docking</i> molecular entre la estructura de NS3 4A92 con la sustitución de interés R123G y el Paritaprevir.....	80

Lista de abreviaturas y siglas

aa – aminoácido

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADNc – ADN complementario

ALT – aminotransferasas

APOBEC3G – *Human cellular protein apolipoprotein B messenger RNA (mRNA)-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*

ARN – Ácido Ribonucleico

ASV – Asunaprevir

BOC – Boceprevir

DAA – *Direct Acting Agents*

DEPC – dietilpirocarbonato

dATP – desoxiadenosina trifosfato

dNTP(s) – desoxinucleótido(s) trifosfato

DSV – Dasabuvir

DTT – ditiotreitól

FDA – *Food and Drug Administration*

FDV – Faldaprevir

FNR – Fondo Nacional de Recursos

G1 – Genotipo 1

G2 – Genotipo 2

G3 – Genotipo 3

G4 – Genotipo 4

G5 – Genotipo 5

G6 – Genotipo 6

GBV-B – GB Virus B

GTR+I+ γ – *General Time Reversible* + sitios invariables + distribución gamma

GZV – Grazoprevir

IFN β – Interferón beta

IFN-alfa-peg – Interferón alfa pegilado

IP – inhibidor de la proteasa

IPTG – isopropil-beta-D-tiogalactósido

IRES – Sitio Interno de Entrada al Ribosoma

LB – Medio de cultivo Luria Bertani

LDL – Lipoproteínas de baja densidad

LDV – Ledipasvir

μ g – microgramo

μ l – microlitros

μ M – micromolar

mM – milimolar

MAVS – *mitochondrial antiviral signaling protein*

MDS – Análisis de escalamiento multidimensional

min – minuto

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ng – nanogramo

nm – nanómetro

NCR – región no codificante

nt – nucleótidos

OBV – Ombitasvir

pb – pares de bases

PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDB – *Protein Data Bank*

PTV – Paritaprevir

RIG-I – *Retinoic acid - Inducible Gene I*

RAPs – *Resistance Associated Polymorphism*

RASs – *Resistance Associated Substitutions*

RAVs – *Resistance Associated Variants*

RBV – ribavirina

rpm – revoluciones por minuto

RT – Retrotranscripción

RVS – respuesta virológica sostenida

SMV – Simeprevir

SOF – Sofosbuvir

TAE – Buffer Tris-acetato-edta

TLR3 – *Toll like receptor 3*

TVR – Telaprevir

TRIF – *Toll/interleukin-1 receptor resistance domain-containing adaptor-inducing IFN protein*

U – unidades

USA – Estados Unidos

VESPA – *Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis*

VHC – Virus de la Hepatitis C

VIH – Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida

VLDL – Lipoproteínas de muy baja densidad

VOX – Voxilaprevir

X-gal – 5-bromo 4-cloro 3-indolil beta D galactósido

Zn – Zinc

Tabla de contenidos

1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades.....	2
1.1.1 Epidemiología.....	2
1.1.2 Transmisión de VHC.....	2
1.1.3 Patogénesis de VHC	3
1.1.4 El virus de VHC.....	5
1.1.5 Clasificación	6
1.1.6 El genoma viral y sus proteínas.....	8
1.2 La proteína NS3.....	10
1.3 Variabilidad genética.....	12
1.3.1 Mutación y cuasiespecies virales.....	12
1.3.2 Recombinación.....	14
1.3.3 Genotipos.....	15
1.4 Prevención y tratamiento	17
1.5 Emergencia de variantes resistentes a DAAs	22
1.5.1 RASs a inhibidores de NS3.....	23
2. Hipótesis de trabajo.....	26
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo general.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. Materiales y métodos.....	30
4.1 Muestras.....	31
4.2 Extracción de ARN.....	32
4.3 Retrotranscripción.....	32
4.4 Amplificación por PCR de la región genómica que codifica para NS3.....	32
4.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	37
4.6 Purificación de los productos de PCR.....	37
4.7 Secuenciación de los productos de PCR.....	37
4.8 Genotipificación de VHC.....	38
4.9 Análisis de firmas de secuencia.....	38
4.10 Análisis de sustituciones en NS3 a nivel de la secuencia consenso.....	39
4.11 Estudio de la diversidad de las cuasiespecies de NS3 de genotipo 1a por clonado.....	40
4.11.1 Adenilación.....	40
4.11.2 Ligación en el vector <i>pGEM®-T Easy</i>	41
4.11.3 Transformación y plaqueo.....	42
4.11.4 Extracción plasmídica por Miniprep.....	44
4.11.5 PCR para verificar inserto	44
4.11.6 Análisis de mutaciones en NS3 de las variantes de las cuasiespecies	44
4.11.7 Análisis de escalamiento multidimensional (MDS).....	45
4.12 Análisis de localización de las sustituciones encontradas en la estructura	

de NS3 de VHC.....	45
4.13 <i>Docking</i> molecular.....	46
5. Resultados	48
5.1 Puesta a punto de la amplificación de la región genómica que codifica para NS3 del genoma de VHC.....	49
5.2 Variabilidad genética de NS3.....	50
5.3 Búsqueda de firmas de secuencias en las cepas uruguayas a nivel de la proteína NS3.....	52
5.4 Análisis de sustituciones halladas en las secuencias consenso de la región NS3 de cepas de VHC uruguayas.....	53
5.4.1 Sustituciones Asociadas a Resistencia (RASs).....	54
5.4.2 Polimorfismos Asociados a Resistencia (RAPs).....	55
5.4.3 Sustituciones no asociadas <i>a priori</i> a resistencia a DAAs.....	56
5.4.4 Localización de las sustituciones encontradas en el subtipo 1a en la estructura de NS3 de VHC.....	57
5.4.4.1 Análisis de localización de las sustituciones en la estructura secundaria.....	57
5.4.4.2 Análisis de localización de las sustituciones en la estructura Terciaria de NS3.....	60
5.5 Estudio de la diversidad de las cuasiespecies de NS3 de genotipo 1a.....	64
5.5.1 Análisis de la variabilidad genética por clonado.....	64
5.5.2 Análisis de escalamiento multidimensional (MDS).....	71
5.5.3 Mapeo de sustituciones encontradas en variantes de las cuasiespecies de muestras subtipo 1a en la estructura 3D de NS3 de VHC	74
5.6 Análisis de <i>docking</i> de las sustituciones de interés en NS3 de VHC	76
6. Discusión.....	82
Variabilidad genética y firma de secuencia encontradas en la región NS3 de cepas de VHC uruguayas	83
Análisis de sustituciones en la región NS3 de las cepas uruguayas: RASs, RAPs y sustituciones no asociadas <i>a priori</i> a resistencia	85
Análisis de localización de las sustituciones encontradas en cepas de VHC subtipo 1a, no reportadas <i>a priori</i> como resistentes, en la estructura secundaria y terciaria de NS3 de VHC.....	93
Estudio de la diversidad de las cuasiespecies de NS3 de genotipo 1a.....	95
Estudios de <i>Docking</i> molecular.....	98
7. Conclusiones.....	101
8. Perspectivas.....	104
9. Bibliografía.....	106
10. Apéndice.	123

Tabla Suplementaria 1 - Número de acceso de las secuencias de NS3 de VHC representativas de cada genotipo utilizadas para realizar el árbol filogenético	124
Tabla Suplementaria 2 - Secuencias de NS3 utilizadas para generar la secuencia 1a consenso mundial, referencia de los análisis de sustituciones	126
Tabla Suplementaria 3 - Secuencias de NS3 utilizadas para generar la secuencia 1b consenso mundial, referencia de los análisis de sustituciones	128
Tabla Suplementaria 4 - <i>Accession numbers</i> de las secuencias de NS3 de VHC utilizadas en el análisis de VESPA	130
Figura Suplementaria 1 - Cromatograma de la secuenciación poblacional (consenso) de la muestra 983	133
Publicación científica	134

1. Introducción

1.1 Generalidades

1.1.1 Epidemiología

El virus de la Hepatitis C (VHC) es miembro del género *Hepacivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae* y es considerado el principal agente causante de hepatitis post-transfusional, parenteralmente adquiridas y de Hepatitis esporádicas no A no B en todo el mundo (Kuo et al., 1989). Actualmente, se estima que existen aproximadamente 71 millones de personas crónicamente infectadas por este virus (WHO, 2017).

En el 80% de los casos la infección por este virus genera una infección crónica que puede desencadenar cirrosis (5-20%) y hepatocarcinoma (1-5%), por lo que se ha convertido en una de las indicaciones más frecuentes para el trasplante de hígado (Hoofnagle, 2002; Pawlotsky, 2003; Simmonds, 2004).

La hepatitis C es prevalente en todo el mundo, siendo las regiones más afectadas las del Mediterráneo Oriental y Europa con una prevalencia del 2,3% y 1,5%, respectivamente. La prevalencia de la infección por VHC en otras regiones oscila entre el 0,5% y el 2,0%, siendo de 1,0% la reportada para la región de las Américas (WHO, 2017). Particularmente, para el caso de América del Sur la prevalencia se encuentra entre el 1,2% y 1,6% (Dirchwolf et al., 2016).

En Uruguay no existen datos sobre la prevalencia de la infección por VHC en la población general. Los datos estimados en Bancos de Sangre muestran una prevalencia del 0,31% al año 2015 (PAHO, 2017), pudiendo incrementar a 10,1% entre usuarios de drogas intravenosas (Osimani et al., 2005).

1.1.2 Transmisión de VHC

La principal vía de transmisión de este virus es la exposición directa o indirecta con sangre contaminada (transfusiones de sangre o sus hemoderivados, consumo de drogas por vía intravenosa, empleo de material quirúrgico mal esterilizado, trasplante de órganos, accidentes laborales en centros de salud, transmisión vertical de madre a hijo, etc.) (WHO, 2017).

Si bien la transmisión sexual no ha sido bien documentada, se estima que el riesgo de transmisión por esta vía es de 0-0,6% por año en parejas con relación de monogamia por largos períodos de tiempo y del 1% por año en aquellas con varias parejas (Terrault et al., 2013).

1.1.3 Patogénesis de VHC

El VHC infecta preferentemente células hepáticas pero, a pesar de ser este el sitio principal de replicación, existen evidencias de reservorios extrahepáticos. Se han encontrado partículas virales de VHC en células mononucleares periféricas así como en células del bazo, el intestino, el páncreas, el corazón, los riñones, el cerebro, los ganglios linfáticos, las células dendríticas y los linfocitos B y T. (Bürgel et al., 2011; Russelli et al., 2017).

En la mayoría de los pacientes con infección aguda no se observan síntomas clínicos. Durante esta fase casi todos los pacientes desarrollan una fuerte respuesta inmune humoral y celular que no consigue evitar la infección y es una de las causas del daño hepático. Este daño es debido, principalmente, a la destrucción masiva de células hepáticas por el continuo ciclo de replicación y liberación del virus y por el ataque del sistema inmune contra las células infectadas. Los niveles de aminotransferasas (ALT) en suero, indicativos del daño a los hepatocitos, aumentan entre la segunda y octava semana tras la exposición. La hepatitis C aguda puede ser grave y prolongada, pero raramente fulminante. En algunos casos, la infección remite por sí sola, los síntomas duran varias semanas y desaparecen conforme caen los niveles de ALT y del genoma viral (Farci et al., 1996; Hoofnagle, 2002; Rosen & Gretch, 1999).

No obstante, el 80% de los pacientes infectados suelen desarrollar hepatitis crónica. Esta cronicidad está marcada por la persistencia del genoma viral durante al menos seis meses después del establecimiento de la enfermedad. En este estadio tampoco se presentan síntomas específicos, sino que suelen aparecer dolores abdominales, fatiga, dolor muscular y dolor en las articulaciones (Hoofnagle, 2002; WHO, 2017).

Dentro del grupo de enfermos infectados crónicamente con VHC, entre un 5-20% llegan a padecer cirrosis y entre un 1-4% pueden sufrir hepatocarcinoma. Debido a que la cirrosis

puede tardar varios años en desarrollarse, la infección con VHC puede permanecer silenciosa durante décadas. Por tanto, los individuos infectados, en la mayor parte de los casos, suelen desconocer su estado durante largos períodos de tiempo y la enfermedad es detectada con frecuencia en análisis de sangre rutinarios (por niveles elevados de enzimas hepáticas) o en donaciones de sangre (Hoofnagle, 2002; Pawlotsky, 2003; Rosen & Gretch, 1999; Simmonds, 2004).

Distintos factores, tanto virales como del hospedero, pueden aumentar la severidad y/o disminuir el tiempo de progresión de la enfermedad. Los factores virales que pueden influir en la progresión de la enfermedad son los altos niveles de viremia y la infección con determinados tipos virales (genotipos, ver sección 1.3.3; genotipo 1) (Bostan & Mahmood, 2010; Pozzato et al., 1991; Yuki, Hayashi & Kamada, 1993). Por otra parte, se ha intentado establecer la relación entre la complejidad de la cuasiespecie y el daño hepático, progresión a cirrosis, hepatocarcinoma y manifestaciones extrahepáticas, sin obtenerse resultados concluyentes (Fishman & Branch, 2009). Entre los factores del hospedero asociados con la progresión de la enfermedad se encuentran: un sistema inmune comprometido, sexo masculino, avanzada edad al momento de la infección, alto consumo de alcohol y coinfección con hepatitis B y VIH (Björro et al., 1994; Bostan & Mahmood, 2010; Domingo & Gomez, 2007; Martin et al., 1989; Nalpas et al., 1992; Takase et al., 1993; Weltman et al., 1995).

La infección crónica por VHC se caracteriza además por varias manifestaciones extrahepáticas que incluyen enfermedades hematológicas como la crioglobulinemia, el linfoma, trastornos autoinmunitarios como tiroiditis, enfermedad renal o síndromes dermatológicos como porfiria cutánea, enfermedades cardiovasculares, síndromes metabólicos como diabetes y enfermedades del sistema nervioso. Esta amplia gama de enfermedades no hepáticas implica un tropismo de VHC más complejo, que se extiende a los tejidos extrahepáticos y aún no ha sido dilucidado por completo (Bürgel et al., 2011; Russelli et al., 2017).

1.1.4 El virus de VHC

El VHC es un virus pequeño, envuelto, con un genoma de ARN de simple hebra de polaridad positiva. La partícula viral, que tiene entre 40 y 70 nm de diámetro, se encuentra conformada por las proteínas estructurales E1 y E2, las cuales se encuentran ancladas a la bicapa lipídica derivada del hospedero. Esta bicapa se encuentra recubriendo a la nucleocápside compuesta por las proteínas del core y conteniendo al genoma viral en su interior (Figura 1).

Este virus circula de distintas formas dentro del hospedero infectado; puede circular asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), unido a inmunoglobulinas o como viriones libres (Moradpour, Penin & Rice, 2007).

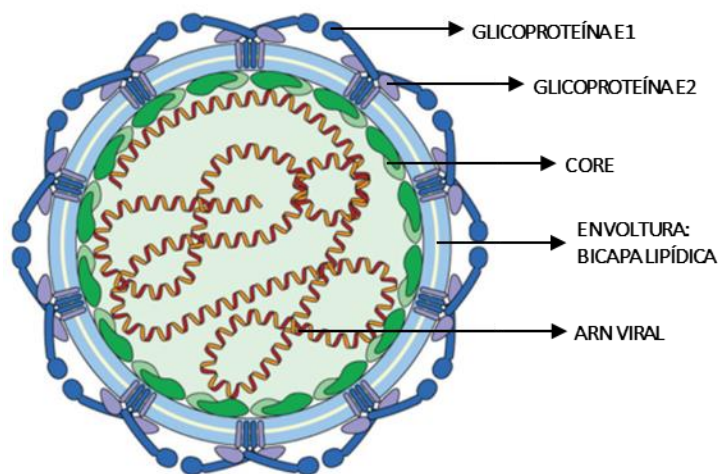


Figura 1. Modelo de la partícula de VHC. Se muestra la bicapa lipídica, las glicoproteínas E1 y E2 y la nucleocápside que contiene la proteína del core junto al ARN viral (Modificado de Lindenbach & Rice, 2013).

1.1.5 Clasificación

El VHC es el miembro modelo del género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. El segundo miembro de este género, el GB virus B (GBV-B), fue identificado en el año 1995, siendo altamente divergente en secuencia respecto a VHC. Este virus fue descrito en tamarinos, en los cuales genera infecciones agudas y una patología hepática comparable con la de VHC en humanos (Simmonds, 1995). Muchos otros hepacivirus han sido descritos recientemente infectando monos colobos, varios roedores y especies de murciélagos, ganado europeo y africano, caballos y burros (Baechlein et al., 2015; Burbelo et al., 2012; Corman et al., 2015; Drexler et al., 2013; Firth et al., 2014; Kapoor et al., 2013; Quan et al., 2013; Sibley et al., 2014).

La familia *Flaviviridae* incluye también a los géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Pegivirus*. Dentro de estos géneros es importante destacar el género *Flavivirus*, el cual incluye virus de gran importancia para la salud humana como lo son el virus de la fiebre amarilla, el virus del zika, el virus *west nile* y el virus dengue, entre otros (Figura 2) (Bukh, 2016).

Todos los virus de esta familia se caracterizan por poseer genomas de ARN de simple cadena de sentido positivo con una organización genómica similar, sirviendo estos ARN directamente como ARN mensajeros en la célula hospedera.

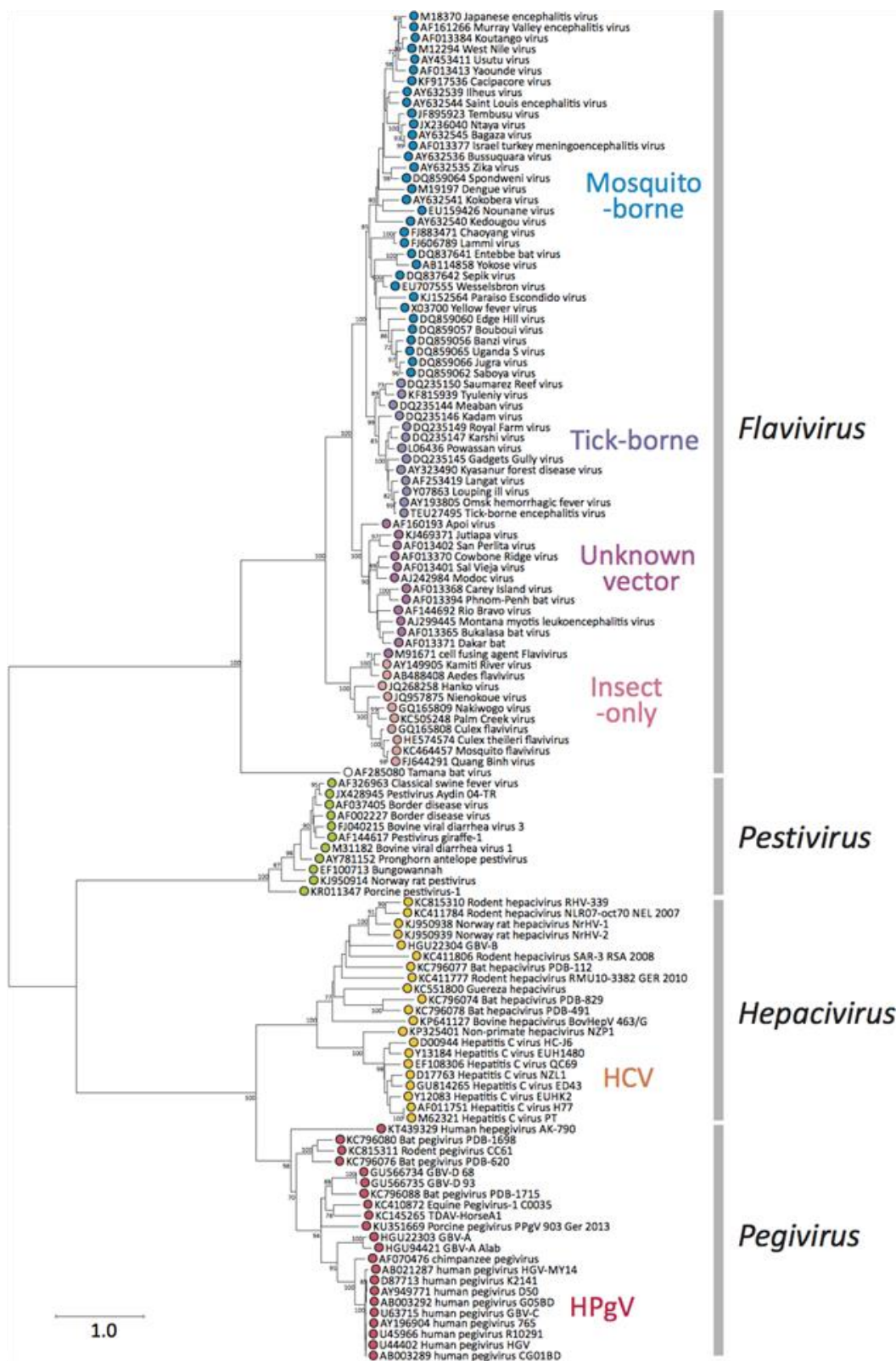


Figura 2. Árbol filogenético de una región parcial que codifica para la polimerasa de miembros representativos de los cuatro géneros de la familia *Flaviviridae* (ICTV, 2017).

1.1.6 El genoma viral y sus proteínas

El genoma de VHC está constituido por una única molécula de ARN de simple hebra de polaridad positiva de alrededor de 9,6 Kb, la cual posee un único marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína de aproximadamente 3011 aminoácidos (aa). Esta poliproteína, por acción de proteasas del hospedero primero y del propio virus después, dará lugar a 3 proteínas estructurales (C, E1, E2) y 7 proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). El marco abierto de lectura se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes, una en 5' y otra en 3' (5'NCR y 3'NCR), de gran importancia para los procesos de traducción y replicación, respectivamente (Figura 3). En el extremo 5'NCR se encuentra una región altamente estructurada denominada sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), que dará lugar a la traducción de forma CAP-independiente por la unión directa de la subunidad ribosomal 40S a esta estructura (Echeverría et al., 2015; Pestova et al., 1998; Simmonds, 2004).

Las tres proteínas estructurales que resultan del procesamiento de la poliproteína precursora por parte de proteasas del hospedero son: la proteína del core, E1 y E2. La proteína del core es una proteína de unión al ARN altamente conservada que forma la nucleocápside. Se ha descrito su interacción con numerosas proteínas celulares, afectando de esta forma las funciones de la célula hospedera como ser la transcripción, el metabolismo lipídico, la apoptosis y muchas otras vías de señalización celular, jugando de esta forma un rol clave en la patogénesis (Kumthip & Maneekarn, 2015; Tellinghuisen & Rice, 2002). Por su parte, las proteínas E1 y E2, como ya se mencionó, son glicoproteínas que se encuentran como heterodímeros conformando la envoltura del virus, por lo que son esenciales en las etapas de entrada y fusión viral (Lindenbach, 2013).

De las proteínas no estructurales, la primera en ser clivada de la poliproteína, también por parte de proteasas del hospedero, es la p7, que forma canales de iones calcio y tiene un rol importante en la maduración y en la liberación de las partículas virales (Kumthip & Maneekarn, 2015). La proteína transmembrana NS2 se autocliva de la poliproteína precursora en la conjunción NS2/NS3, separándose así de NS3. La proteína NS3 es una proteína bifuncional, con un dominio amino terminal con actividad serín-proteasa

dependiente de Zn y un dominio carboxilo terminal con actividad helicasa (Bartenschlager & Lohmann, 2000). Para su función proteasa, la proteína NS3 necesita de un cofactor: la proteína NS4A. La proteína NS4B es la responsable del anclaje del complejo de replicación a la membrana del retículo endoplásmico. La proteína NS5A es una fosfoproteína hidrofílica que es necesaria en la etapa de replicación viral y la ARN polimerasa ARN dependiente NS5B es la encargada de generar los nuevos genomas de ARN (Kumthip & Maneekarn, 2015).

Se ha reportado un marco abierto de lectura alternativo que se superpone al gen que codifica para la proteína del core y da lugar a la traducción de la proteína F. Es posible que la proteína F tenga roles en la regulación de la expresión génica, señalización celular y apoptosis (Ma et al., 2008; Shao et al., 2009; Varaklioti et al., 2002; Wu et al., 2007; Xu et al., 2003).

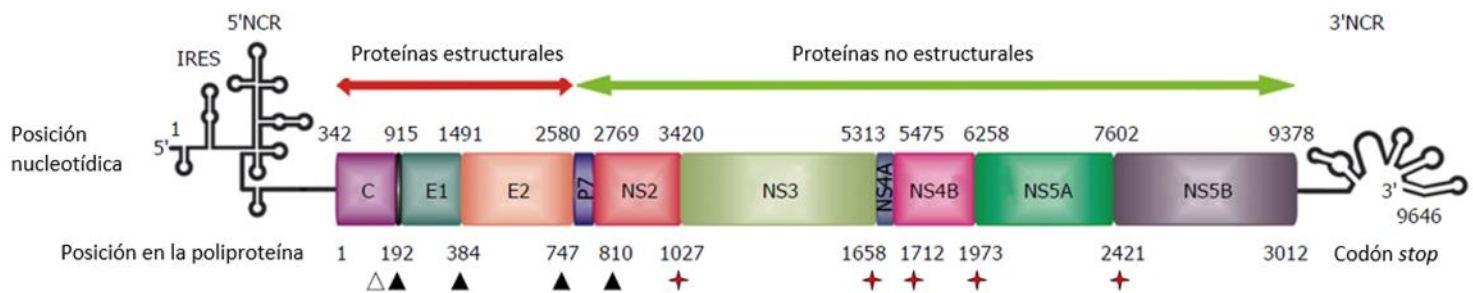


Figura 3. Organización del genoma de VHC y procesamiento de la poliproteína. Representación esquemática del genoma de ARN simple hebra de polaridad positiva de 9,6 Kb. Se muestran en los extremos 5' y 3' (5'NCR y 3'NCR) las estructuras secundarias simplificadas. La traducción mediada por IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) produce la poliproteína precursora que es procesada en proteínas estructurales y no estructurales. Las posiciones nucleotídicas se muestran con números en la parte superior del esquema, y las posiciones en la poliproteína en la parte inferior. Las flechas indican el clivaje por las distintas peptidasas celulares mientras que las estrellas rojas indican el clivaje por las proteasas virales NS2 y NS3/4A (Modificado de Echeverría et al., 2015).

1.2 La proteína NS3

De las proteínas no estructurales de VHC, la proteína NS3 será el centro de estudio del presente trabajo debido al desarrollo, en la actualidad, de drogas que tienen como blanco de acción directa a esta proteína.

La proteína NS3 es una serín-proteasa perteneciente a la familia de las quimiotripsinas, con una clásica tríada catalítica Asp-His-Ser (His57, Asp81, Ser135). Esta proteína consta de 631 aa, con una actividad serín-proteasa en su porción N-terminal (aa 1-180) y una actividad ARN helicasa dependiente de actividad NTPasa en su porción C-terminal (aa 181-631) (Figura 4). Tanto el dominio proteasa como el dominio helicasa funcionan independientemente; la evidencia sugiere que cada dominio modula la actividad bioquímica del otro (Salam & Akimitsu, 2013; Shang, Lin & Yin, 2014).

La actividad de la proteasa requiere la tríada catalítica, mencionada anteriormente, así como también a la cavidad de oxianión (cavidad formada por las amidas de la cadena principal de los residuos de Gly-137 y Ser-139) (Figura 4). Asimismo, la actividad serín-proteasa puede llevarse a cabo sólo en presencia del cofactor NS4A, el cual se intercala dentro de una estructura en hoja β que se encuentra en el núcleo de la proteasa. En presencia de NS4A, el dominio N-terminal de NS3 forma esta estructura de barril con 8 hojas β , donde una de ellas está formada por NS4A. Es por esto que, sin la presencia de NS4A, los 30 residuos N-terminales de NS3 que forman las hojas β se pierden estructuralmente (Shang et al., 2014). El cofactor NS4A contribuirá entonces llevando al sustrato al posicionamiento correcto respecto a la tríada catalítica, asegurando la eficiencia catalítica y la especificidad de sustrato (Raney et al., 2010).

La porción C-terminal de la proteína codifica para una caja DExH/D con actividad ARN helicasa que hidroliza NTP como fuente de energía para desdoblar la doble cadena de ARN en un sentido 3' a 5' durante la replicación de ARN genómico viral. Sin la función helicasa VHC no puede replicarse en las células (Raney et al., 2010; Salam & Akimitsu, 2013).

La estructura de esta proteína es estabilizada por un ion Zn que está coordinado por tres residuos de cisteína y una molécula de agua (Figura 4). La unión al Zn es esencial para su función (Raney et al., 2010).

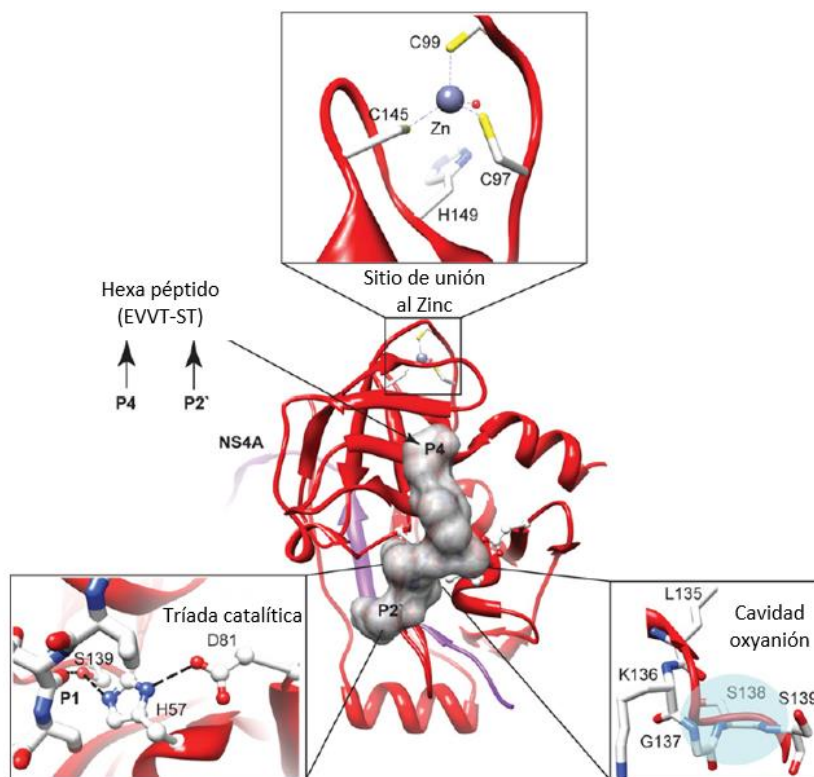


Figura 4. Estructura del dominio proteasa de NS3 en un complejo con el cofactor NS4A y un sustrato peptídico. La estructura del cristal (PDB: 1A1R) del dominio proteasa N-terminal (en rojo) formando un complejo con el cofactor NS4A (en violeta) se presenta como una cinta. El polipéptido que contiene la unión NS3/NS4A, correspondiente a las posiciones P4-P2, fue modelado en el sitio activo de la proteasa NS3 y se muestra como una superficie (en gris). En la vista expandida en la parte izquierda inferior se muestran las interacciones de la tríada catalítica (H57, D81 y S139) con el péptido modelado; las líneas punteadas negras representan los puentes de hidrógeno. En la vista expandida en la parte derecha inferior se muestra el *loop* oxyanión (posiciones 135-139), donde los átomos de nitrógeno estabilizan el desarrollo de la carga negativa del oxígeno de la S139 durante el clivaje peptídico; las cadenas laterales se indican como varillas y la cavidad de oxyanión está remarcada con una sombra celeste. En la vista expandida superior se indican con varillas las cadenas laterales de los residuos C97, C99, C145 y H149, que interactúan con el ion metálico (esfera violeta) (Modificado de Raney et al., 2010).

NS3 interacciona con sí misma *in vitro* formando grandes estructuras agregadas, pero no se sabe si la oligomerización es biológicamente significativa. La evidencia indica que la NS3 monomérica puede rápidamente desenrollar el ARN, aunque con una procesividad relativamente baja. El dominio helicasa no interacciona consigo mismo, sin embargo su actividad de desenrollamiento se ve incrementada cuando muchas moléculas se encuentran unidas al mismo sustrato de ADN. Este fenómeno se conoce como cooperación funcional (Levin, Wang & Patel, 2004; Raney et al., 2010).

Además de tener como sustrato componentes virales, la proteasa viral también tiene como sustratos componentes del hospedero. NS3/4A cliva las proteínas del hospedero involucradas en el reconocimiento de patógenos como son TRIF y MAVS (por sus siglas del inglés: *Toll/interleukin-1 receptor resistance domain-containing adaptor-inducing IFN protein*, y: *mitochondrial antiviral signaling protein*, respectivamente), moléculas adaptadoras críticas en las vías de señalización del TLR3 (*Toll Like Receptor 3*) y RIG-I (*Retinoic acid - Inducible Gene I*), respectivamente. De esta forma, la infección por VHC es capaz de bloquear la activación de la vía del interferón, la cual es activada en el marco de la respuesta inmune innata desarrollada por la célula hospedera contra esta infección (Götte & Feld, 2016; Raney et al., 2010).

1.3 Variabilidad genética

El análisis del genoma de numerosos aislados de VHC ha evidenciado un alto grado de variabilidad genética en la secuencia nucleotídica. La evolución de este virus es un proceso altamente dinámico que, así como muchos virus de genoma ARN, aprovecha todos los posibles mecanismos de generación de variabilidad genética para asegurar su supervivencia.

1.3.1 Mutación y cuasiespecies virales

VHC se caracteriza por altos niveles de heterogeneidad genética que impactan fuertemente en la persistencia viral, la susceptibilidad al tratamiento, la progresión de la enfermedad y la falta de una vacuna eficaz, entre otros. Como para otros virus ARN, la mutación a nivel de nucleótidos parece ser la primera causa de variación genética en VHC, lo cual se debe al

uso, para la replicación de su material genético, de una ARN polimerasa ARN dependiente propensa a errores y sin una actividad correctora,. La tasa de mutación de VHC, que se estima es de 10^{-4} mutaciones/sitio/ciclo replicativo, es una alta tasa dentro de los virus ARN (González-Candelas, López-Labrador & Bracho, 2011).

Debido a esta alta tasa de error de la ARN polimerasa ARN dependiente, a la alta tasa de replicación del virus y a la presión ejercida por el sistema inmune del hospedero, VHC circula *in vivo* como una compleja población de variantes estrechamente relacionadas genéticamente, denominada cuasiespecie (Figura 5) (Biebricher & Eigen, 2005; Chambers et al., 2005; Domingo et al., 1998; Domingo et al., 2005; Echeverría et al., 2015; Feliu et al., 2004; Laskus et al., 2004).

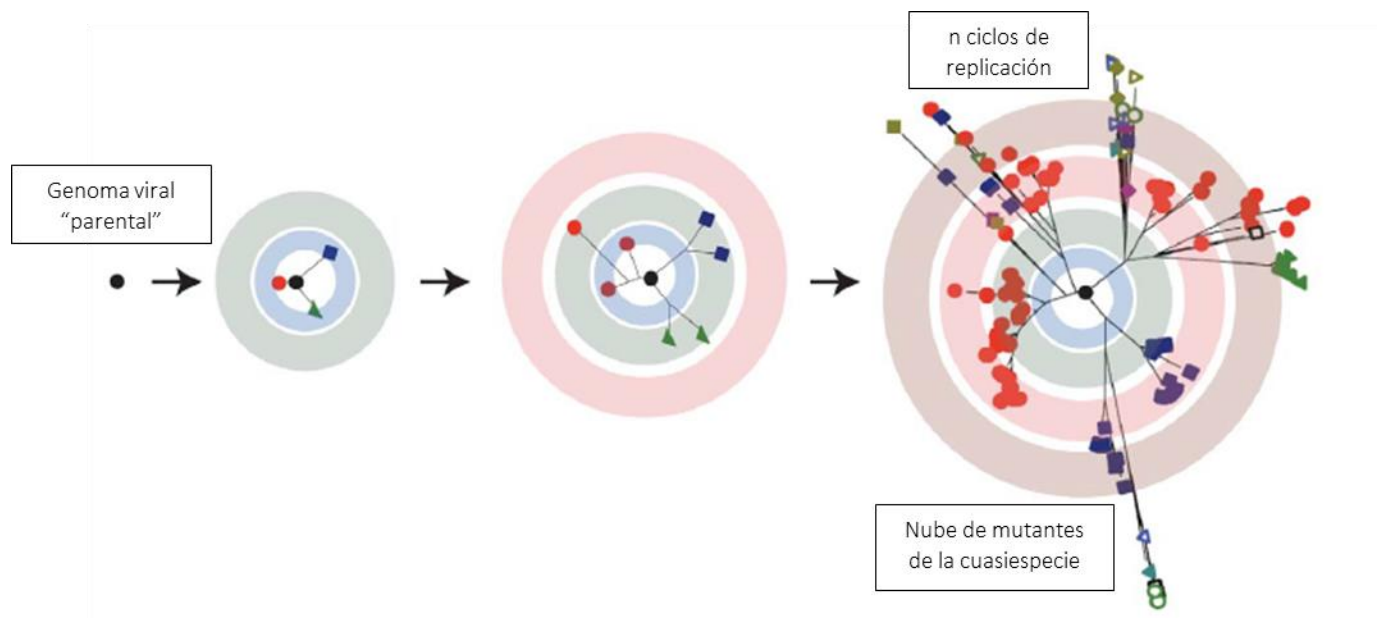


Figura 5. Cuasiespecies virales. Un virus replicando con una alta tasa de mutación generará un repertorio de mutantes diversos en el transcurso de unas pocas generaciones. En esta representación esquemática, un genoma viral "parental" (círculo negro) da lugar a diferentes variantes (formas de diversos colores), cada una unida a la otra por una mutación puntual. Los círculos concéntricos representan los ciclos de replicación. La distribución resultante es referida generalmente como nube de mutantes o cuasiespecie (Modificado de Lauring & Andino, 2010).

En cierto punto de la infección por VHC, la distribución de la cuasiespecie viral refleja el balance entre la continua generación de nuevas variantes, la necesidad de preservar las funciones virales básicas y la presión selectiva positiva ejercida por el ambiente (Echeverría et al., 2015; Pellerin et al., 2004).

La alta tasa de mutaciones y la dinámica de las cuasiespecies son responsables de la gran adaptabilidad encontrada en los virus ARN. La continua generación y selección de variantes resistentes permite a los virus escapar a la acción de los antivirales, lo cual representa un gran obstáculo para el control y prevención de las enfermedades causadas por estos virus (Echeverría et al., 2015; Pawlotsky, 2006).

1.3.2 Recombinación

Otro importante mecanismo para la generación de variabilidad genética es el de recombinación. Este mecanismo juega un rol importante en la evolución de los virus ARN mediante el intercambio de secuencias nucleotídicas entre diferentes moléculas de ARN. La recombinación homóloga ocurre cuando la secuencia dadora reemplaza a una región homóloga en la secuencia aceptora dejando su estructura incambiada. La recombinación de ARN implica la replicación del ARN genómico como un componente fundamental para que se de este proceso. Si la ARN polimerasa ARN dependiente cambia de un ARN parental a otro en el medio de la replicación se formará una cadena de ARN híbrida complementaria (Echeverría et al., 2015; Galli & Bukh, 2014).

La presencia de recombinación ha sido demostrada en muchos miembros de la familia *Flaviviridae* como los *Pestivirus*, *Flavivirus* y *Hepacivirus*. Para VHC se han reportado casos tanto de recombinación intergenotípica, intragenotípica como intracuasiespecie en poblaciones de distintas ubicaciones geográficas, como Rusia (2k/1b), Perú (1a/1b), Vietnam (2/6), Filipinas (2b/1b), Francia (2/5), Uzbekistán (2k/1b), Japón (1a/1c) y Uruguay (1b/1a) (Colina et al., 2004; Cristina & Colina, 2006; Kageyama et al., 2006; Kalinina et al., 2002; Kurbanov et al., 2008; Legrand-abravanel et al., 2007; Morel et al., 2010; Moreno et al., 2009; Noppornpanth et al., 2006).

Las regiones del genoma que se vinculan a funciones esenciales, como lo son la replicación y traducción, o que muestran limitaciones estructurales mayores (regiones 5'NCR y 3'NCR, respectivamente) son las regiones más conservadas. Por su parte, las regiones donde se encontrará mayor variabilidad son aquellas que codifican para las glicoproteínas de membrana E1 y E2. Las secuencias de las regiones hipervariables de E2 en cepas aisladas de diferentes pacientes difieren en más de un 50% a nivel nucleotídico. Los polipéptidos codificados por estas regiones hipervariables son muy tolerantes a las sustituciones aminoacídicas (Guillou-guillemette et al., 2007).

Es importante destacar que la distribución geográfica de los genotipos y subtipos de VHC ha cambiado a lo largo del tiempo debido a la disminución de algunas de las rutas de transmisión, como ser la asociada a transfusiones, la alteración de las rutas de transmisión por el abuso de drogas intravenosas y con la emigración desde regiones con genotipos diferentes. Un reciente estudio ha encontrado que los genotipos 1 (G1) y 3 (G3) son los más prevalentes a nivel mundial, responsables del 46% y 30% de todas las infecciones, respectivamente; mientras que los genotipos 2 (G2), 4 (G4), 5 (G5) y 6 (G6) causarían el 9%, 8%, 1% y 6% de los casos, respectivamente. Algunos subtipos como 1b, 2a y 2b, se encuentran típicamente en poblaciones mayores y se cree que han resultado de la propagación iatrogénica (incluyendo transfusiones); otros subtipos, como 1a, 3a, 4d y 6a, están estrechamente vinculados con el uso generalizado de drogas intravenosas (Figura 6) (Bukh, 2016).

Los llamados “subtipos epidémicos”, específicamente 1a, 1b, 2a y 3a, están ampliamente distribuidos en todo el mundo y dan cuenta de una gran proporción de la totalidad de los casos de VHC, especialmente en países de altos ingresos. Estos subtipos se dispersaron probablemente en los años 70's y 80's, antes del descubrimiento del agente etiológico, a través de transfusión, derivados de la sangre y drogadicción. Por su parte, las cepas “endémicas” son comparativamente más raras y han sido restringidas por mucho tiempo a regiones específicas, como África occidental, Asia meridional, África central y Asia sudoriental. Al presente, unas pocas infecciones por genotipo 7 han sido reportadas, todas ellas en individuos provenientes de la República Democrática del Congo (Murphy et al., 2015; Petruzzello et al., 2016; Salmona et al., 2016).

Las infecciones en el Caribe, Latinoamérica, Norteamérica y Europa son predominantemente causadas por el G1 (83%, 74,3%, 66,3%, y 64,4% de los infectados, respectivamente). África del norte y Medio Oriente tienen una gran población de G4 (65,3%), probablemente atribuida a la alta prevalencia del G4 en Egipto (93,1%). En Asia, los dos genotipos más comunes son el G1 (46,6%) y el G3 (22,4%), este último en gran medida impulsado por su alta prevalencia en el sur de Asia (66,7%) (Petruzziello et al., 2016).

El genotipo más representativo en el continente americano es el G1 (74,5% de los infectados), seguido del G3 (10,6%), G2 (10,2%) y G4 (1,7%). Los G5 y G6, han sido reportados en bajos porcentajes (Petruzziello et al., 2016).

En el primer estudio integral sobre la epidemiología molecular y la historia epidémica del VHC en Uruguay, se determinó que los genotipos y subtipos predominantes eran el 1a (56%), el 3a (26%) y el subtipo 1b (18%), un patrón similar al descrito en otros países de América del Sur (Castells et al., 2015).

Dado que la duración y el costo de los tratamientos clínicos útiles para combatir la infección por VHC aún se ven afectados, principalmente, por la diferente evolución clínica de cada subtipo y, especialmente, hasta que las terapias pangenotípicas sean capaces de alcanzar el mercado global, un correcto conocimiento de la distribución de VHC es crucial para contener la enfermedad (Petruzziello et al., 2016).

1.4 Prevención y Tratamiento

En lo referente a la prevención y tratamiento es importante destacar que no existe al día de hoy una vacuna profiláctica efectiva, debido, en gran medida, a la falta de un modelo animal adecuado para el estudio de VHC y su interacción con el sistema inmune.

La terapia clásica contra VHC se basa en la administración de IFN alfa pegilado (IFN-alfa-peg) y ribavirina (RBV). El interferón es una citoquina que induce la expresión en el hospedero de múltiples proteínas con efecto antiviral que actúan contra la replicación del

virus. Por su parte, la ribavirina, análogo nucleósido, tiene actividad frente a distintos virus ARN y ADN, aunque su mecanismo de acción aún no es completamente comprendido (Kumthip & Maneekarn, 2015). El IFN fue posteriormente modificado mediante la unión covalente de una larga molécula de polietilenglicol, lo cual le brinda mayor vida media, mejor perfil farmacocinético y mejor rango de respuesta virológica (Glue et al., 2000; Heathcote et al., 2000; Lindsay et al., 2001; Zeuzem et al., 2000).

Debido a los bajos porcentajes de respuesta virológica sostenida (RVS) (42-46% en pacientes infectados con G1; 76-80% en pacientes con G2 o G3; 50-77% en pacientes con G4, G5 y G6) (Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004; Manns et al., 2001) y los grandes efectos secundarios (mayormente a causa del IFN), esta terapia ha dado paso a nuevas drogas cuyos blancos de acción son proteínas virales (DAAs – *Direct Acting Agents* por su sigla en inglés). La RVS se define como la no detección de ARN del virus durante el tratamiento y tras 6 meses de terminada la terapia (Feld & Hoofnagle, 2005).

Las nuevas drogas directas pueden clasificarse en tres grandes grupos según cuál de las proteínas no estructurales de VHC sea su blanco (Figura 7):

- a) Inhibidores de NS3. Los inhibidores de NS3 son compuestos péptido-miméticos que se unen al sitio catalítico de la enzima, bloqueando el procesamiento post-traducciona l de la poliproteína. En la primera generación de DAAs se encontraban los inhibidores de la proteasa Telaprevir (TVR) y Boceprevir (BOC), aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA, en Estados Unidos) en Setiembre de 2011 para el tratamiento de VHC G1. Ambas drogas fueron suministradas en conjunto con la terapia clásica para prevenir emergencias de resistencias. Los valores de RVS alcanzaron porcentajes mayores (66-75%) a los que se venían obteniendo con la biterapia clásica (Deeks, 2015; Kumthip & Maneekarn, 2015). En una segunda generación de inhibidores de la proteasa, el Simeprevir (SMV) alcanzó, en pacientes con G1 que nunca antes habían sido tratados con estas drogas, una RVS de 75-85% (Deeks, 2015; Kumthip & Maneekarn, 2015).

Los inhibidores péptido-miméticos lineares (TVR, BOC), se unen de forma reversible con la serina del sitio activo formando una unión covalente. Por su parte,

los inhibidores macrocíclicos (moléculas con al menos un gran anillo compuesto por 12 o más átomos) de NS3 de segunda generación (SMV, Asunaprevir-ASV) se ha visto que, por su estructura cristalográfica en interacción con NS3, hacen contacto con el dominio proteasa e interacciones débiles con el dominio helicasa. Otros inhibidores de la proteasa de segunda generación son Faldaprevir (FDV) (acíclico o linear); Danoprevir y Vaniprevir (macrocíclicos P1-P3 y P2-P4, respectivamente) (Götte & Feld, 2016; Marsault & Peterson, 2011).

Se han desarrollado nuevas generaciones de inhibidores de la proteasa a fin de superar la poca cobertura en cuanto a genotipos y la baja barrera a la resistencia. Dentro de los inhibidores de tercera generación se encuentran el macrocíclico P2-P4 Grazoprevir (GZV), potente contra los G1 a G6; el Glecaprevir y el Voxilaprevir (VOX), macrocíclicos P2-P4, pangénóticos; y el Paritaprevir (PTV), macrocíclico P1-P3, que se administra en combinación junto a otros DAAs contra las proteínas blanco NS5B y NS5A (Götte & Feld, 2016; McCauley & Rudd, 2016)

Todos estos inhibidores, al bloquear la acción de la proteína NS3, no solo impedirían el correcto procesamiento de la poliproteína viral sino que restaurarían las vías de señalización del TLR3 y RIG-I, y por tanto la producción de IFN β , dado que la proteasa tiene como sustratos celulares a TRIF y MAVS, respectivamente (Raney et al., 2010).

- b) Inhibidores de NS5B. Los inhibidores de la polimerasa pueden subdividirse en dos grandes grupos según en qué etapa de la síntesis de ARN actúen: los inhibidores no nucleotídicos y los nucleotídicos. La ARN polimerasa ARN dependiente utiliza el genoma de ARN como templado para la síntesis sin necesidad de cebador; la iniciación es lenta y se dan eventos de disociación hasta que se forma el primer enlace fosfodiéster que estabiliza el complejo de iniciación dando paso a la elongación. Los distintos complejos se encuentran asociados con distintas estructuras y conformaciones de la enzima NS5B, que será blanco de inhibidores específicos (Götte & Feld, 2016).

Los inhibidores no nucleotídicos actúan en la iniciación de la síntesis de ARN, interfiriendo con la dinámica conformacional en la transición iniciación - elongación. Los sitios de unión de estos inhibidores son sitios alostéricos, lo cual es compatible con mecanismos de acción no competitivos. Diferentes clases de inhibidores no nucleotídicos pueden unirse a distintos sitios dentro de uno de los principales dominios de la polimerasa, comúnmente llamado dominio tipo pulgar (sitios I y II), así como también al dominio tipo palma, como el inhibidor selectivo del G1, Dasabuvir (DSV) (Götte & Feld, 2016).

Por otra parte, los inhibidores nucleotídicos actúan de manera competitiva por el sitio de unión a NS5B, compiten con el nucleósido trifosfato por la unión e incorporación en la cadena naciente. Este tipo de inhibidores se administran como pro-drogas que requieren activación metabólica a la forma trifosfato. Por ejemplo, el Sofosbuvir (SOF) es un análogo de la uridina. A diferencia de los inhibidores no nucleotídicos, los nucleotídicos son pangénóticos y presentan una alta barrera a la resistencia (Götte & Feld, 2016).

- c) Inhibidores de NS5A. A diferencia de la proteasa NS3/4A y la polimerasa NS5B, la fosfoproteína NS5A es una proteína multifuncional que no posee actividad enzimática. NS5A es una proteína de unión al ARN con varios sitios de fosforilación que dificultan estudios de relación estructura/función. El desarrollo de inhibidores para esta proteína ha sido un gran desafío. El primero en ser desarrollado fue Daclatasvir y luego lo siguieron el Ledipasvir (LDV) y el Ombitasvir (OBV). La gran potencia de los inhibidores de NS5A se ha atribuido a la implicancia de esta proteína blanco en distintas etapas del ciclo de vida viral, particularmente en la replicación y en el ensamblaje. Es de destacar que estos compuestos inhiben la formación de la red de membranas inducida por el virus, red que provee el lugar donde ocurre la replicación (Berger et al., 2014; Götte & Feld, 2016).

En una primera etapa, estas nuevas drogas se siguieron administrando junto con el IFN-alfa-peg y la RBV, pero poco a poco se han incrementado los tratamientos libres de interferón. Varias combinaciones de DAAs han sido ensayadas buscando mejores tasas de RVS. Una

de las últimas de estas combinaciones, libre de IFN, consta de un inhibidor de la fosfoproteína NS5A (OBV), un inhibidor de la proteasa NS3/4A (PTV) y un inhibidor del citocromo p450 (Ritonavir), en combinación con un inhibidor no nucleotídico de la polimerasa NS5B (DSV); esta combinación es conocida comercialmente como Viekira Pak (Figura 7).

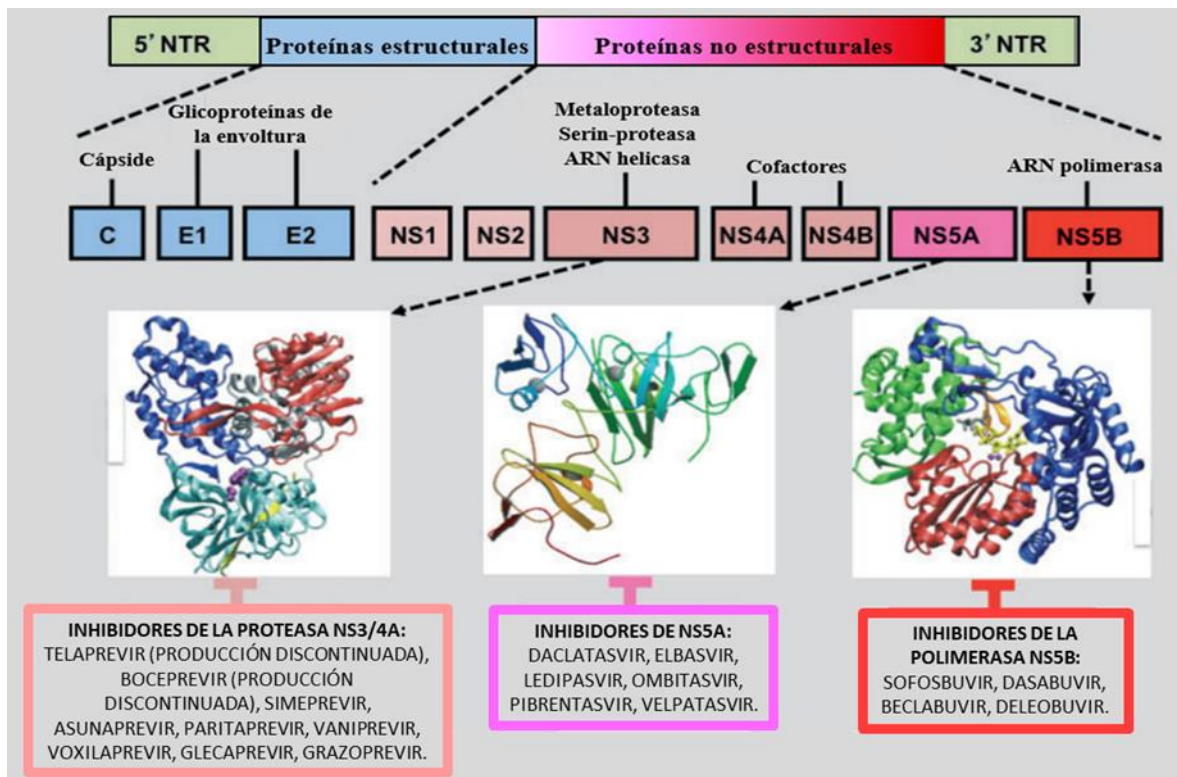


Figura 7. Genoma de VHC y blancos de las nuevas drogas antivirales directas. El genoma de ARN de VHC sirve como molde para la replicación viral y como ARN mensajero viral para la producción de proteínas virales. La proteasa NS3/4A, la fosfoproteína NS5A y la polimerasa NS5B son esenciales para la replicación de VHC, y son por tanto blancos de nuevas drogas (Modificado de Asselah & Marcellin, 2013).

La implementación de las DAAs permitió regímenes terapéuticos más cortos y sencillos, así como también un aumento de la RVS. Desafortunadamente, los altos costos de las DAAs imposibilitan la accesibilidad para la mayoría de los pacientes en todo el mundo (Fabrizi, Martin & Messa, 2016).

En Uruguay, el Fondo Nacional de Recursos (FNR) sólo cubre el tratamiento clásico de IFN-alfa-peg más RBV, mientras que la mayoría de los tratamientos que impliquen DAAs, si

bien han sido aprobados para su uso, no son financiados actualmente, salvo en casos puntuales. Dentro de estas drogas, las primeras en aprobarse en nuestro país fueron TVR y BOC (inhibidores de proteasa – IP), cuya producción actualmente se ha discontinuado. Más recientemente se aprobó el Viekira Pak y la combinación de SOF (inhibidor de la polimerasa) con LDV (inhibidor de la NS5A) (Asselah & Marcellin, 2013; FNR, 2018).

1.5 Emergencia de variantes resistentes a DAAs

Uno de los mayores problemas en el desarrollo de terapias antivirales directas es la emergencia de variantes de resistencia a este tipo de drogas (RAVs por sus siglas del inglés: *Resistance Associated Variants*). Estas variantes se definen por la presencia de una o más sustituciones puntuales que hacen a un fenotipo resistente, denominadas RASs (por su sigla del inglés: *Resistance Associated Substitutions*) (Gaspareto et al., 2016; Sorbo et al., 2018; Tong et al., 2006). Estas pueden surgir durante la terapia o preexistir antes del tratamiento con DAAs (pacientes naïve al tratamiento con DAAs) (Wyles, 2013).

Las poblaciones virales que constituyen la cuasiespecie difieren por polimorfismos que surgen durante la replicación y posteriormente se seleccionan en función de su impacto en el *fitness* viral. Se ha reportado la existencia de sustituciones de resistencia en poblaciones virales mayoritarias, aún en pacientes nunca antes tratados con DAAs (Esposito, Trinks & Soriano, 2016; Li et al., 2017; Zeminian et al., 2013).

Sin embargo como muchas de estas sustituciones llevan a una reducción en el *fitness* viral al compararse con el *wild type*, muchas veces se encuentran en poblaciones virales minoritarias (en porcentajes menores al 1%). Durante un tratamiento, la inhibición completa de los virus *wild type* sensibles a DAAs abre el espacio de replicación, permitiendo de ese modo que las variantes con susceptibilidad reducida aumenten su proporción rápidamente y se vean enriquecidas. Estas variantes de susceptibilidad reducida serán las que definan entonces la resistencia viral. Sustituciones de aminoácidos adicionales, compensatorias o secundarias, presentes de forma natural o adquirida tras la administración del fármaco, pueden aumentar el *fitness* de las variantes resistentes, llevando a su rápido crecimiento,

tanto durante como después del tratamiento (en recaedores). Por otra parte, las variantes seleccionadas podrían también ser sustituidas luego por el *wild type* si la terapia no fue lo suficientemente efectiva como para eliminarlo, o bien por reaparición de mutaciones espontáneas en variantes resistentes que aleatoriamente reversionan al *wild type* (Pawlotsky, 2016).

La probabilidad de que un fármaco seleccione y permita la proliferación de variantes virales con RAS dentro de la cuasiespecie depende de varios factores como son:

- a) la barrera genética a la resistencia, es decir el número de cambios aminoacídicos necesarios para alcanzar una RAS a partir de la secuencia del virus *wild type* (cuando un solo cambio aminoacídico confiere un alto nivel de resistencia, la barrera genética para la droga es baja);
- b) el *fitness* viral de la variante resistente, es decir, su capacidad de sobrevivir y replicarse en un ambiente dado;
- c) la presión selectiva de la droga, la cual depende de la potencia de la droga, la exposición a la droga y la adherencia del paciente a la terapia (Esposito et al., 2016; Pawlotsky, 2016).

La frecuencia de RASs en pacientes naïve ha sido determinada tras un relevamiento a nivel de las secuencias de la base de datos de VHC del GenBank, donde la prevalencia de RASs a nueve DAAs fue de un 58,7%. Teniendo en cuenta sólo aquellas sustituciones clínicamente relevantes, esta prevalencia pasó a ser de un 37,9%. Analizando por regiones geográficas se reportaron prevalencias de RASs a DAAs de 53,5%, 51,4%, 74,1% y 71,9% para América, Europa, Asia y África, respectivamente (Chen, et al., 2016).

1.5.1 RASs a inhibidores de NS3

La prevalencia de RASs a inhibidores de la proteína NS3, según el ya mencionado relevamiento de Chen y colaboradores, es alta y comprende un 40% del total de las secuencias analizadas. Estas RASs fueron asociadas con resistencia a BOC (12,1%), TVR (5,5%), SMV (29,8%) y PTV (2,5%). Al analizarse las RASs clínicamente relevantes, en cambio, el 25,1% de las secuencias contaban con estas sustituciones en la región de NS3,

donde la gran mayoría están asociadas a resistencia al SMV (21,5%) (Chen et al., 2016). Particularmente, la RAS Q80K (genotipo 1a), ha mostrado una alta probabilidad de preexistencia en pacientes no tratados con estas drogas en Estados Unidos y Europa (Nishiya et al., 2014; Vidal, Soares, & Santos, 2016). Sin embargo, parece ser poco frecuente en países de la región Sudamericana como Brasil y Argentina (Hoffmann et al., 2015; Lisboa-Neto et al., 2015; Martínez et al., 2017; Nishiya et al., 2014; Peres-da-Silva, de Almeida & Lampe, 2012; Sede, Laufer & Quarleri, 2015; Zeminian et al., 2013).

En el caso de los otros genotipos, la reducción en la actividad antiviral de algunos inhibidores de NS3 parece asociarse a la presencia basal de sustituciones de resistencia, como por ejemplo S122R en el G2, que confiere resistencia a SMV; D168Q en el G3, que da resistencia a SMV; o Q80K en el G5 también asociada a resistencia al SMV (Sarrazin et al., 2015; Vallet et al., 2011).

Si bien a nivel mundial existe un vasto relevamiento de las cepas resistentes circulantes, en nuestra región existen pocos datos registrados respecto a este tipo de variantes. Estudios realizados en Brasil, mostraron que la frecuencia de RASs a inhibidores de NS3 en pacientes naïve al tratamiento varía entre un 4,4% y un 18,9%. Dentro de las RASs reportadas se encuentran la V36L y T54S con una frecuencia de 4,1% y 5,6% en pacientes infectados con subtipo 1a y 1b, respectivamente (Peres da Silva, de Almeida & Lampe, 2010). Asimismo, se reportaron también las RASs A156T, T54A, V55A, Q80R y R155K (Hoffmann et al., 2013; Lisboa-Neto et al., 2015; Zeminian et al., 2013). Recientemente, Martínez y colaboradores (2017) reportaron para Argentina una frecuencia de RASs en pacientes naïve de un 36,9% (51,6% para subtipo 1a y 12,8% para subtipo 1b), donde se encontraron sustituciones como: V36M/L, T54S, Y56F, Q80L/R, R117C/H, S122G, S122N, S138T, R155S, D168T, V170A, I170G, S/N174A y S/N174T (Martínez et al., 2017).

Por todo lo expuesto anteriormente creemos que es de gran importancia llevar a cabo un estudio que nos permita conocer la circulación de estas variantes resistentes en nuestro país previo al uso masivo de este nuevo tipo de terapias. Conocer las frecuencias de RAS en los pacientes naïve, así como el perfil de resistencia de las distintas variantes, brindaría información relevante al médico tratante, lo que podría redundar en una terapia más

personalizada para cada paciente. De este modo, se podría proveer de información con carácter predictivo sobre la respuesta ante la terapia en cada caso particular, evitando someter a un paciente a un tratamiento para el cual probablemente sea no respondedor. Esto se sumaría al beneficio en lo referente al costo del tratamiento, ya que, hasta el momento, estas drogas de última generación no se encuentran financiadas por el Fondo Nacional de Recursos y son extremadamente costosas.

2. Hipótesis de trabajo

Diversos estudios han demostrado la circulación de variantes de VHC con sustituciones de resistencia a DAAs en la región que codifica para NS3, tanto en pacientes tratados como en pacientes naïve al tratamiento con este tipo de drogas, en diferentes países del mundo y la región. Es por este motivo que se espera encontrar, en pacientes uruguayos infectados crónicamente con VHC y naïve al tratamiento con DAAs, cepas virales que presenten alguna de estas sustituciones de resistencia. Asimismo, es de esperar que algunas de estas sustituciones puedan estar presentes en variantes poco frecuentes dentro de las cuasiespecies. El conocimiento de las distintas variantes y de las RASs que presenten podrá ser de utilidad a la hora de la elección de la terapia a suministrar en cada caso.

Mediante este estudio esperamos constatar además la conservación a nivel de los sitios de la tríada catalítica de NS3, así como los involucrados en la unión al ion Zn, ya que son sitios imprescindibles para la función proteasa de esta proteína.

Por otra parte, y debido a la alta tasa de mutación que este virus presente, es esperable encontrar otras sustituciones tanto en sitios de interacción con otras proteínas virales como en sitios de interacción con proteínas celulares.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo se centra en el estudio de la variabilidad genética de la región del genoma de VHC que codifica para la proteasa NS3 en pacientes infectados crónicamente y que no han sido tratados previamente con drogas antivirales directas, focalizando en la búsqueda de sustituciones de resistencia.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Puesta a punto de la amplificación de la región que codifica para la proteasa NS3 del genoma de VHC.
- 3.2.2 Determinar el genotipo de VHC en muestras provenientes de pacientes infectados.
- 3.2.3 Determinar la presencia de mutaciones, a nivel de la región que codifica para la NS3, que han sido asociadas previamente a la resistencia a antivirales directos, así como aquellas que no han sido asociadas previamente a la resistencia a antivirales directos
- 3.2.4 Determinar la presencia de mutaciones, a nivel de la región que codifica para la NS3, que no han sido asociadas previamente a la resistencia a antivirales directos.
- 3.2.5 Analizar las sustituciones, no asociadas *a priori* con resistencia a DAAs, mediante su mapeo en la estructura 3D de la proteína NS3, y estudiar por *docking* molecular aquellas que puedan interferir con el sitio de unión a la droga.
- 3.2.6 Estudiar la diversidad de las cuasiespecies de NS3 de VHC genotipo 1a, a fin de determinar la presencia de sustituciones asociadas o no a la resistencia a los DAAs en las variantes que la componen.
- 3.2.7 Buscar la presencia de una firma de secuencia, a nivel de NS3, característico de las cepas que circulan en Uruguay y en nuestra región respecto a las que circulan en otras regiones del mundo.

4. Materiales y métodos

4.1 Muestras

Se recolectaron 15 muestras de suero de pacientes uruguayos infectados crónicamente con VHC. Estas muestras fueron suministradas por el Laboratorio de Técnicas Especializadas de la Asociación Española en el marco del proyecto Alianza PE_ALI_2009_1_1603-ANII-ASESP-Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR). Los datos de fecha de toma de muestra, sexo y carga viral al momento del estudio se observan en la Tabla 1. Al momento de la extracción de sangre, ninguno de estos pacientes había sido tratado previamente con DAAs. Los estudios se han realizado de acuerdo con la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki y aprobados por los paneles institucionales correspondientes.

Tabla 1. Datos de los pacientes.			
Nº de muestra	Toma de muestra	Carga viral (UI/mL)	Sexo
598	14-06-2012	2.010.000	M
624	21-08-2012	6.260.000	M
955	16-04-2012	4.060.000	F
983	17-05-2012	83.100	M
989	29-05-2012	140.000	F
990	30-05-2012	5.180.000	M
996	07-06-2012	419.000	F
1010	25-06-2012	566.000	M
1011	26-06-2012	305.000	M
1018	03-07-2012	2.060.000	M
1019	03-07-2012	2.390.000	M
1968	02-03-2012	1.640.000	F
1970	06-03-2012	ND	M
1982	22-03-2012	ND	M
1984	26-03-2012	ND	M

*ND: No Determinada

** Carga viral: determinada con el kit comercial *AmpliPrep/COBAS®TaqMan®* HCV Test, v2.0: *Qualitative and Quantitative* (COBAS®), Asociación Española.

4.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN total fue realizada a partir de 140 µl de suero utilizando el kit *QIAamp RNA Mini Kit* (QIAGEN), según instrucciones suministradas por el fabricante. El material así obtenido se almacenó a -80°C, para luego ser usado como molde en la síntesis del ADN complementario (ADNc) o bien como molde para la reacción de *One-Step* PCR.

4.3 Retrotranscripción

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 5 microlitros (µl) de ARN total mediante retrotranscripción (RT) utilizando hexámeros al azar (*random primers*). La RT se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 1 µl de *random primers* 200 micromolar (µM), 1 µl de desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs) 10 milimolar (mM), 6 µl de agua con dietilpirocarbonato (DEPC) y 5 µl de ARN. Esta mezcla fue incubada a 65°C durante 5 minutos (min) y a continuación fue colocada un minuto en hielo. Posteriormente se agregó: 4 µl de buffer (5X), 2 µl de DTT 0,1 Molar (M) y 1 µl de ADN polimerasa ARN dependiente *SuperScript II* (Invitrogen) 200 U/µl. Esta mezcla fue incubada 10 min a 25°C, 50 min a 42°C y 15 min a 70°C en un termociclador *Corbett PalmCycler* CG-196. El ADNc así obtenido fue almacenado a -20°C hasta su posterior utilización en la reacción de PCR.

4.4 Amplificación por PCR de la región genómica que codifica para NS3

El ADNc obtenido mediante la RT fue utilizado para realizar la amplificación de la región genómica que codifica para la serín-proteasa NS3.

Con este fin se realizó la puesta a punto de 3 aproximaciones diferentes que nos permitieron amplificar la región NS3 del genoma de VHC:

- a) Por un lado se realizó la amplificación de la región NS3 completa mediante *heminested* PCR. Esta *heminested* PCR nos permitió amplificar una región comprendida entre el nucleótido (nt) 2640 y el nt 5475 (referente al genoma de VHC

cepa H77, NCBI *Accession Number*: JX472009), generando un producto de PCR de 2836 pb. Esta región abarca parte de la región codificante de la proteína NS2, toda la región codificante de NS3 y parte de la región que codifica para NS4A (Figura 8). Para esta etapa de amplificación se utilizaron los *primers* p519Fwd, p520Rev y p523Rev, descritos previamente por Vicenti et al., 2012 (Tabla 2).

La mezcla de PCR para el primer round fue realizada en un volumen final de 25 µl conteniendo 2,5 µl de buffer (10X), 1 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) (50 mM), 0,5 µl de dNTPs (10 µM), 1 µl de *primer* p519Fwd (10 µM), 1 µl de *primer* p520Rev (10 µM), 0,1 µl de *Taq* polimerasa *High Fidelity* (Invitrogen, 5U/ µl), 16,4 µl de agua DEPC y 2,5 µl de cada uno de los ADNc.

Utilizando como molde 5 µl del primer *round*, se realizó una reamplificación, utilizando el *primer* p519Fwd utilizado en el primer round y un primer reverso interno, el p523Rev, en un volumen final de 50 µl los cuales contenían 5 µl de buffer (10X), 2 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl de dNTPs (10 µM), 2 µl de *primer* p519Fwd (10 µM), 2 µl de *primer* p523Rev (10 µM), 0,2 µl de *Taq* polimerasa *High Fidelity* (Invitrogen, 5U/µl) y 32,8 µl de agua DEPC.

Las reacciones de amplificación fueron realizados en un termociclador *Corbett PalmCycler* CG-196 bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 45 segundos (seg), 53°C por 30 seg y 72°C por 4 min, y 10 min finales a 72°C. Para el segundo round las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 45 seg, 54°C por 30 seg y 72°C por 3 min; y 10 min finales a 72°C.

- b) Por otro lado, con aquellas muestras que no pudieron ser amplificadas con el protocolo de *heminested* PCR detallado anteriormente, se procedió a realizar la amplificación de la misma región que en el caso anterior (2836 pb) pero utilizando en este caso una estrategia de *One Step* PCR. La mezcla de reacción (volumen final de 30 µl) para realizar la *One Step* PCR fue la siguiente: 15 µl de mix de reacción 2X, conteniendo 0.4 mM de cada dNTP y 3.2 mM MgSO₄; 1 µl de *primer* p519Fwd (10 µM); 1 µl de *primer* p523Rev (10 µM); 0,2 µl de RNAsa OUT (40U/ µl;

Fermentas); 0,6 μ l de mix de retrotranscriptasa *SuperScript® III/Taq Platinum®* (Invitrogen); 7,2 μ l de agua DEPC y 5 μ l de ARN.

El ciclado para la *One Step* PCR fue: 45 min a 48°C para la etapa de RT; 95°C por 5 min; 45 ciclos de 95°C por 30 seg, 54°C por 30 seg, 68°C por 3 min; y 10 min finales a 68°C.

- c) Por último, se realizó la puesta a punto en el laboratorio de una *nested* PCR que nos permitió realizar la amplificación de una región parcial del gen que codifica para la NS3 comprendida entre el nt 3420 y el nt 4189 (referente a la cepa H77 de VHC). Esta PCR fue diseñada a fin de obtener secuencias más cortas que pudieran ser clonadas para realizar un posterior estudio de las variantes de las cuasiespecies. Esta PCR nos permitió amplificar los primeros 767 nucleótidos del gen de NS3 (256 aa), y por ende abarca el dominio proteasa completo. El protocolo de esta *nested*-PCR incluyó un primer *round* con un protocolo de *One Step* PCR utilizando los *primers* P1aF1 y P1aR1 y un segundo *round* de PCR con los *primers* P1aF2 y P1aR2 descritos previamente por Peres da Silva, de Almeida & Lampe, 2010 (Tabla 2).

La mezcla de reacción del primer *round* (*One Step*) fue realizada en un volumen final de 30 μ l y contenía los siguientes reactivos: 15 μ l de mix de reacción 2X, conteniendo 0.4 mM de cada dNTP y 3.2 mM MgSO₄; 1 μ l de *primer* P1aF1 (10 μ M); 1 μ l de *primer* P1aR1 (10 μ M); 0,2 μ l de RNasa OUT (40U/ μ l; Fermentas); 0,6 μ l de mix de retrotranscriptasa *SuperScript® III/Taq Platinum®* (Invitrogen); 7,2 μ l de agua DEPC y 5 μ l de ARN. Para el caso del segundo *round* la mezcla de reacción para un volumen final de 50 μ l fue la siguiente: 10 μ l de buffer (5X), 1 μ l de dNTPs (10 mM), 2 μ l de *primer* P1aF2 (10 μ M), 2 μ l de *primer* P1aR2 (10 μ M), 1 μ l de *Taq Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (2U/ μ l), 33 μ l de agua DEPC y se utilizó como molde 1 μ l del primer *round*.

Esta reacción de amplificación se realizó en un termociclador programable *Corbett PalmCycler* CG-196 bajo las siguientes condiciones: 45 min a 45°C para el paso de RT de la *One Step* PCR; 2 min a 94°C; 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°C por 30 seg y 68°C por 90 seg; y 5 min finales a 68°C. El ciclado para el segundo *round* fue

el siguiente: 98°C por 5 min; 40 ciclos de 98°C por 45 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 90 seg; y finalmente 72°C durante 5 min.

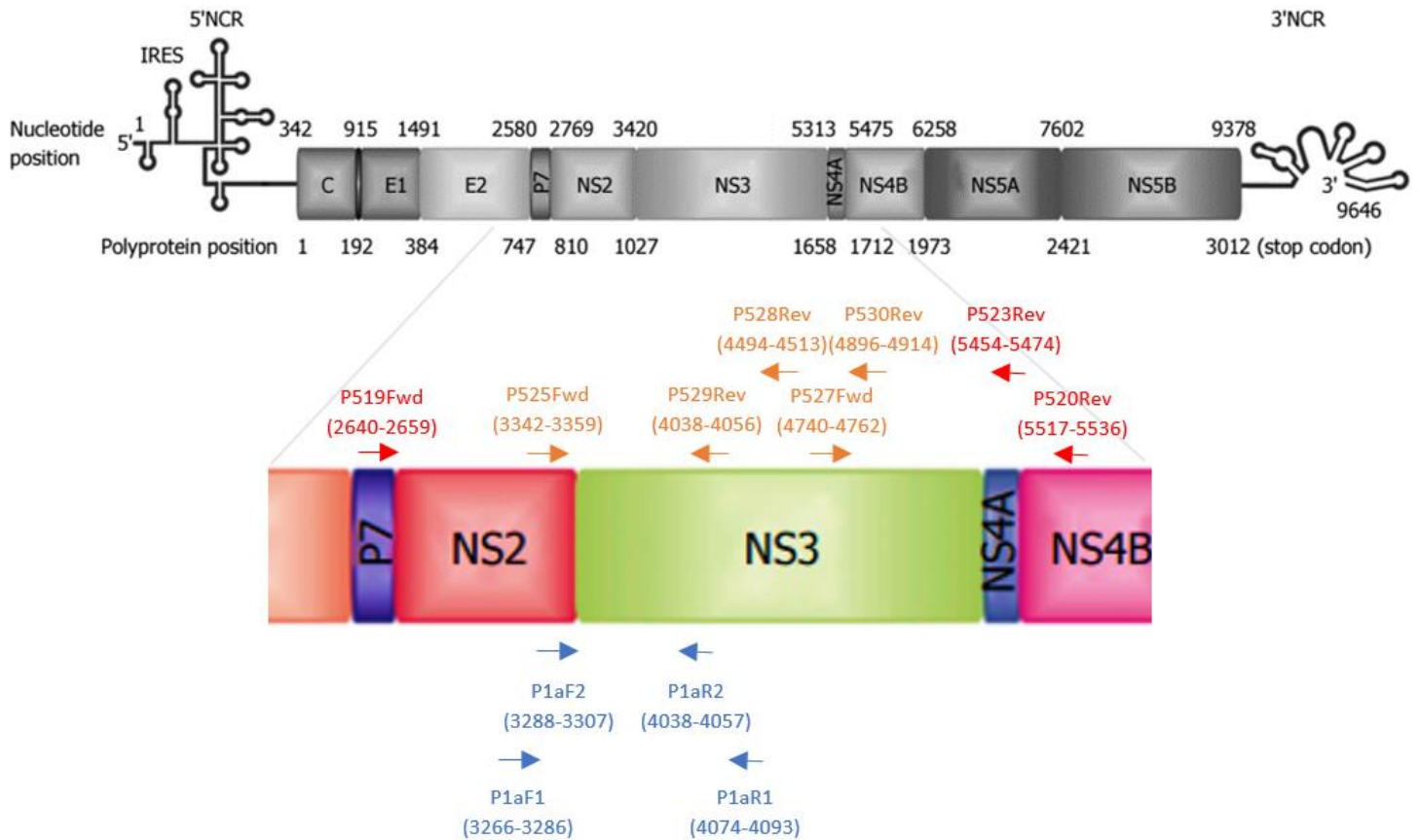


Figura 8. Esquema de la localización de los *primers* utilizados para la amplificación de la región que codifica para la proteasa NS3 de VHC. En referencia al genoma de VHC cepa H77 (NCBI Accession Number: JX472009), en color rojo se indican los *primers* utilizados para la aproximación de heminested PCR y de *One Step* PCR y en color azul los *primers* utilizados en la nested-PCR. En color anaranjado se visualizan los *primers*, utilizados para la secuenciación de NS3. (Modificado de Echeverría et al., 2015).

Tabla 2. *Primers* utilizados para la amplificación y secuenciación de NS3.

Nombre	Secuencia	Referencia
<i>Primers para amplificación de secuencia NS3 completa.</i>		
P519Fwd	5' - TCC TTC CTY GTG TTC TTC TG - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P520Rev	5' - GCC TTC TGY TTG AAY TGC TC - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P523Rev	5' - GCA CTC YTC CAT CTC ATC GAA - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P525Fwd	5' - CCC GTC TCY GCC CGW AGG - 3'	(Vicenti et al., 2012)
<i>Primers para amplificación de secuencia NS3 parcial.</i>		
P1aF1	5' - CCT YTC CCR RAT GGA GAC CAA - 3'	(Peres da Silva, de Almeida & Lampe, 2010)
P1aR1	5' - ACY TTR TAG CCY TGR GCY GC - 3'	(Peres da Silva, de Almeida & Lampe, 2010)
P1aF2	5' - CTY ATC ACG TGG GGG GCR GA - 3'	(Peres da Silva, de Almeida & Lampe, 2010)
P1aR2	5' - TTR GTG CTY TTR CCG CTG CC - 3'	(Peres da Silva, de Almeida & Lampe, 2010)
<i>Primers utilizados para la secuenciación de NS3.</i>		
P519Fwd	5' - TCC TTC CTY GTG TTC TTC TG - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P520Rev	5' - GCC TTC TGY TTG AAY TGC TC - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P523Rev	5' - GCA CTC YTC CAT CTC ATC GAA - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P525Fwd	5' - CCC GTC TCY GCC CGW AGG - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P527Fwd	5' - GAC CCY ACC TTY ACC ATT GAG AC - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P528Rev	5' - AGR TGY CTC CCC CCC TTG AT - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P529Rev	5' - TRG TGC TCT TRC CGC TGC C - 3'	(Vicenti et al., 2012)
P530Rev	5' - AGC CCG CGT CAT AGC ACT C - 3'	(Vicenti et al., 2012)

Para cada reacción de amplificación se usó como control positivo un ARN de VHC ya evaluado como positivo. Con el fin de impedir resultados falsos positivos causados por una contaminación durante la RT *nested* PCR, se tomaron las siguientes precauciones: a) se trabajó en un laboratorio con dos áreas independientes: una de pre amplificación y la otra de post-amplificación. En la primera se realizó el procesamiento de los ácidos nucleicos (ARN), la síntesis de ADNc y la preparación de las soluciones para la reacción de PCR. En el área de post-amplificación se realizaron la amplificación, las electroforesis en geles de agarosa y

la visualización de los productos de PCR en un procesador de imágenes (*UNIVERSAL HOOD II* de BIO-RAD). Cada una de estas áreas consta de su propio instrumental de laboratorio (micropipetas, gradillas, tubos) minimizando así las posibilidades de contaminación; b) tanto la *nested* PCR como la *heminested* se realizaron siempre en una cámara especial para este objetivo. Esta cámara cuenta con un dispositivo de luz ultravioleta con el fin de degradar todos los restos de productos de PCR que puedan contaminar las reacciones de PCR; c) se utilizó en cada experimento como mínimo un control negativo de amplificación (blanco con H₂O DEPC).

4.5 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1%, en *buffer* TAE 1X con SYBR® *Safe - DNA Gel Stain* (Invitrogen) como intercalante. Posterior a la corrida, fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta y fueron fotografiados en un procesador de imágenes *UNIVERSAL HOOD II* de BIO-RAD.

4.6 Purificación de productos de PCR

Los amplicones fueron purificados, a fin de ser enviados para su secuenciación, mediante los kits comerciales *Gel Extraction and Purification Kit* (Invitrogen) y *QIAquick Gel extraction Kit* (QIAGEN), según instrucciones del fabricante.

4.7 Secuenciación de los productos de PCR

La secuenciación de los productos de PCR obtenidos fue realizada en el servicio de secuenciación de Macrogen (Korea) y en el servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo. Cada producto de PCR fue secuenciado bidireccionalmente. Los *primers* utilizados para la secuenciación se pueden observar en la Figura 8 y en la Tabla 2.

4.8 Genotipificación de VHC

Con el fin de realizar la genotipificación de VHC proveniente de las muestras recolectadas en el marco de este trabajo de tesis, las secuencias de NS3 obtenidas (1893 pb) fueron alineadas con 59 secuencias representativas de los diferentes genotipos de VHC provenientes de diferentes regiones del mundo (ver Apéndice – Tabla Suplementaria 1). Estas secuencias fueron obtenidas de la base de datos de VHC de Los Alamos (Kuiken et al., 2005) y el alineamiento fue realizado mediante el *software CLUSTAL W* (Thompson, Higgins & Gibson, 1994). A fin de determinar el modelo evolutivo que mejor se adaptaba a nuestro juego de datos se utilizó el programa *Modelgenerator* (Keane, Creevey, Pentony, Naughton & McInerney, 2006). Posteriormente este modelo fue utilizado para la construcción de árboles filogenéticos por el método de máxima verosimilitud utilizando el *software MEGA 5.0* y como medida de robustez de cada uno de los nodos se empleó el método de *bootstrap* con 500 pseudo-réplicas (K. Tamura et al., 2011).

4.9 Análisis de firmas de secuencia

Con el propósito de identificar posibles patrones de diversificación local a nivel de NS3, se realizó el estudio de las firmas de secuencia. Este estudio comprendió la comparación de un set de datos conformado por las secuencias de cepas uruguayas obtenidas en este trabajo más las secuencias obtenidas en la base de datos provenientes de Brasil (único país de Sudamérica que había reportado secuencias de NS3 al momento del estudio) respecto a un set de datos con secuencias de NS3 proveniente de cepas del resto del mundo (Norteamérica, Europa, y Asia y Oceanía). Esto se llevó a cabo utilizando el programa VESPA (*Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis*), el cual nos permite identificar sitios particulares en alineamientos de aminoácidos o nucleótidos que se encuentran representados de distinta forma en cada uno de los *datasets* (Korber & Myers, 1992). El set de datos problema, con secuencias de Uruguay y Brasil, contaba con 26 secuencias de subtipo 1a, de las cuales 13 fueron obtenidas en este trabajo. El set de datos con secuencias del resto del mundo incluyó 146 secuencias de NS3 correspondientes al subtipo 1a de distintas partes del mundo que fueron descargadas de la base de datos de VHC de Los Alamos (Kuiken et al., 2005) (ver

Apéndice – Tabla Suplementaria 2). Estas secuencias fueron traducidas a proteína, secuencias sobre las cuales se realizó este estudio.

La visualización de los resultados fue realizada mediante la utilización del programa *weblogo* (Crooks et al., 2004). La significancia se estableció mediante el test estadístico *Fisher's exact test*, utilizando el programa *GraphPad Prism*, versión 5.01 para *Windows*.

4.10 Análisis de sustituciones en NS3 a nivel de la secuencia consenso

Cada una de las secuencias de NS3 obtenidas en este trabajo fueron traducidas a secuencia de aminoácidos y comparadas posteriormente con una “secuencia de referencia consenso mundial” (del genotipo correspondiente) a fin de identificar las sustituciones presentes en cada una de las mismas.

Esta “secuencia de referencia consenso mundial” fue generada, para cada uno de los subtipos estudiados (1a y 1b), a partir de secuencias de NS3 circulantes en diferentes países del mundo (108 secuencias de genotipo 1a y 109 secuencias de genotipo 1b), mediante la utilización del programa *Lasergene SeqMan* versión 7.0.0 (DNASTAR. Madison, WI) (ver Apéndice - Tablas suplementarias 2 y 3).

Utilizar estas secuencias reconstruidas a partir de diferentes secuencias de NS3 mundiales tuvo como propósito que las sustituciones observadas en las muestras estudiadas no se confundieran con variaciones derivadas de la diversificación regional de este virus.

Asimismo, se utilizó la herramienta *Geno2pheno[HCV]* (*g2p[HCV]*) (Kalaghatgi et al., 2016), para analizar las posibles sustituciones de resistencia. Esta herramienta, analiza los primeros 181 residuos aminoacídicos de NS3 (dominio proteasa) y permite realizar el análisis de secuencias problema de VHC, estableciendo el genotipo y subtipo de cada secuencias y el perfil de resistencia de forma rápida, fácil, actualizada y de acceso libre (Kalaghatgi et al., 2016).

4.11 Estudio de la diversidad de las cuasiespecies de NS3 de genotipo 1a por clonado

Con el objetivo de realizar el estudio de variantes de la nube de mutantes, se seleccionaron 3 muestras del subtipo 1a que no habían mostrado, a nivel de la secuencia consenso, sustituciones de resistencia a IP.

Se procedió a realizar la amplificación de una región parcial de NS3 como se describe en punto 4.4 de esta sección, la cual incluye los primeros 256 aa de esta proteína. Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados como se mencionó anteriormente y se procedió al clonado de los mismos mediante el siguiente protocolo:

4.11.1 Adenilación

Los productos de PCR amplificados según punto 4.4 y purificados según punto 4.6 fueron adenilados para posteriormente ser ligados al vector *p-Gem T easy*. Este paso fue necesario debido que la polimerasa utilizada en el proceso de amplificación (*Taq Phusion*) produce extremos romos, por lo que necesitamos añadir una adenina (A) a ambos extremos para poder realizar la clonación de estos productos en el vector T. La cantidad de producto de PCR purificado a adenilar fue calculado teniendo en cuenta la concentración de cada una de las muestras, la longitud del vector en pb, el tamaño del producto de PCR a insertar y la cantidad de vector para llegar a un factor de 3 veces más inserto que vector según:

$$\text{Cantidad de producto a ligar (ng)} = \left[\frac{\text{cantidad de vector (ng)} \times \text{tamaño del producto de PCR (pb)}}{\text{Tamaño del vector (pb)}} \right] \times 3$$

La mezcla de adenilación utilizada fue la siguiente: 1 µl de buffer (10X), 0,5 µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dATP (10 mM), 1 µl de Taq polimerasa recombinante (Fermentas, 5U/µl), H₂O DEPC y producto de PCR purificado para llegar a 10 µl totales. La mezcla de adenilación fue incubada en el termociclador durante 30 minutos a 72°C.

4.11.2 Ligación en el vector *pGEM®-T Easy*

El producto de PCR purificado y adenilado fue posteriormente ligado en el vector *pGEM®-T Easy* (Promega).

Los sistemas vectoriales *pGEM®-T* son sistemas convenientes para clonar productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables. Estas polimerasas a menudo añaden una sola desoxiadenosina, de una manera independiente del molde, a los extremos 3' de los fragmentos amplificados. Los vectores *p-GEM T easy* presentan timidinas desapareadas en los extremos 3' lo que mejora en gran medida la eficacia de la ligación de un producto de PCR, evitando la recirculación del vector y proporcionando un extremo cohesivo compatible para la ligación de productos de PCR con extremos cohesivos de A.

El vector *pGEM- T easy*, como muchos vectores plasmídicos comúnmente usados en el laboratorio para el clonado de genes de interés, porta un segmento del ADN de *E. coli* con la secuencia regulatoria y la información codificante para los primeros 146 aminoácidos de la β -galactosidasa (péptido α), donde también se encuentra el sitio de policlonado del vector. Este tipo de vectores pueden ser utilizados en cepas bacterianas que expresan la porción carboxi-terminal de la β -galactosidasa (péptido ω), y al ser transformadas con el plásmido, podrán sintetizar la enzima de forma completa y activa. Esto es lo que se denomina α -complementación. Los promotores de ARN polimerasa T7 y SP6 flanquean una región de clonación múltiple dentro de la región codificante del péptido alfa de la β -galactosidasa. La inserción del producto de PCR en el vector produce inactivación del péptido α y permite que, una vez transformadas las bacterias (las cuales tienen el operón lac Z pero carecen del péptido α), los clones recombinantes sean identificados directamente mediante la selección blanco/azul en placas indicadoras. Asimismo, estos vectores portan un gen de resistencia a la ampicilina (Figura 9), de forma que en un medio con ampicilina solo crecerán aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido.

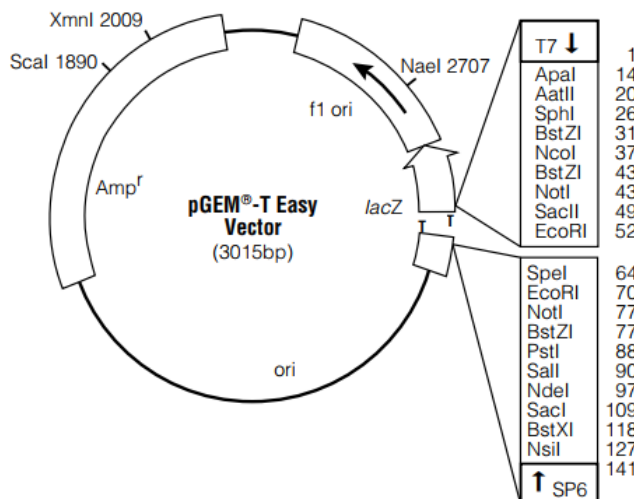


Figura 9. Estructura del vector pGEM®-T Easy (Promega). Puntos de referencia en la secuencia del vector: sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa T7 (1); región de clonado múltiple (10–128); promotor de la ARN polimerasa SP6 (posiciones -17 a +3) (139–158); sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa SP6 (141); inicio del codón lacZ (180); región codificante para la β -lactamasa, resistencia a ampicilina (1337–2197); región del fago f1 (2380–2835); secuencias del operon lac (2836–2996; 166–395), promotor de la ARN polimerasa T7 (posiciones -17 a +3) (2999–3).

Para proceder con la ligación en el vector T se realizó, en un volumen final de 10 μ l, el siguiente mix de reacción: 5 μ l de buffer de ligación (2x); 1 μ l del vector pGEM®-T Easy (50ng/ μ L); 1 μ l de DNA Ligasa T4 (3U/ μ l); y 3 μ l del producto de purificado y adenilado. La mix fue incubada a 4°C *overnight*.

4.11.3 Transformación y plaqueo

Una vez culminada la ligación del producto de PCR en el vector pGEM- T easy, se procedió a la transformación en células competentes *E. coli* XL1-Blue y *E. coli* DH5 α .

La cepa bacteriana *E. coli* XL1-Blue es muy utilizada en biología molecular dada las mutaciones artificiales que hacen que sea apropiada para el trabajo con plásmidos recombinantes; además, permite la selección de recombinantes por α -complementación. Esta selección también se puede realizar con *E. coli* DH5 α , cepa que ofrece una gran estabilidad del inserto y alto rango de eficiencia.

Con el fin de realizar la transformación, se descongelaron viales de células XL1 Blue/DH5 α colocándolos en hielo de 5 a 10 min. Luego se les agregó a estas células 10 μ l de ligación y se incubó en hielo por 20 min. Finalmente se les realizó un *heat shock* durante 1 min a 42°C.

El total del volumen de cada vial fue plaqueado en placas de LB agar con ampicilina (a una concentración final de 100 μ g/ml), IPTG (1 M) y X-Gal (2%). Finalmente, las placas fueron colocadas en estufa a 37°C durante 16 a 18 horas.

El IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactósido) es un análogo de la lactosa que no puede ser utilizado como fuente de carbono o energía por las bacterias. Cuando es agregado al cultivo de una bacteria que posee el operón lac, como en el caso de las *E. coli*, actúa inactivando al represor lacZ, induciendo de esta forma la transcripción del operón.

La actividad de la enzima β -galactosidasa se puede evidenciar con el sustrato cromogénico X-gal (5-bromo 4-cloro 3-indolil beta D galactósido), que es convertido en un compuesto azul insoluble una vez que es hidrolizado. Por tanto, aquellas bacterias que incorporan el vector sin inserto generan colonias de color azul ya que ocurre el fenómeno de alfa-complementación (se produce el fragmento α de la β -galactosidasa a partir del vector, y el fragmento ω a partir del episoma de la bacteria). Sin embargo, las que incorporan el vector con el inserto de interés generan colonias de color blanco, ya que no pueden metabolizar el X-gal debido a la falta del péptido α (el inserto en el vector genera un fragmento α no funcional).

Finalizado el tiempo de incubación, se seleccionaron 100 colonias blancas por muestra y fueron crecidas en 2 mililitros (ml) de LB con ampicilina (a una concentración final de 100 μ g/ml) por 18 horas a 37°C y con una agitación de 220 revoluciones por min (rpm). Tras las 18 horas de crecimiento, las muestras fueron centrifugadas durante 3 minutos a velocidad máxima. Posteriormente los pellets bacterianos fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

4.11.4 Extracción plasmídica por MiniPrep

Las miniprep fueron realizadas con el kit *PureLink Quick Plasmid MiniPrep* (Invitrogen) según instrucciones del proveedor, así como también mediante miniprep por lisis alcalina *In house* (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989).

4.11.5 PCR para verificar inserto

A fin de verificar la presencia del inserto de interés, se realizó una PCR convencional con *primers* universales (M13F y M13R) que hibridan en los extremos del sitio múltiple de clonado. Éstos permiten diferenciar una muestra con inserto (que amplificará un producto de PCR de 1000 pb aproximadamente) de una que no lo posea (producto de PCR de 231 pb). Para la realización de esta PCR se preparó, en un volumen final de 25 µl, la siguiente mezcla de reacción: 2,5 µl de buffer (10X), 0,5 µl de dNTPs (10 µM), 1 µl de *primer* M13F (10 µM), 1 µl de *primer* M13R (10 µM), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,25 µl de Taq polimerasa recombinante (Fermentas, 5U/µl), 17,25 µl de H₂O DEPC y 1 µl de ADN de miniprep.

El ciclado de la PCR para la verificación de inserto fue: 10 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 90 seg; y 10 min finales de 72°C.

Las muestras que resultaron positivas para esta reacción de PCR fueron enviadas para su secuenciación (con los *primers* M13F y M13R) al servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo.

4.11.6 Análisis de mutaciones en NS3 de las variantes de las cuasiespecies

Las secuencias obtenidas para cada una de las muestras fueron traducidas a secuencia de aa y alineadas con las secuencias consenso correspondiente a cada una de las muestras analizadas y con la “secuencia de referencia consenso mundial” 1a, mediante la utilización del programa *Lasergene SeqMan* versión 7.0.0 (DNASTAR. Madison, WI).

4.11.7 Análisis de escalamiento multidimensional (MDS)

Con el objetivo de evidenciar las relaciones entre las variantes de la cuasiespecie de las muestras analizadas se llevó a cabo un análisis de escalamiento multidimensional (MDS). Estos análisis fueron realizados en colaboración con el MSc. Martín Sónora (Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias; Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares, Institut Pasteur de Montevideo).

El MDS es un procedimiento exploratorio multivariable diseñado para identificar patrones en una matriz de distancia. En este sentido, cuando se aplica a secuencias nucleotídicas, el MDS se puede comparar a métodos de *neighbour-joining*. De todos modos, en estos métodos las secuencias son consideradas por progresión en pares para establecer un árbol binario, mientras que en el MDS las secuencias se consideran como un todo para determinar un espacio de secuencia. En este caso, las secuencias se encuentran representadas, en un espacio euclidiano de 2 dimensiones, por puntos cuyas respectivas distancias son las que mejor se aproximan a las distancias originales (Chen, Shang & Xu, 2014).

En el programa R, se utilizaron *scripts* para calcular distancias genéticas, lo que dio lugar a matrices de distancia. Estas matrices de distancia se calcularon con el paquete *dist.dna*, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica *Tamura & Nei 1993* (TN93) que considera transversiones y transiciones a distintas probabilidades. Los resultados se visualizaron en un gráfico que se obtuvo con el programa R.

4.12 Análisis de localización de las sustituciones encontradas en la estructura de NS3 de VHC

Aquellas sustituciones encontradas en las cepas uruguayas, a nivel de la secuencias consenso y de variantes de la cuasiespecie, las cuales no han sido al momento asociadas con la generación de fenotipos resistentes, fueron estudiadas mediante su localización en la estructura secundaria y mapeo en la estructura 3D de NS3.

Se utilizó el programa *ESPrpt* 3.0 para identificar en qué regiones particulares de la estructura secundaria se ubican estas sustituciones (Robert & Gouet, 2014). Para este análisis se tomó como secuencia de referencia la cadena A de la estructura 3D de NS3 previamente reportada por Schiering y colaboradores [PDB *accession number* 4A92] (Schiering et al., 2011). Para el alineamiento se calcula un porcentaje de equivalencia considerando las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos y un *global score* (0.7), el cual indica si la similaridad asignada a una columna del alineamiento es mayor al valor predeterminado; de ser así los residuos se consideran de alta similaridad y se colorean en rojo (Robert & Gouet, 2014).

Por otra parte, las sustituciones de las cepas uruguayas, tanto a nivel de la secuencias consenso como a nivel de variantes de la cuasiespecie, sin asociación a la generación de fenotipos resistentes, se analizaron por mapeo en la estructura 3D de NS3 [PDB *accession number* 4A92; (Schiering et al., 2011)] utilizando el *software PyMol* (Seeliger & De Groot, 2010). Este mapeo se realizó con el fin de determinar si alguna de estas sustituciones podría encontrarse, en la estructura tridimensional, cercana al sitio activo, cercanas a RASs ya caracterizadas o en alguna otra región de interés.

4.13 Docking Molecular

Se realizó el *docking* molecular de aquellas mutaciones que en los estudios de mapeo resultaron de interés. A través de éste método se puede predecir la mejor orientación de una molécula respecto a otra para unirse en un complejo estable y se podrá predecir así la fuerza de asociación o afinidad de unión entre ambas moléculas (Seeliger & De Groot, 2010).

El *docking* molecular se llevó a cabo mediante el servidor web HADDOCK versión 2.2 (Van Zundert et al., 2016). Este servidor integra la información derivada de estudios bioquímicos, biofísicos y bioinformáticos para mejorar el análisis. Se utilizó la interface más básica (*Easy Interface*), que permite cargar dos estructuras en formato PDB o descargarlas directamente desde la web, y permite a los usuarios configurar los residuos activos o pasivos que representan la interfaz, como por ejemplo los residuos activos de la tríada catalítica de una enzima (Van Zundert et al., 2016). En nuestro caso las estructuras analizadas fueron: la

estructura 3D de NS3 (PDB *accession number* 4A92) y la estructura de la droga PTV modelada manualmente, mediante la herramienta JME Molecular Editor (Ertl, 2010), y en formato PDB.

Se eligió como droga a analizar el inhibidor de la proteasa PTV por ser una DAA de última generación, cuyo uso está aprobado en Uruguay mediante la implementación del pack comercial Viekira (junto con un inhibidor de NS5A y un inhibidor del citocromo p450, en combinación con un inhibidor no nucleósido de la polimerasa NS5B).

Una vez realizado el análisis, el servidor web HADDOCK brinda una lista de posibles estructuras, organizadas según un HADDOCK *score*. Esta lista ordena las posibles estructuras en *clusters* donde se verán distintos posicionamientos del ligando respecto a la enzima. Cada uno de estos *clusters* despliega estadísticas detalladas y los ordenará según el HADDOCK *score*, así como también según datos de energías estándar (van der Waals, etc.) (Van Zundert et al., 2016).

Las condiciones a evaluar en estos ensayos consistieron en:

- a. Sin mutar – Esta condición *wild type* permitió evaluar el posicionamiento del PTV respecto a la proteína y medir distancias entre la tríada catalítica y la droga, mediciones que se tomaron como basales
- b. Mutando a la RAS D168Y - Esta sustitución genera un nivel alto de resistencia a PTV (Pilot-Matias et al., 2015) y se eligió para estimar las distancias en un modelo de resistencia
- c. Mutando a la sustitución de interés – Las distancias medidas en esta condición permitieron comparar con el control *wild type* y el control resistente

Las mutaciones incorporadas (D168Y y de interés) se realizaron por mutagénesis puntual de la estructura 4A92 en el *software* PyMOL, para luego proceder a realizar un nuevo *docking* molecular con cada sustitución incorporada.

5. Resultados

5.1 Puesta a punto de la amplificación de la región genómica que codifica para NS3 del genoma de VHC

Con el fin de realizar la amplificación de la región genómica que codifica para la proteasa NS3 de VHC de las muestras uruguayas, se procedió a la puesta a punto de 3 aproximaciones diferentes, como fue detallado en Materiales y Métodos.

En una primera instancia, se logró la puesta a punto de una heminested PCR que nos permitió amplificar un producto de 2836 pb que abarca parte de la región codificante de la proteína NS2, toda la región codificante de NS3 y parte de la región que codifica para NS4A, utilizando los *primers* p519Fwd, p520Rev y p523Rev (Figura 10 A).

En una segunda etapa y con el fin de contar con una metodología alternativa para aquellas muestras que no podían ser amplificadas por el procedimiento anterior, se realizó la puesta a punto de una *One Step* PCR que amplifica la misma región de 2836 pb a partir de los *primers* p519Fwd y p523Rev (Figura 10 B).

Por último, para el estudio de las variantes que componen la cuasiespecie, se realizó la puesta a punto de una nested PCR que amplifica una región parcial de NS3 comprendida entre el nt 3420 y el nt 4189 del genoma de VHC (797 pb). En el primer *round* de esta última aproximación se implementó un protocolo de *One Step* PCR utilizando los *primers* P1aF1 y P1aR1 y en un segundo round una PCR convencional con los *primers* P1aF2 y P1aR2 (Figura 10 C).

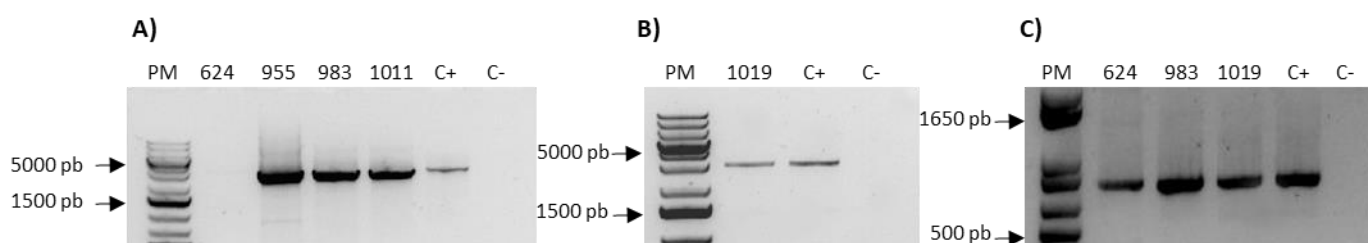


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de PCR de NS3 obtenidos por A) heminested PCR (2836 pb); B) One Step PCR (2836 pb); C) nested PCR (767 pb). Se realizaron geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X conteniendo SYBR® Safe - DNA Gel Stain (Invitrogen) como intercalante. Los pesos moleculares empleados fueron 1 kb Plus de Fermentas (A y B) y 1 kb Plus de Invitrogen (C). Se observaron en transiluminador UV y se fotografiaron en procesador de imágenes UNIVERSAL HOOD II de BIO-RAD. Para todos los casos los números ejemplifican diferentes muestras analizadas. C+, control positivo; C-, control negativo.

5.2 Variabilidad genética de NS3

Con el fin de estudiar la variabilidad genética a nivel de la región NS3 del genoma de VHC de cepas circulantes en pacientes uruguayos, las secuencias obtenidas en este trabajo fueron alineadas con secuencias de la región completa de NS3 correspondientes a 59 cepas de VHC aisladas en el mundo y que representan todos los genotipos y los principales subtipos de este virus (ver Apéndice – Tabla Suplementaria 1). Estas secuencias fueron obtenidas de la base de datos de Los Alamos (Kuiken et al., 2005). Todas las secuencias fueron alineadas utilizando el software CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Mediante la utilización del programa *Modelgenerator* se estableció que el modelo evolutivo que mejor se adaptaba a nuestro set de datos era el GTR + I + γ (modelo *General Time Reversible* + sitios invariables + distribución gamma) (Keane et al., 2006). Posteriormente, utilizando este modelo evolutivo, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud con un *bootstrap* de 500 pseudo-réplicas como apoyo estadístico a los nodos. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 11.

Como se puede observar en la figura, todas las cepas se agrupan de acuerdo a su genotipo (1 al 7) y cada clado se encuentra avalado por un alto valor de *bootstrap*. Todas las cepas aisladas de pacientes uruguayos (n=15) agruparon junto a secuencias de cepas correspondientes al G1. Dentro del G1, se puede observar que 13 de ellas agrupan junto con el subtipo 1a, mientras que únicamente 2 agrupan con el subtipo 1b.

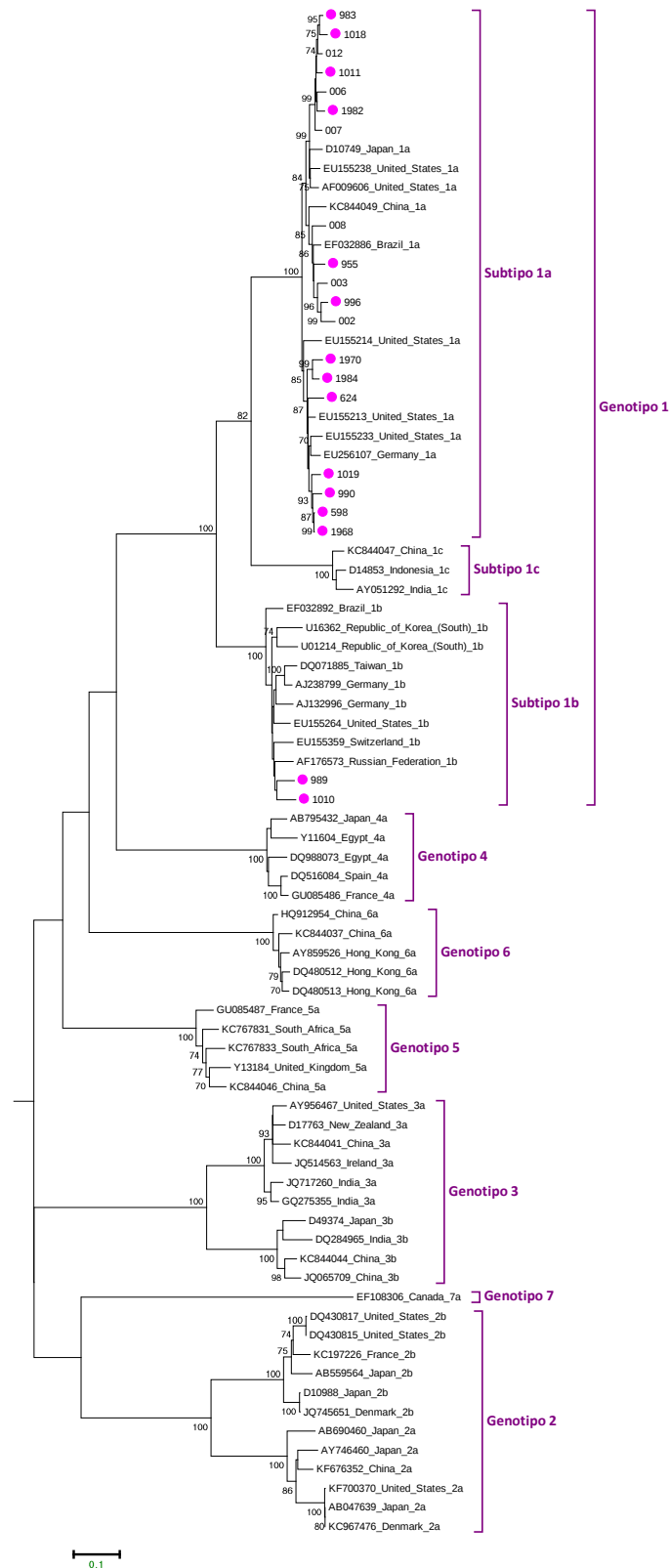


Figura 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región NS3 (1893 pb) del genoma de VHC. Árbol filogenético realizado con el modelo evolutivo GTR + I + γ y el método de máxima verosimilitud. Las cepas de referencia se indican por su número de acceso, país y genotipo. Las cepas uruguayas se muestran con círculos violetas y por su número de aislamiento. Los números en cada nodo indican los valores de *bootstrap*. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia.

5.3 Búsqueda de firmas de secuencias en las cepas uruguayas a nivel de la proteína NS3

Con el fin de probar si las secuencias NS3 de cepas de VHC aisladas en América del Sur tenían alguna firma de secuencia particular que pudiera estar indicando el resultado de la diversificación local de estas cepas, se procedió a realizar el estudio de firma de secuencia utilizando el programa VESPA (*Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis*). Este análisis identifica sitios particulares en un alineamiento de aa que son significativamente representativos en un determinado grupo en comparación con un grupo de referencia.

Con este propósito se analizó un set de datos de secuencias de NS3 de VHC de cepas circulantes en la región, conformado por secuencias de Brasil y Uruguay (set de datos problema), y se lo comparó contra un set de datos con secuencias de NS3 de cepas aisladas del resto del mundo (set de datos *background*).

Este estudio nos permitió identificar sitios particulares en alineamientos de aa que están representados de forma diferente entre nuestro set de datos problema y el *background*. Los resultados de este estudio se pueden observar en la Figura 12.

Este análisis reveló cuatro sitios con diferencias en las frecuencias de aa (posiciones 386, 418, 557 y 615), de los cuales sólo la posición 418 mostró una variación significativa entre las secuencias NS3 del VHC de las cepas aisladas en América del Sur y las cepas aisladas en el resto del mundo ($p = 1,863 \times 10^{-6}$, *Fisher's exact test*). En esta posición, el 84,6% de las secuencias de cepas sudamericanas tuvo una tirosina (Y), mientras que en las cepas del set de datos *background* solo el 32,9% presentó una Y, en tanto la mayoría de las secuencias incluidas (65,8%) exhibió una fenilalanina (F).

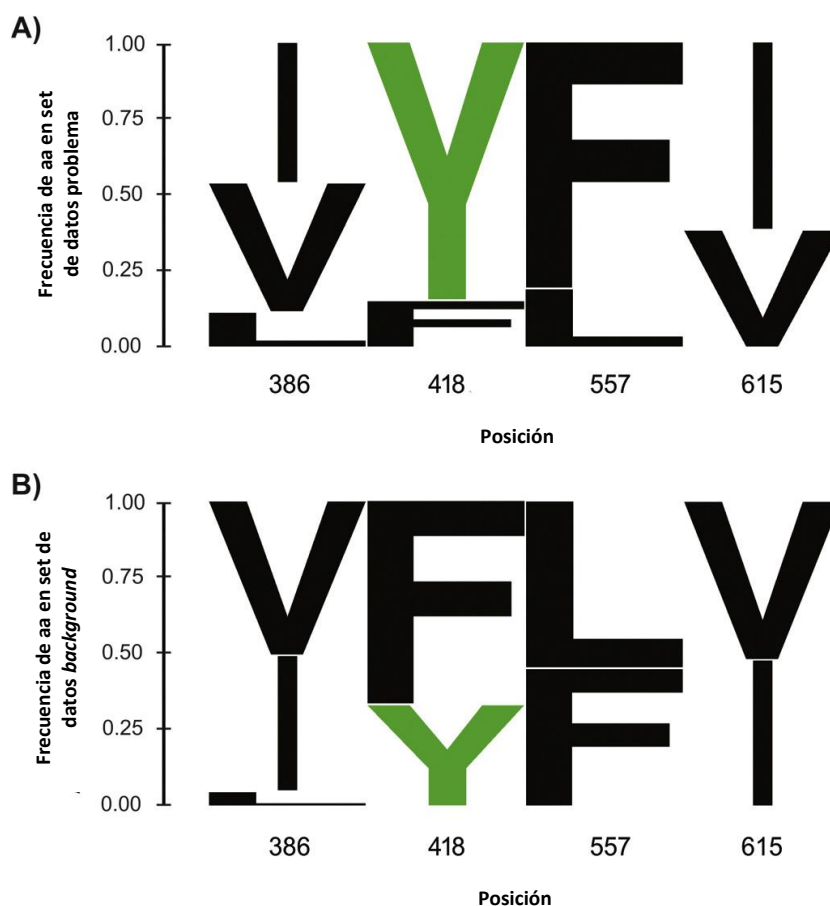


Figura 12. Representación del análisis de patrón de firma de secuencia (VESPA) por Weblogo. La altura de cada aa en cada posición indica su frecuencia. Se muestran las cuatro posiciones en la secuencia de NS3 donde se observaron diferencias de frecuencia de aa entre el set de datos problema (A) y el set de datos *background* (B). La tirosina en la posición 418 se muestra en verde. Esta representación esquemática fue realizada mediante la aplicación WebLogo 3 (Crooks et al., 2004).

5.4 Análisis de sustituciones halladas en la secuencia consenso de la región NS3 de cepas de VHC uruguayas

A fin de realizar un estudio que nos permitiera identificar las sustituciones de aa presentes en la proteína NS3 de VHC provenientes de pacientes uruguayos, las secuencias obtenidas fueron traducidas utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), alineadas y comparadas con la “secuencia de referencia consenso mundial” del genotipo correspondiente. Estas “secuencias de referencia consenso mundial”, una para el subtipo 1a y otra para el subtipo 1b, fueron generadas a partir de diferentes secuencias de NS3

mundiales, dado el reporte de altos porcentajes de polimorfismos en la secuencia de NS3 (Vallet et al., 2011), con el objetivo de que las sustituciones observadas en las muestras estudiadas no se confundieran con variaciones debidas a la diversificación de este virus.

Asimismo, las secuencias obtenidas en este trabajo fueron analizadas en busca de sustituciones de resistencia, con la herramienta web geno2pheno, la cual permite el análisis de los aa correspondientes al dominio proteasa de la proteína NS3 (aa 1 - 181), donde suelen encontrarse la gran mayoría de las RASs a IP (Kalaghatgi et al., 2016).

5.4.1 Sustituciones Asociadas a Resistencia (RASs)

En este trabajo fueron identificadas sustituciones asociadas a resistencia a inhibidores de la proteasa de primera, segunda y tercera generación (Tabla 3). Se identificaron RASs a IP en aislamientos de VHC de 4 pacientes (26,6% de los pacientes incluidos en este estudio). De estos pacientes, uno mostró la asociación de dos RASs diferentes, mientras que los 3 restantes presentaron, cada uno, una única sustitución asociada a resistencia a DAAs. La sustitución Q80K, asociada a susceptibilidad a ASV (McPhee et al., 2012), PTV (Pilot-Matias et al., 2015), GZV (FDA, 2016) y SMV (Lenz et al., 2010; Verbinnen et al., 2015), se halló en un paciente (subtipo 1a) en combinación con la RAS S122G, asociada a baja resistencia al SMV y cuando se halla en combinación con R155K, asociada a resistencia a VOX (Verbinnen et al., 2015). Para el caso de VHC subtipo 1b ha sido reportado que la presencia conjunta de las sustituciones Q80K y S122G no genera resistencia a SMV (Halfon & Locarnini, 2011; Howe et al., 2014; Lenz et al., 2010; Sorbo et al., 2018; Verbinnen et al., 2015; Zeuzem et al., 2015).

Los restantes 3 pacientes presentaron, cada uno, una única sustitución de resistencia, siendo éstas V55A, Q80L y R117H. La sustitución V55A genera resistencia a los DAAs de primera generación: TVR y BOC (Susser et al., 2009), así como susceptibilidad reducida al VOX si se halla junto a las sustituciones Q80R y D168E (Sorbo et al., 2018). La sustitución en la posición 80, pero en esta ocasión la sustitución Q80L, se ha encontrado que genera baja resistencia a PTV (Pilot-Matias et al., 2015) pero, de encontrarse con otras RASs complementarias, se asocia a la resistencia a VOX (D168E; T54S + V55I) (Sorbo et al.,

2018). La sustitución R117H genera susceptibilidad disminuida al TVR en el G1, tanto subtipo 1a como 1b (Martínez et al., 2017; Patiño-galindo et al., 2016).

Asimismo, es importante destacar que 3 pacientes exhibieron la sustitución P334S. Si bien esta sustitución no ha sido al momento considerada como una RAS, fue reportada como emergente en algunos pacientes recaedores y no respondedores a terapias que incluyen PTV (NS3) (AIDSinfo, 2017).

Tabla 3 – Sustituciones aminoacídicas en la región NS3 de VHC, asociadas a resistencia a DAAs, encontradas en pacientes uruguayos naïve al tratamiento.

Muestra	Subtipo	WT	Residuo	Variante	Resistencia a antivirales	Referencias
955	1a	V	55	A	Boceprevir/Telaprevir/ Voxilaprevir	Susser et al., 2009
996	1a	Q	80	K	Simeprevir/Asunaprevir/ Paritaprevir/Grazoprevir	McPhee et al., 2012; Pilot-Matias et al., 2015; FDA, 2016; Lenz et al., 2010; Verbinnen et al., 2015
		S	122	G	Simeprevir/ Voxilaprevir	Verbinnen et al., 2015
1018	1a	Q	80	L	Paritaprevir/Voxilaprevir	Pilot-Matias et al., 2015; Sorbo et al., 2018
1010	1b	R	117	H	Telaprevir	Martínez et al., 2017; Patiño-galindo et al., 2016

5.4.2 Polimorfismos Asociados a Resistencia (RAPs)

Mediante este análisis fueron identificados también polimorfismos asociados a resistencia (RAP, por sus siglas del inglés: *Resistance Associated Polymorphism*). Las RAPs son cambios aminoacídicos en posiciones en las que se ha reportado que algún cambio particular genera resistencia. Las RAPs halladas en este estudio se encontraron en las posiciones 117, 39 y 170, siendo éstas la R117C, la A39T/S/G, I170V y V170I. En la posición 117 la RAS reportada es la R117H, la cual ha mostrado otorgar susceptibilidad disminuida a TVR (Susser et al., 2012). En cuanto a la posición A39, la sustitución asociada a resistencia es la A39V, la cual ha sido reportada como resistente a un inhibidor antagonista del cofactor

NS4A (Yang et al., 2008). Respecto a la posición 170, donde se han reportado las RASs V170A/T, en este estudio se detectó la sustitución I170V en uno de los pacientes subtipo 1a, y en el caso del subtipo 1b, donde esta posición es polimórfica (V/I), uno de los pacientes presentaba una I y el otro una V. Estas sustituciones se han visto emerger en *relapers* o asociadas a fenotipos resistentes junto a otras sustituciones (Lenz et al., 2010; Sorbo et al., 2018; Verbinen et al., 2015).

5.4.3 Sustituciones no asociadas *a priori* a resistencia a DAAs

En este estudio también se evidenció la presencia, tanto en pacientes infectados con VHC subtipo 1a como aquellos con subtipo 1b, de diversas sustituciones aminoacídicas las cuales no han sido asociadas *a priori* a resistencia a DAAs. Estas sustituciones se describen en la Tabla 4. Como se puede observar en esta tabla, se encontró un número mucho mayor de sustituciones en las cepas pertenecientes al subtipo 1a con respecto a las encontradas en las cepas del subtipo 1b, lo cual puede relacionarse directamente al número de muestras analizado para cada uno de los subtipos (13 y 2, respectivamente).

Como se esperaba, se encontró gran conservación a nivel de los aa involucrados en la tríada catalítica, la cual consiste en un residuo de histidina, uno de ácido aspártico y uno de serina en las posiciones 57, 81 y 139, respectivamente. Se observó, además, una alta conservación en los residuos que forman el sitio de unión al Zn (C97, C99, C145 e H149) y aquellos residuos N-terminales involucrados en la unión al cofactor NS4A (T3-Q9 y E32-T38) (Yan et al., 1998).

Entre las distintas sustituciones encontradas se destaca la sustitución A40T encontrada en 6 cepas del subtipo 1a. Esta sustitución implica un cambio en la posición 40 entre una alanina (A), apolar, y una treonina (T), polar, en una posición vecina a un sitio que sí se encuentra vinculado a resistencia a un inhibidor del cofactor NS4A (residuo 39) (Yang et al., 2008). Otras de las sustituciones encontradas más frecuentemente en las cepas de VHC pertenecientes a pacientes uruguayos fueron las sustituciones T46S, la I586T, V329I y la V609I. Las sustituciones T46S, V329I y V609I, no involucran cambios en la polaridad de los residuos, mientras que la sustitución a nivel de la posición 586 involucra el cambio entre un aminoácido apolar (isoleucina: I) y uno polar (T).

Otra de las sustituciones de interés observadas fue la P334H. Como se mencionó anteriormente, otro cambio en esta misma posición (P334S) fue reportado como emergente en algunos pacientes recaedores y no respondedores a terapias que incluyen PTV (NS3) (AIDSinfo, 2017).

Adicionalmente, se encontraron las sustituciones A150V y A151V, las que a nivel de secuencia primaria, se localizan contiguas a uno de los residuos involucrados en la interacción con el Zn (H149).

Asimismo, es importante destacar que se vieron sustituciones en regiones de interacción con otras proteínas (celulares y virales) como ser las sustituciones a nivel de las posiciones S7 y V33, las cuales se ubican en la región de unión al cofactor NS4A, y las sustituciones T550A y T550V, las cuales se encuentran en la región de NS3 que interactúa con la proteína celular APOBEC3G.

5.4.4 Localización de las sustituciones encontradas en el subtipo 1a en la estructura de NS3 de VHC

5.4.4.1 Análisis de localización de las sustituciones en la estructura secundaria

Con el objetivo de establecer en qué regiones particulares de la estructura secundaria se encontraban las sustituciones halladas en este trabajo, se utilizó el programa ESPript 3.0 (Robert & Gouet, 2014).

En la Figura 13 se muestra el alineamiento entre las secuencias obtenidas de las muestras uruguayas, la secuencia consenso mundial y la secuencia utilizada como referencia en cuanto a la estructura secundaria (cadena A de la estructura PDB ID: 4A92). En rojo se muestran las posiciones conservadas, mientras que en blanco se marcan las posiciones donde se encuentran cambios a nivel aminoacídico con respecto a la secuencia de referencia. Las posiciones polimórficas se marcan en celeste.

Como se puede observar en la Figura 13, en las cepas uruguayas subtipo 1a se encontraron 44 sustituciones que se ubican en 37 posiciones diferentes (se señalan con triángulos verdes). Estos cambios caen a lo largo de la proteína en diferentes tipos de estructuras secundarias, encontrándose sustituciones ubicadas a nivel de las estructuras en hojas β , en hélices α e inclusive en giros β estrictos. Dentro de estas sustituciones, las que resultaron interesantes

para análisis en mayor profundidad fueron la P67S y la P334H/S (se señalan con triángulos amarillos), ya que se pierde, en cada caso, una prolina en un giro β estricto, aa que es esencial para este tipo de conformaciones (Krieger, Möglich & Kiefhaber, 2005; Müller et al., 1993).

Tabla 4 - Sustituciones aminoacídicas en la región NS3 de VHC, no reportadas *a priori* como resistentes a DAAs, encontradas en pacientes uruguayos naïve al tratamiento.

1a				1b			
Residuo	Wild Type	Variante	N° de pacientes	Residuo	Wild Type	Variante	N° de pacientes
27	N	D	1	7	S	A	1
33	V	I	1	13	L	I	1
40	A	T	6	49	N	S	1
40	A	G	1	72	T	I	1
46	T	S	3	86	Q	P	1
64	I	L	2	102	S	T	1
67	P	S	1	153	I	V	1
68	K	N	1	213	K	R	1
68	K	G	1	264	P	S	2
71	V	I	1	340	A	S	1
86	P	A	1	383	G	S	2
89	Q	H	2	386	L	I	1
124	G	A	1	402	T	A	1
150	A	V	1	402	T	S	1
151	A	V	1	534	S	G	1
179	M	T	1	610	T	I	2
192	A	V	1	630	V	A	1
196	S	C	1				
220	A	G	1				
244	K	R	1				
246	H	I	1				
252	I	V	1				
262	G	S	1				
264	P	S	1				
323	A	L	1				
329	V	I	4				
334	P	H	1				
339	V	A	1				
375	V	N	1				
383	A	G	1				
384	L	Q	1				
430	T	V	1				
430	T	S	1				
448	T	A	1				
490	V	I	1				
550	T	A	1				
550	T	V	1				
586	I	T	4				
609	V	I	3				
615	V/I	I	1				

*No incluye RAPs ni sustituciones emergentes en recaedores y no respondedores (ej. P334S)

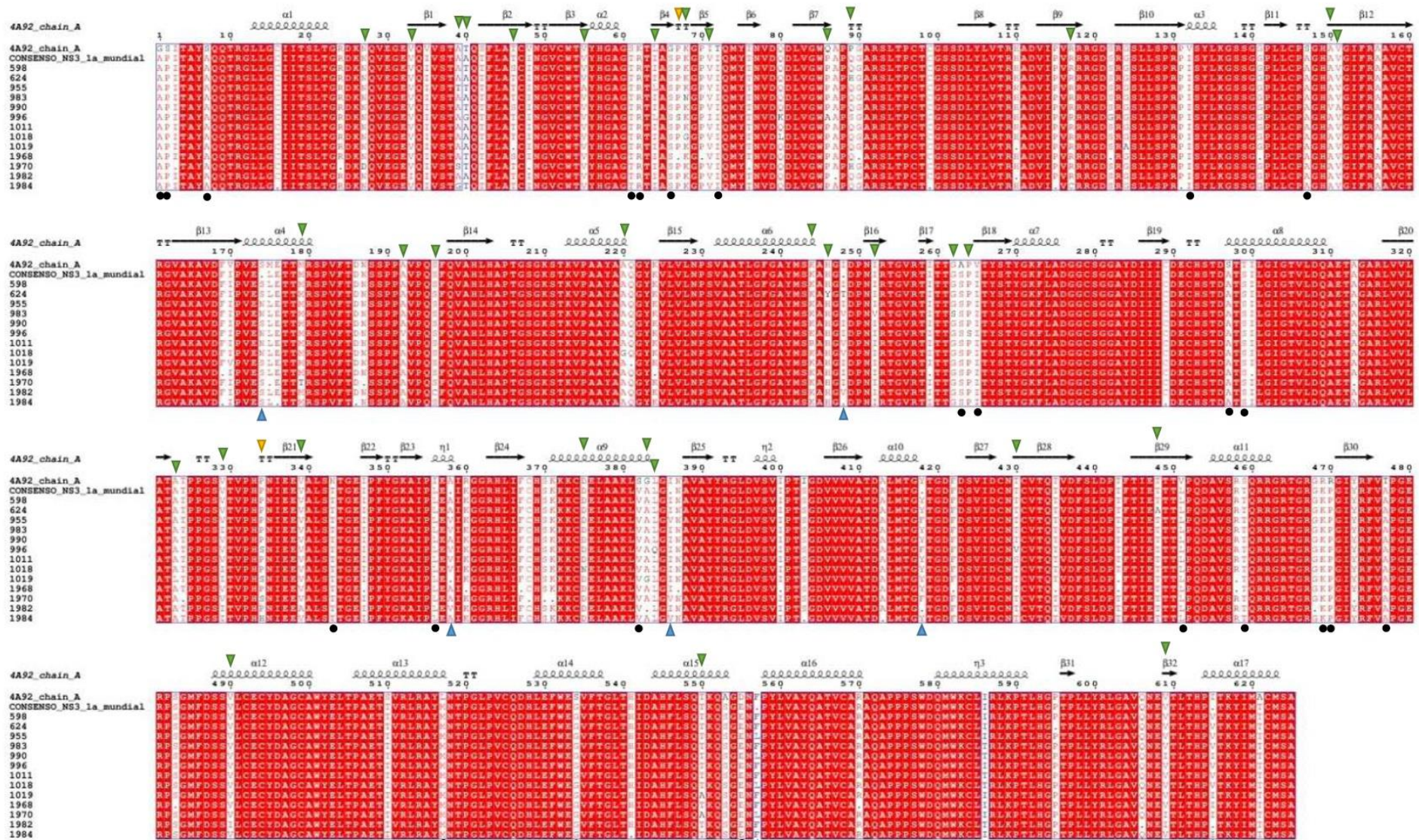


Figura 13. Análisis de las secuencias aminoacídicas de las secuencias subtipo 1a utilizando el programa ESPrnt 3.0. La estructura cristalizada de la proteasa NS3 utilizada corresponde al PDB *accession number* 4A92 (Schiering et al., 2011). En blanco se indican las posiciones donde hay sustituciones de aa. Con un círculo negro en la parte inferior del alineamiento se marcan las sustituciones respecto a la secuencia 4A92, las cuales no serán tomadas en cuenta en este análisis. Con triángulos en verde en la parte superior del alineamiento se indican todas las sustituciones encontradas en las cepas uruguayas no asociadas *a priori* con resistencia a DAAs. Se resaltan con un triángulo amarillo en la parte superior del alineamiento las sustituciones en giros β estrictos de interés para el mapeo en la estructura 3D (P67S y P334S). Las posiciones polimórficas se indican con triángulos celestes en la parte inferior del alineamiento. Asimismo, las hojas β se indican con flechas negras como β , y las hélices α y 3-10 se indican con ondas (como α y η , respectivamente); TT indica giros β estrictos. Alineamiento realizado con el software en línea ESPrnt (Robert & Gouet, 2014).

5.4.4.2 Análisis de localización de las sustituciones en la estructura terciaria de NS3

En segundo lugar, y a fin de identificar si alguna de las sustituciones encontradas a nivel de NS3, *a priori* no relacionadas a la resistencia a las nuevas terapias directas, podrían por su localización tener alguna relevancia en la generación de resistencia, se procedió a realizar el mapeo de ellas en la estructura 3D utilizando el software PyMol (Seeliger & De Groot, 2010). En esta instancia se continuó trabajando con la estructura 4A92 (Schiering et al., 2011).

Como se puede observar en la Figura 14, la mayoría de las sustituciones encontradas en este estudio se localizan en la superficie de la proteína pareciendo no interferir con su sitio activo (tríada catalítica: H57/D81/S139) ni con la región blanco de unión de las drogas directas.

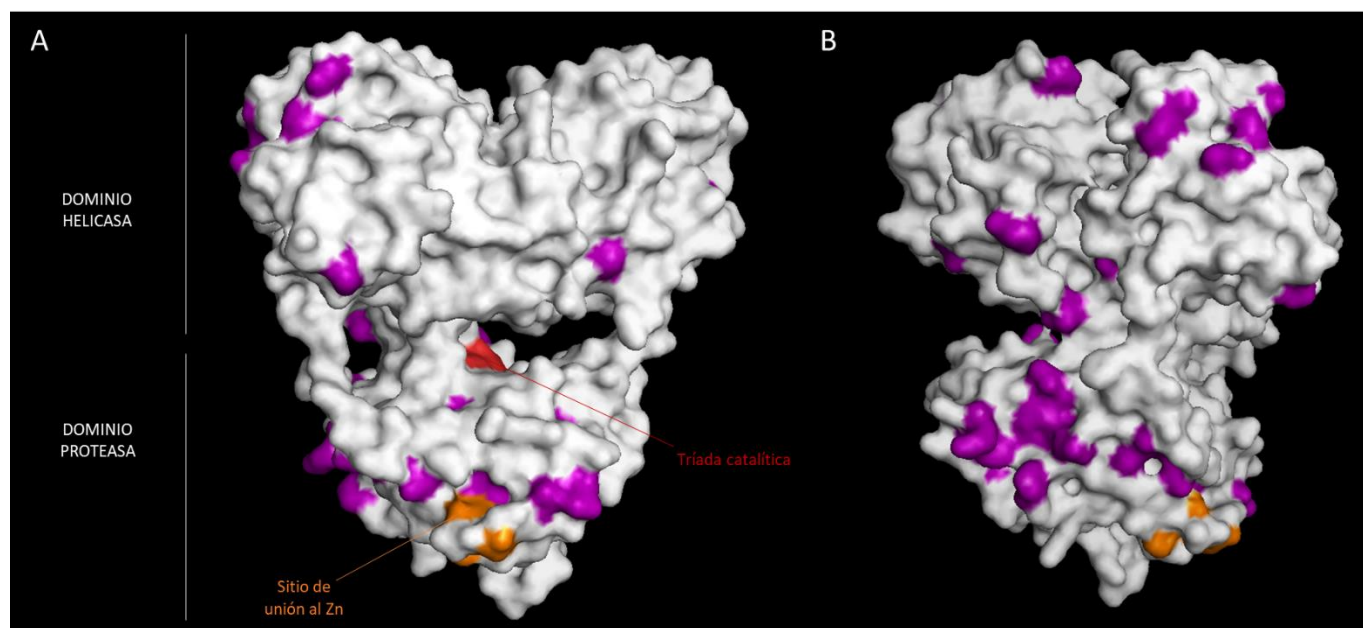


Figura 14. Mapeo de las sustituciones, no asociadas *a priori* con resistencia, encontradas en la proteasa NS3 de las cepas de VHC uruguayas. La estructura 3D que se muestra en la figura fue obtenida por Schiering et al., 2011 (PDB accession number 4A92). Los aminoácidos del sitio activo de NS3 se muestran en rojo, mientras aquellos implicados en la unión al Zn aparecen en anaranjado. Todas las sustituciones encontradas en este estudio se muestran en violeta. Tanto en A como en B se muestran distintas perspectivas de la superficie completa.

A continuación se procedió a mapear aquellas sustituciones que, por diferentes motivos, resultaban de interés estudiar más en profundidad. Por una parte se mapearon las sustituciones localizadas en los giros β estrictos (P67S y P334H/S) identificadas con el software *ESPrpt 3.0* (ver Fig. 13). En la Figura 15A se puede observar que ambas sustituciones se localizan en la superficie de la proteína y parecen ubicarse indistintamente en concavidades (P67S) o protrusiones (P334H/S).

Por otra parte, se mapeó la sustitución G124A que en la secuencia primaria se encuentra a sólo 2 aa de la RAS S122G; sin embargo, en la estructura 3D parece encontrarse alejada tanto de la RAS como del inhibidor macrocíclico (acilsulfonamida, como el PTV) (McCauley & Rudd, 2016; Schiering et al., 2011) (Figura 15B).

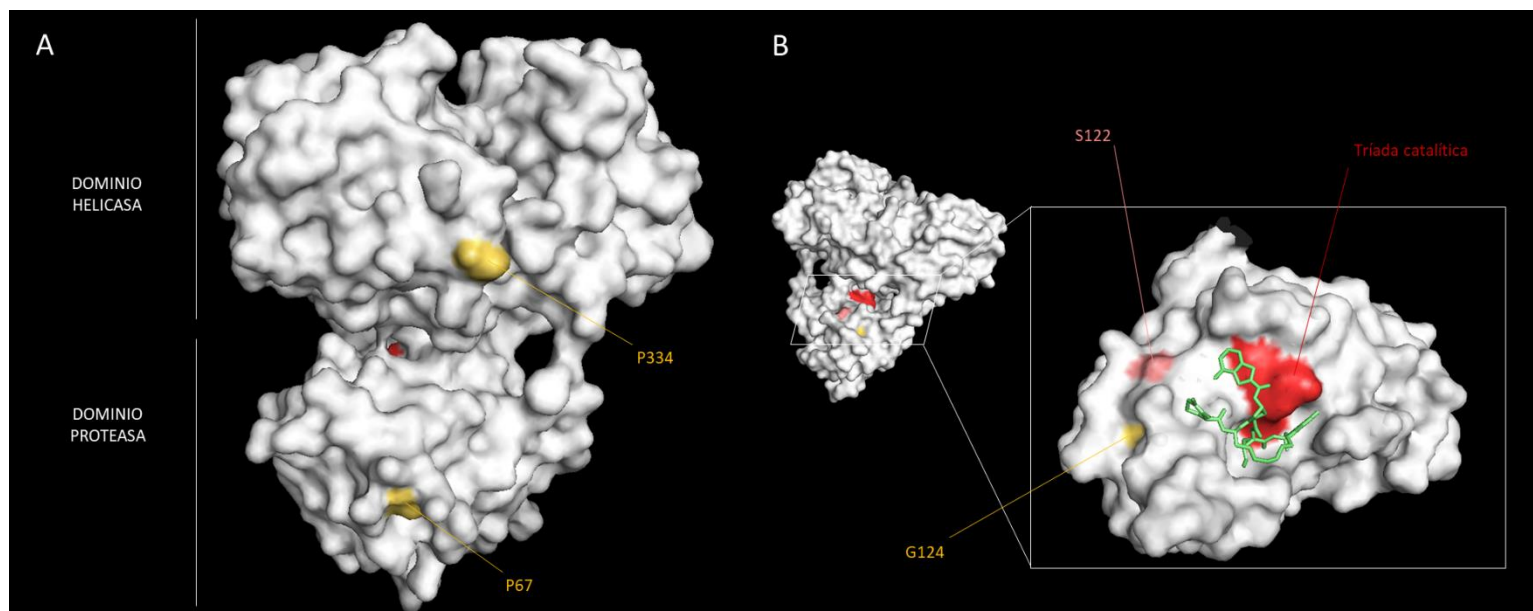


Figura 15. Mapeo de las sustituciones marcadas como de interés en la proteasa NS3 de las cepas de VHC uruguayas. Se muestra la estructura 3D obtenida por Schiering et al., 2011 (PDB *accession number* 4A92). La tríada catalítica se indica en rojo. **A)** Se muestra la superficie de la proteína completa. Las posiciones de interés (localizadas en giros β estrictos) se señalan en amarillo. **B)** Corte transversal ampliado de la proteína a nivel del sitio activo, en rojo, junto a un inhibidor macrocíclico de la proteasa (en verde lima), indicándose la posición de interés G124 en amarillo y la RAS S122G en rosado.

Adicionalmente a las sustituciones ya mencionadas, se encontraron otras que, si bien no parecen estar relacionadas a la resistencia a DAAs, podrían estar jugando algún rol en la función de NS3 (Figura 16). Dentro de estas sustituciones, como mencionamos anteriormente, se destacan:

- a)** las sustituciones A150V y A151V las cuales mapean cercanas a los residuos involucrados en la interacción con el Zn (Figura 16A);
- b)** las sustituciones S7A, V33I y A40T/G, sustituciones que mapean en o contiguas a aminoácidos involucrados en la unión al cofactor NS4A (Yan et al., 1998) (Figura 16B);
- c)** las sustituciones T550A y T550V, que se localizan en la región de interacción de NS3 con la enzima celular APOBEC3G (Zhu et al., 2015), enzima que juega un papel importante en controlar la replicación de muchos virus ARN (Figura 16B).

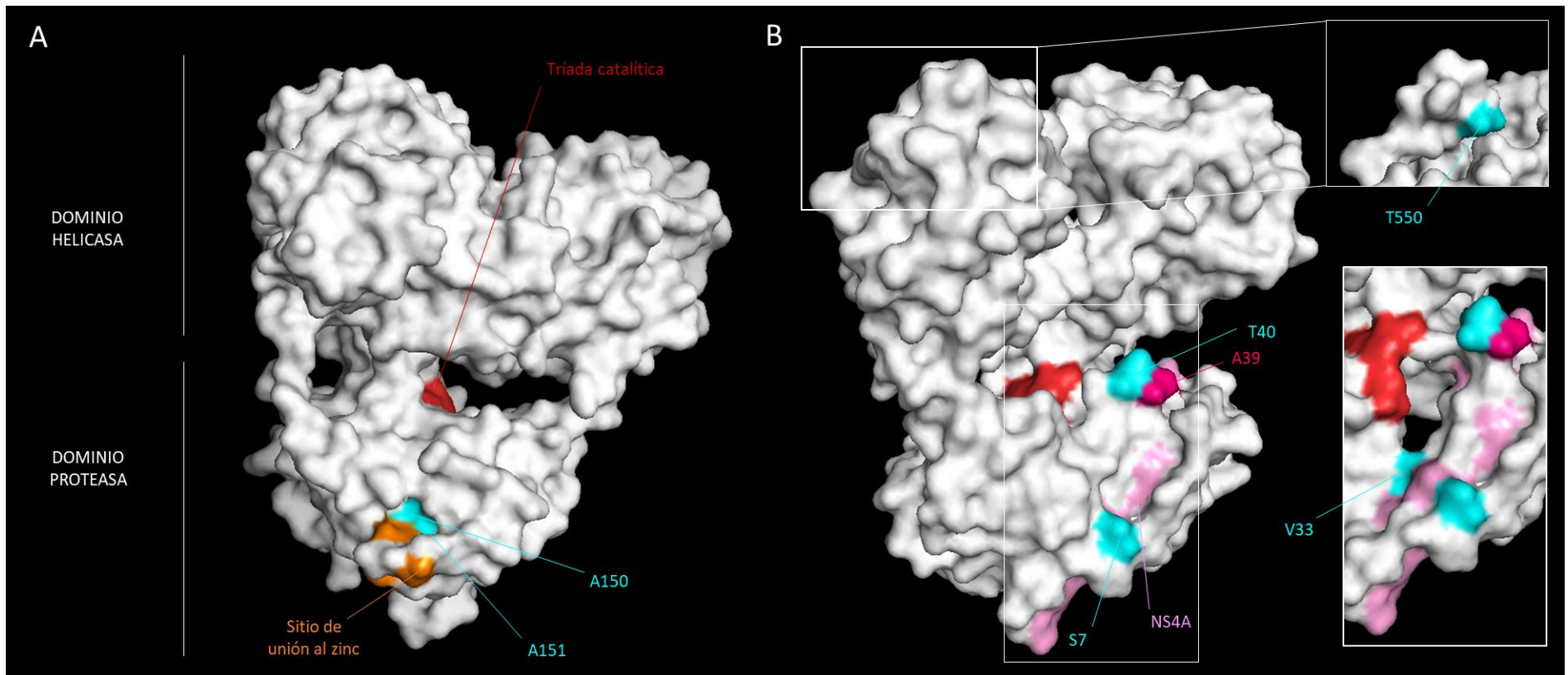


Figura 16. Mapeo de sustituciones en la región de interacción con APOBEC3G, cercanas al sitio de unión al Zn y al sitio de unión a NS4A. Se muestra la estructura 3D de NS3 (4A92) obtenida por Schiering et al., 2011. Los aa del sitio activo de NS3 se muestran en rojo y el sitio de unión al Zn en anaranjado. **A)** Se muestran los sitios de interés respecto a los sitios de unión al Zn (A150, A151). **B)** Rotación de 180° en el eje longitudinal. Se resalta en fucsia la posición A39 la cual está vinculada a resistencia a inhibidores de NS4A y en lila se muestra la región que contacta con el cofactor NS4A. Los sitios de interés se muestran en celeste: T40, V33 y S7. Se indica también la posición T550, ubicada en la región en que contacta NS3 con la proteína celular APOBEC3G.

5.5 Estudio de la diversidad de las cuasiespecies de NS3 de cepas de VHC genotipo 1a

5.5.1 Análisis de la variabilidad genética por clonado

Con el objetivo de estudiar las variantes que componen la cuasiespecie a nivel de la región NS3 se seleccionaron tres pacientes subtipo 1a, los cuales no presentaban RASs a nivel de su secuencia consenso (muestras 624, 983 y 1019). De cada una de estas muestras, se procedió a realizar la amplificación de una región parcial de NS3, comprendida entre el nt 3420 y el nt 4189 (ver Figura 8, sección 4.4.1) del gen que codifica para NS3 (primeros 256 aa de la proteína). El producto de PCR fue purificado, clonado en el vector *pGEM®-T Easy* y transformado en bacterias competentes. Para cada una de las muestras se picaron 100 colonias, a partir de las cuales se realizó la extracción de plásmido y verificación de la presencia del inserto por PCR.

De las 100 colonias seleccionadas únicamente entre un 29-54% de las mismas mostraron contener el plásmido con el inserto de interés, los cuales fueron posteriormente secuenciados. Las secuencias obtenidas a partir de cada paciente fueron alineadas con la secuencia consenso correspondiente (Figuras 17, 18 y 19).

Para el caso de la muestra 624 (Figura 17) se obtuvieron secuencias correspondientes a 29 clones. De estas secuencias el 79,3% (23/29) mostró tener una secuencia idéntica a la secuencia consenso correspondiente (la cual se diferenciaba de la consenso mundial por la sustitución Q89H), obtenida anteriormente por secuenciación Sanger. De los 6 clones restantes, 4 clones mostraron sustituciones únicas que los diferenciaban de la secuencia consenso, siendo estas la A5P, Q89R, C97Y y la T185A. Los dos clones restantes mostraron las sustituciones: A5T + I64V e Y75C + S189F, respectivamente (además de la sustitución presente en la secuencia consenso). Ninguna de estas sustituciones ha sido reportada al momento como que confiera resistencia a ninguna de las DAAs disponibles actualmente. Cabe destacar que la sustitución C97Y afecta directamente a una de las cisteínas involucradas en la unión al Zn.

El análisis de las variantes de la muestra 983 (Figura 18), para la cual se obtuvieron 36 clones, mostró que el 55,6% (20/36) de las variantes eran idénticas a la secuencia consenso correspondiente, la cual se diferenciaba de la consenso mundial en las sustituciones K68N y

S/N174N. Por otra parte, 14 de las secuencias obtenidas (38,9%) mostraron tener en común la sustitución I48V. Dentro de estos clones, tres mostraron tener, además de la sustitución I48V, sustituciones adicionales (T76A, G100D y P191S). Se encontraron 2 clones con mutaciones únicas (E30G y A45T). Ninguna de las mutaciones encontradas en las variantes del paciente 983 ha sido reportada como resistente.

Además, como se aprecia en la Figura 18, la posición 48 de los clones 983 mostraba en un 38,9% de los clones una I (isoleucina) y en un 61,1%, una V (valina), lo cual parecería revelar una posición polimórfica a pesar de que la secuencia consenso mostró una I. Esta incongruencia llevó a revisar detalladamente el cromatograma obtenido a partir de la secuenciación poblacional (consenso) de la muestra 983, el que evidenciaba un pico de una guanina bastante menor al de la adenina en la posición 142 (ver Apéndice - Figura Suplementaria 1). Dado que este sitio nucleotídico cae en la primera posición del codón, determina que su cambio derive en una sustitución V a I, lo cual explicaría los porcentajes observados en los clones.

Finalmente, en la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos para el estudio de las variantes de la muestra 1019. De esta muestra se obtuvieron 54 clones, 36 de los cuales (66,7%) presentaban una secuencia idéntica a la consenso (con las sustituciones G124A e I170V). De los 18 clones restantes, 9 (16,7%) no presentaron la sustitución I170V y de estos 9, uno presentó además múltiples sustituciones (E173K, D186N, S196N, H203D y A204G). Los restantes 9 clones, además de las sustituciones de la secuencia consenso, presentaron una sustitución adicional cada uno, siendo estas: K68R, V78A, S122N (encontrada en 2 clones), R123G, S125G, T178A (encontrada en 2 clones) y M179I. Cabe destacar que la posición 46, que es polimórfica en la secuencia consenso (cromatograma con doble pico superpuesto), también se evidencia como polimórfica cuando se estudian las variantes de la cuasiespecie, donde el 85,2% de las variantes presentaba una treonina (T), mientras que el 14,8% presentaba una serina (S).

Con respecto a la posición 122, se han visto diferentes sustituciones vinculadas a fenotipos resistentes, como S122R para el subtipo 1a o S122R/T para el subtipo 1b, por lo que la sustitución S122N se puede definir como una RAP. Reportes previos han demostrado que esta sustitución, si bien cae en una posición asociada a resistencia no tiene efectos sobre la

acción de DAAs como el SMV (Lenz et al., 2015). Asimismo, la sustitución I170V, como se mencionó anteriormente, se encuentra en una posición asociada a resistencia, es decir, puede calificarse como RAP. Esta sustitución se ha visto en fenotipos resistentes pero asociada a otras sustituciones, no generando este fenotipo por sí sola.

Es interesante resaltar el hallazgo, en este paciente, de la sustitución R123G. Esta sustitución es de interés ya que ha sido reportada como de resistencia a ASV en estudios realizados en cultivo celular, en los cuales emergió como resultado de la presión ejercida por la droga. Lo interesante es que ensayos posteriores demostraron que esta sustitución otorgaba un muy bajo *fitness* viral (McPhee et al., 2012).

Todas las sustituciones halladas y su distribución en las variantes de baja frecuencia de cada una de las cuasiespecies pueden verse representadas en la Figura 20.

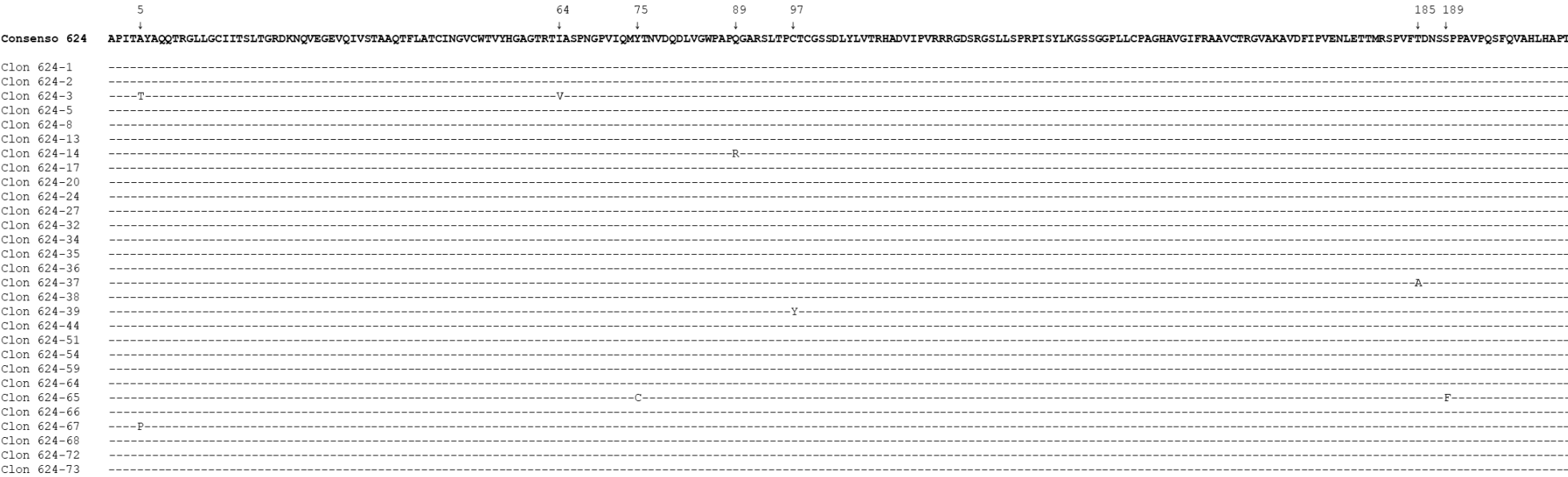


Figura 17. Estudio de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 624. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de los clones y la secuencia consenso. Se indican con flecha y número las posiciones con sustituciones.

Figura 18. Estudio de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 983. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de los clones y la secuencia consenso. Se indican con flecha y número las posiciones con sustituciones.

		46	68	78	122	123	125	170	173	178	179	186	196	203	204
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Consenso 1019	APITAYAQQTGRLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQIVSTAAQTFLA?CINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGFVIQMYTNVDQDLVGNPAPQGARSLTPCTCGSSDLXLVTR?ADVIFVRRRGDSRASLLSPRPISYLKGSSGGPLLCFAGHAVGIFR?AVCTRGVAKAVDFVPVESLETMTMSFVFTDNSSPPAVPQSFQVAHLHAPT														
Clon 1019-1	-----S-----R-----														
Clon 1019-2	-----S-----N-----														
Clon 1019-3	-----S-----N-----														
Clon 1019-4	-----S-----I-----														
Clon 1019-8	-----S-----														
Clon 1019-9	-----S-----														
Clon 1019-10	-----T-----														
Clon 1019-11	-----S-----														
Clon 1019-16	-----S-----I-----														
Clon 1019-18	-----S-----														
Clon 1019-19	-----S-----I--K-----N-----N-----DG--														
Clon 1019-20	-----S-----A-----														
Clon 1019-22	-----S-----A-----														
Clon 1019-24	-----T-----														
Clon 1019-27	-----S-----														
Clon 1019-28	-----S-----														
Clon 1019-29	-----S-----														
Clon 1019-34	-----S-----														
Clon 1019-41	-----S-----I-----														
Clon 1019-43	-----S-----I-----														
Clon 1019-44	-----S-----I-----														
Clon 1019-45	-----T-----I-----														
Clon 1019-46	-----S-----														
Clon 1019-47	-----S-----G-----														
Clon 1019-48	-----S-----I-----														
Clon 1019-49	-----S-----														
Clon 1019-51	-----S-----I-----														
Clon 1019-52	-----S-----														
Clon 1019-53	-----S-----														
Clon 1019-54	-----S-----														
Clon 1019-55	-----S-----														
Clon 1019-56	-----S-----A-----														
Clon 1019-57	-----T-----														
Clon 1019-59	-----S-----														
Clon 1019-60	-----S-----														
Clon 1019-61	-----S-----														
Clon 1019-62	-----S-----G-----														
Clon 1019-63	-----S-----														
Clon 1019-64	-----S-----														
Clon 1019-65	-----S-----														
Clon 1019-66	-----S-----														
Clon 1019-68	-----S-----														
Clon 1019-69	-----S-----														
Clon 1019-70	-----S-----														
Clon 1019-71	-----S-----														
Clon 1019-72	-----T-----														
Clon 1019-73	-----S-----														
Clon 1019-74	-----S-----I-----														
Clon 1019-75	-----S-----														
Clon 1019-76	-----T-----														
Clon 1019-77	-----S-----														
Clon 1019-78	-----T-----														
Clon 1019-79	-----S-----														
Clon 1019-80	-----T-----														

Figura 19. Estudio de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 1019. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de los clones y la secuencia consenso. Se indican con flecha y número las posiciones con sustituciones.

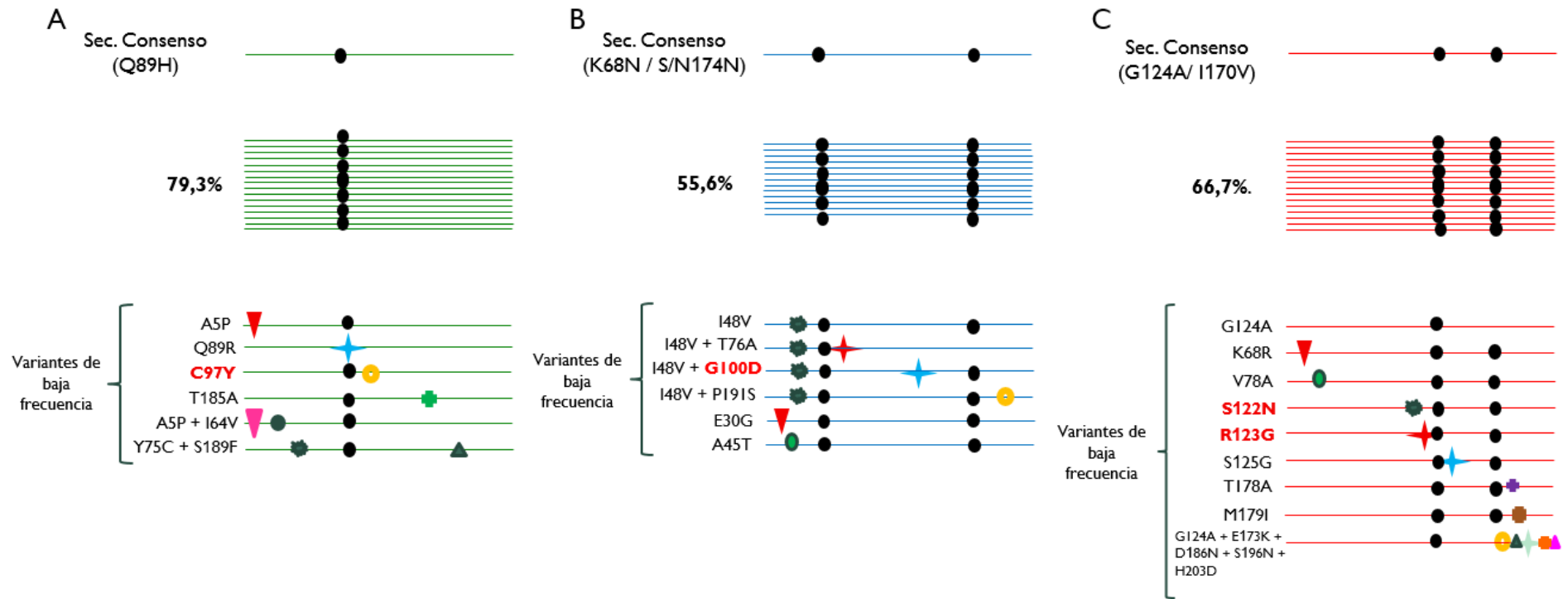


Figura 20. Representación de la distribución de las sustituciones en las cuasiespecies de las muestras A) 624, B) 983 y C) 1019. Se indican los porcentajes de las variantes de cada cuasiespecie que presentan una secuencia aminoacídica idéntica a su respectiva secuencia consenso. Se detallan las sustituciones encontradas en las variantes de baja frecuencia de cada una de las cuasiespecies. En rojo se resaltan las sustituciones que involucran sitios de unión al Zn (**C97Y**, **G100D**), la RAP **S122N** y la RAS **R123G**.

5.5.2 Análisis de escalamiento multidimensional (MDS)

Con el objetivo de visualizar las relaciones entre las variantes de la cuasiespecie de cada una de las cepas subtipo 1a seleccionadas (muestras 624, 983 y 1019), se calcularon matrices de distancia en dos dimensiones que fueron empleadas para llevar a cabo los análisis de MDS (Figuras 21-24).

En la figura 21 se puede observar el resultado obtenido al realizar el análisis con las variantes correspondientes a las tres muestras estudiadas en conjunto. Como se puede evidenciar en la figura, se visualizan tres conglomerados de variantes correspondientes a cada una de las cepas analizadas. Como era de esperarse, las variantes que componen la cuasiespecie de cada cepa se encuentran más estrechamente relacionadas entre sí que con las variantes de las otras cuasiespecies dadas las menores distancias genéticas existentes entre ellas.

Las variantes de la muestra 624, al igual que la tendencia observada en los alineamientos de aa, muestra la menor heterogeneidad a nivel nucleotídico, donde todas las variantes convergen en pocos puntos del acumulo (Figura 22).

En los casos de las muestras 983 y 1019, en cambio, se ve una mayor diversidad en cuanto a las distancias genéticas (a nivel de nucleótidos), también observadas al compararse los alineamientos de aa de ambas muestras con la muestra 624. La muestra 983 exhibe la mayor dispersión de variantes, evidenciando mayor diversidad nucleotídica (Figura 23). La muestra 1019, en la que podíamos ver la mayor diversidad en cambios aminoacídicos, presentó, asimismo gran dispersión de clones reflejando también su diversidad nucleotídica (Figura 24).

Adicionalmente, en el caso de las variantes de la muestra 1019 se puede observar un *outlier*, una variante con notoria distancia genética de cualquier acúmulo de otras variantes de la cuasiespecie. Este es el caso del clon 1019-19 (Figura 24), el cual, además de presentar mayor número de cambios nucleotídicos, presenta también la mayor diversidad en cuanto a sustituciones aminoacídicas dentro de la nube de variantes (Figura 19).

Es importante destacar que la diversidad observada en el alineamiento nucleotídico no necesariamente debe reflejarse a nivel de aa, dado que en este análisis se trabaja con distancias genéticas de nucleótidos. Un claro ejemplo a este respecto son los cambios de

nucleótidos en terceras posiciones de los codones, los cuales no implican cambios aminoacídicos.

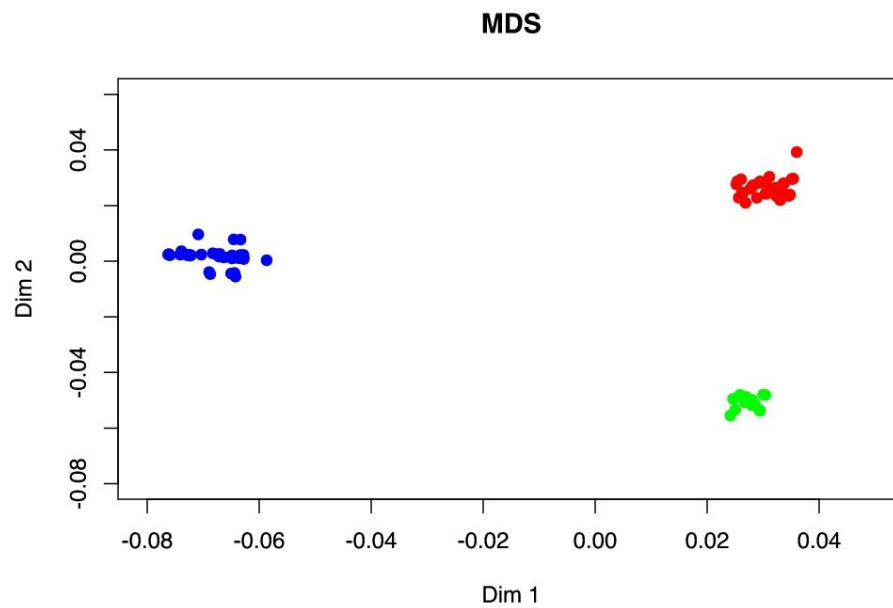


Figura 21. Análisis de escalamiento multidimensional de las variantes de la cuasiespecie de las tres cepas subtipo 1a seleccionadas.
Las variantes de la muestra 624 se indican en verde, las variantes de la muestra 983 en azul y las variantes de la muestra 1019 en rojo.

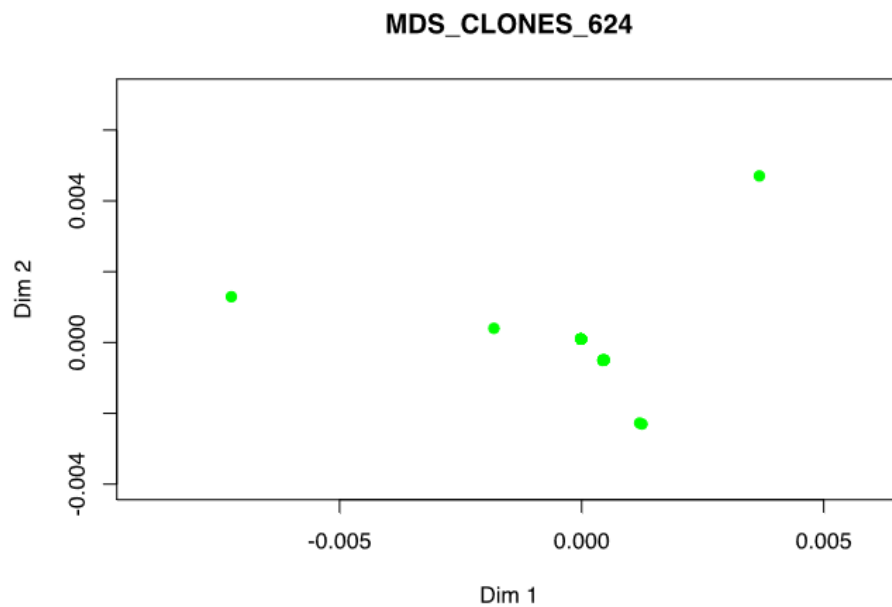


Figura 22. Análisis de escalamiento multidimensional de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 624.

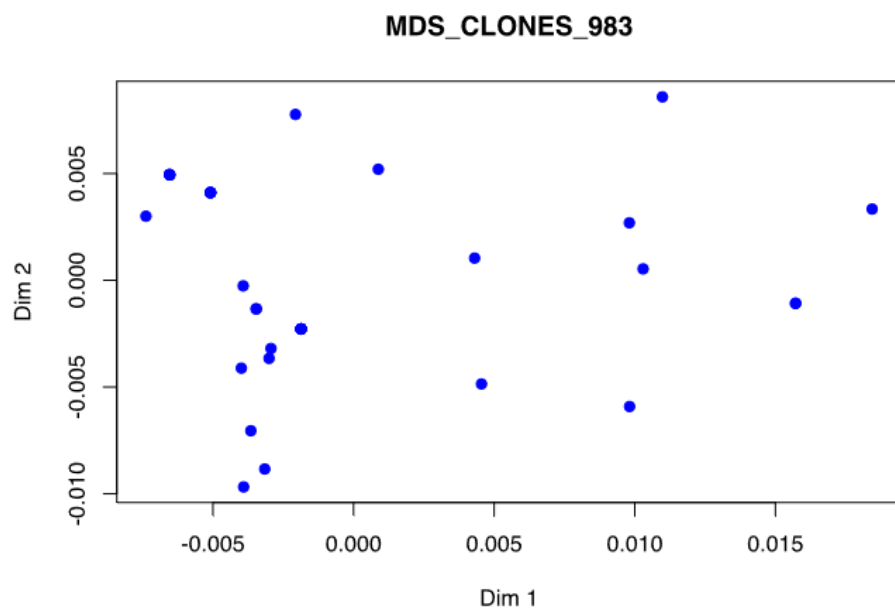


Figura 23. Análisis de escalamiento multidimensional para las variantes de la cuasiespecie de la muestra 983.

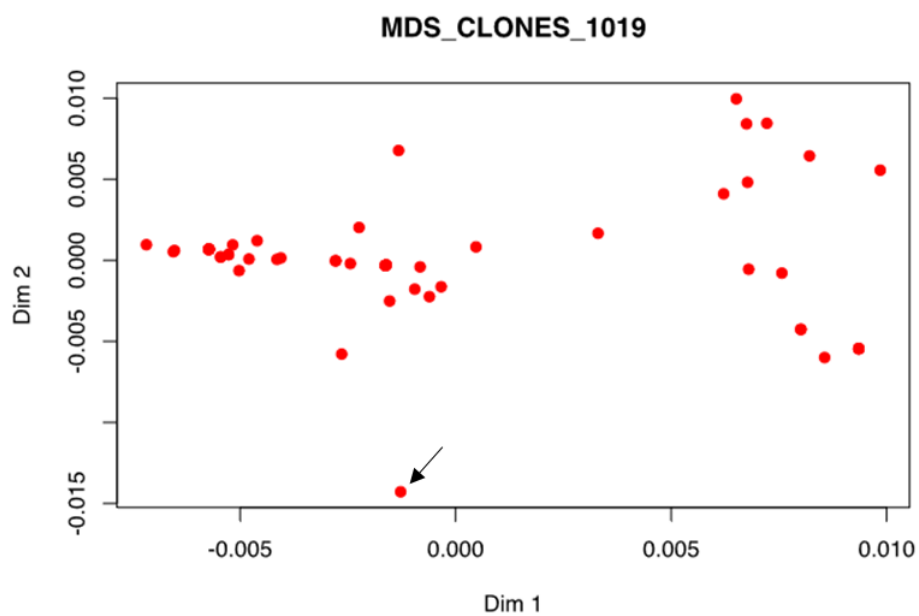


Figura 24. Análisis de escalamiento multidimensional de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 1019. Con una flecha negra se indica la posición del *outlier* que representa a la variante correspondiente al Clon 1019-19.

5.5.3 Mapeo de sustituciones encontradas en variantes de las cuasiespecies de muestras subtipo 1a en la estructura 3D de NS3 de VHC

El estudio de sustituciones a nivel de las variantes que conforman la cuasiespecie mostró la presencia de variadas sustituciones que no han sido asociadas *a priori* como resistentes a los DAAs y que se encontraban en baja frecuencia en las cuasiespecies analizadas (menor a 3,5%). Con el fin de estudiar estas mutaciones un poco más en profundidad, se procedió, en una primera instancia, a la realización del mapeo de cada una de ellas en la estructura 3D de la proteína.

El análisis de las variantes de la muestra 624 mostró la presencia de diferentes sustituciones (A5T/P, I64V, Y75C, Q89H, Q89R, C97Y, T185A y S189F). Como se puede observar en la Figura 25, la mayoría de estas mutaciones mapean en la superficie de la proteína. En este paciente es interesante destacar la presencia de un clon que muestra la sustitución C97Y, la cual comprende un cambio en una de las cisteínas involucradas en la unión al Zn.

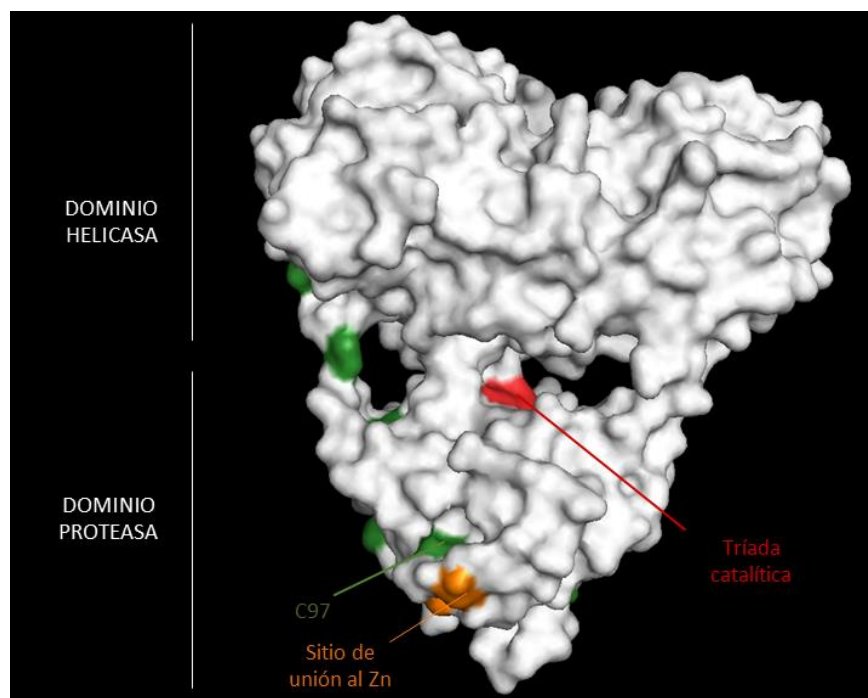


Figura 25. Mapeo de las sustituciones halladas en clones de la muestra 624. Se muestra la estructura 3D de NS3 (4A92) (Schiering et al., 2011). Los aminoácidos del sitio activo de NS3 se marcan en rojo, los aminoácidos implicados en la unión al Zn se resaltan en anaranjado y en verde los sitios donde se encontraron sustituciones en los distintos clones de la muestra 624.

Por su parte, el análisis de las variantes de la muestra 983 mostró la presencia de las sustituciones: E30G, A45T, I48V, T76A, G100D y P191S. Como se puede observar en la Figura 26, la mayoría mapean en la superficie de NS3 y lejos de la tríada catalítica. La sustitución de la posición G100 en uno de los clones resulta de interés respecto a la unión al Zn, ya que involucra una posición de contacto directo con una de las cisteínas de coordinación de esta unión (C99).

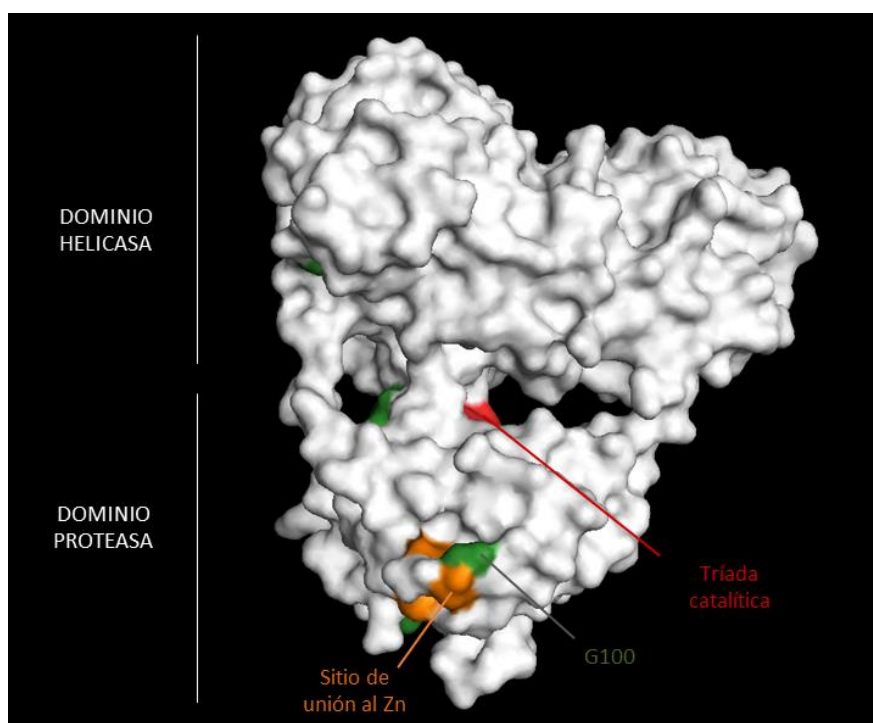


Figura 26. Mapeo de las sustituciones halladas en clones de la muestra 983. Se muestra la estructura 3D de NS3 (4A92) (Schiering et al., 2011). Los aminoácidos del sitio activo de NS3 marcados en rojo, mientras que los aminoácidos implicados en la unión al Zn se resaltan en anaranjado y en verde los sitios donde se encontraron sustituciones en los distintos clones.

Por último, el estudio de las variantes de la muestra 1019 mostró la presencia de las sustituciones: K68R, V78A, S122N, R123G, S125G, E173K, T178A, M179I, D186N, S196N, H203D y A204G. En la Figura 27 se muestra el mapeo de estas mutaciones en la estructura 3D de la proteína, donde, una vez más, todas mapean en su superficie. En este estudio es interesante destacar la presencia de la sustitución S122N, la cual es considerada

una RAP, siendo la variante resistente la S122G/R/T. Además, se encontró la sustitución R123G, vinculada a la resistencia a ASV *in vitro*.

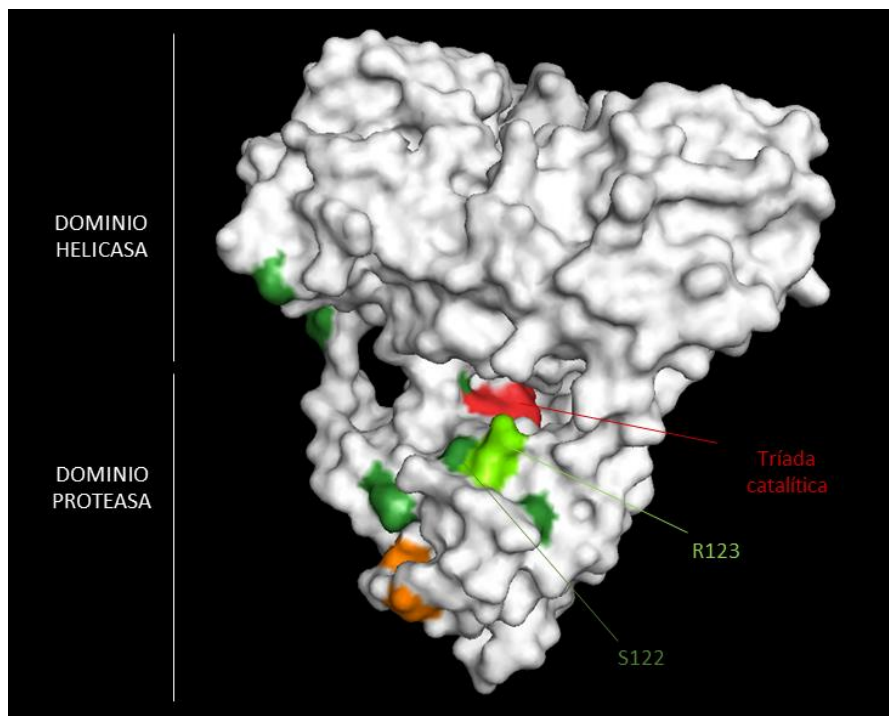


Figura 27. Mapeo de las sustituciones halladas en clones de la muestra 1019. Se muestra la estructura 3D de NS3 (4A92) obtenida por Schiering et al., 2011. Los aminoácidos del sitio activo de NS3 se marcan en rojo, los aminoácidos implicados en la unión al Zn se resaltan en anaranjado y en verde los sitios donde se encontraron sustituciones en los distintos clones de la muestra 1019.

5.6 Análisis de *docking* de las sustituciones de interés en NS3 de VHC

Luego de la realización del mapeo de las sustituciones encontradas, tanto a nivel de la secuencia consenso como a nivel de las variantes de la cuasiespecie, se seleccionó la sustitución R123G para la realización de los estudios de *docking* molecular. Esta sustitución fue encontrada en una variante minoritaria dentro de la cuasiespecie 1019 y fue seleccionada dada su asociación, *in vitro*, con resistencia a ASV, antiviral no aprobado aún para su uso en Uruguay, a fin de evaluar su potencial resistencia a una de las drogas si aprobadas en nuestro país (PTV). Otro de los objetivos de este estudio fue poder evaluar si el *docking* molecular puede servir como una herramienta de *screening* primario de sustituciones de resistencia.

El *docking* molecular se llevó a cabo con la estructura en formato PDB 4A92, configurando como residuos activos a los de la tríada catalítica (H57, D81 y S139). Como ligando se utilizó el PTV, cuya estructura también en formato PDB, fue modelada mediante la herramienta JME Molecular Editor (Figura 28) (Ertl, 2010).

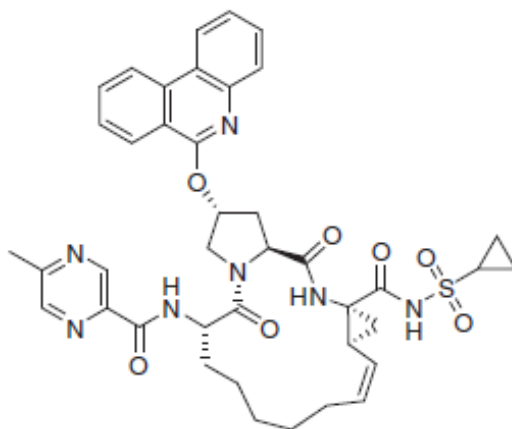


Figura 28. Estructura del inhibidor macrocíclico de la proteasa NS3 de tercera generación Paritaprevir, componente del pack comercial Viekira (McCauley & Rudd, 2016).

Este estudio fue realizado utilizando tres condiciones diferentes: sin mutar – condición basal (Figura 29), mutando D168Y – condición resistente (Figura 30) y mutando con la sustitución de interés R123G (Figura 31).

En cada uno de los casos de los diferentes *docking* moleculares realizados, se obtuvieron cuatro *clusters* con cuatro posibles conformaciones proteína – antiviral, donde se procedió a trabajar con el *cluster* que presentó el menor valor de *z-score*.

En primer lugar se llevó a cabo el *docking* molecular con la estructura tal cual fue obtenida de la base de datos (sin mutar) a fin de realizar mediciones de distancias y poder visualizar el mapeo tanto de la posición de interés R123 como del residuo D168 utilizado como referencia de resistencia ya que en ese residuo se ha reportado la RAS D168Y a PTV (Pilot-Matias et al., 2015). Se midieron distancias, tomadas como basales, entre los residuos de estas posiciones, así como también los residuos de la tríada catalítica, respecto al PTV (Figura 29).

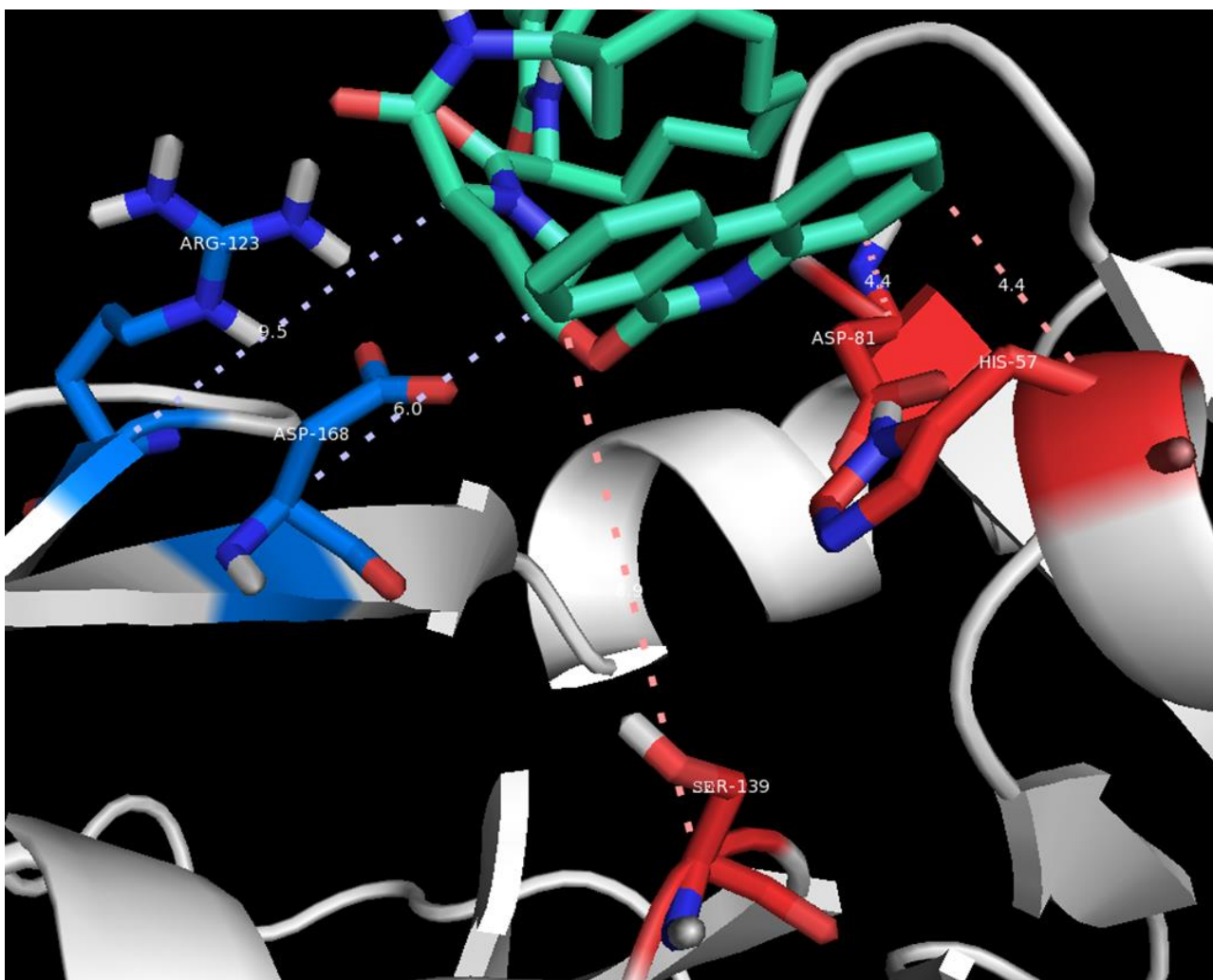


Figura 29. Docking molecular entre la estructura de NS3 4A92 (Schiering et al., 2011) sin mutaciones y el Paritaprevir. En rojo se indican los residuos de la tríada catalítica (His-57, Asp-81 y Ser-139), en azul la posición de interés R123 (Arg-123) y la posición D168 (Asp-168), donde se han reportado sustituciones que generan gran resistencia al PTV (Pilot-Matías et al., 2015). Se indican las distancias entre los Ca de los residuos señalados y la droga.

Como se puede observar en la figura 29, las distancias entre los residuos R123, D168, H57, D81 y S139 y el PTV son 9.5 Å, 6.0 Å, 4.4 Å, 4.4 Å y 8.9 Å, respectivamente. Estas medidas se tomaron como basales, con el fin de tener una referencia para la comparación de las medidas posteriores que incluirán la mutagénesis de las posiciones 168 y 123.

Previo a la realización de los estudios correspondientes con la sustitución R123G, se realizó el estudio con la sustitución D168Y la cual, como se mencionó anteriormente, fue utilizada como referencia, ya que genera alta resistencia al PTV. Con este fin se procedió a realizar la

mutagénesis puntual de la estructura 4A92 en el *software PyMOL* para, posteriormente, realizar un nuevo *docking* molecular con la modificación a nivel del residuo 168.

Como se observa en la Figura 30, la introducción de la sustitución D168Y, dio como resultado un cambio en el posicionamiento de la droga respecto al sitio de unión en NS3, lo cual se evidencia con el aumento de las distancias evaluadas entre el C α de los residuos Y168, H57, D81 y S139 y los carbonos del PTV (Tabla 5). Es importante destacar que se midieron las distancias entre el C α de los residuos de interés y los mismos carbonos del PTV que fueron medidos en la condición sin mutar.

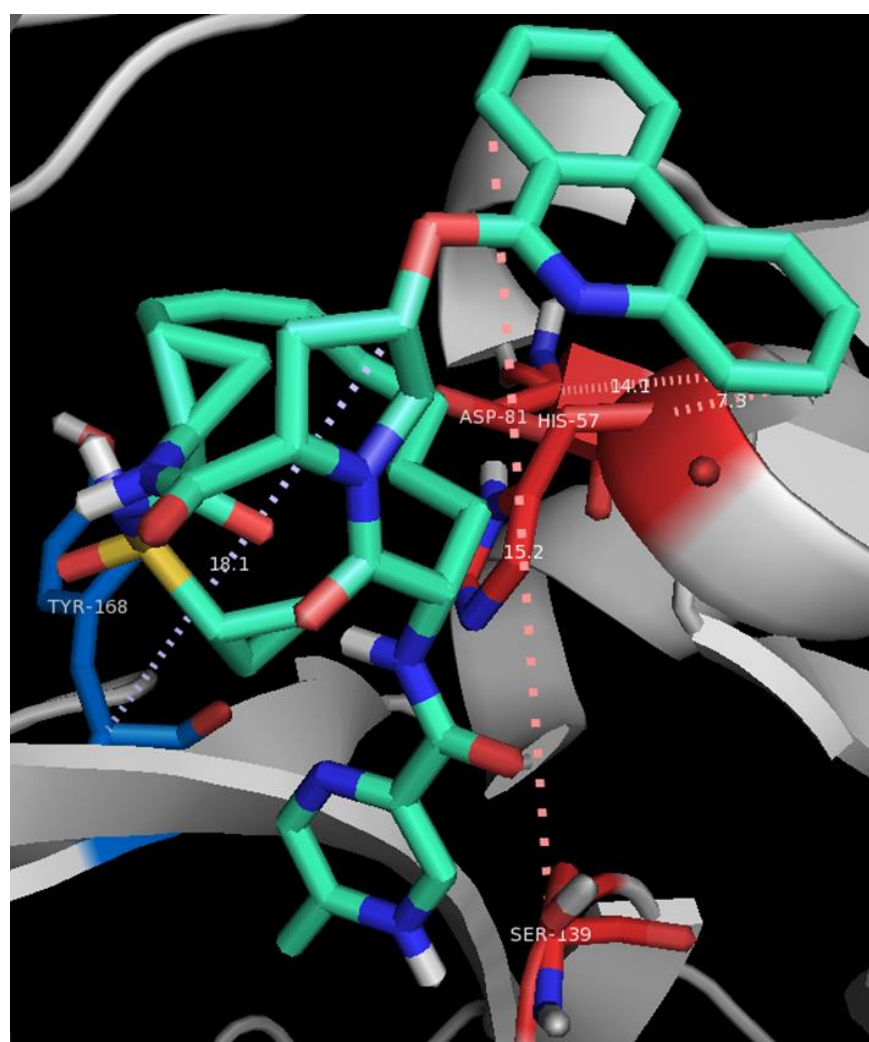


Figura 30. *Docking* molecular entre la estructura de NS3 4A92 (Schiering et al., 2011) con la mutación D168Y y el **Paritaprevir**. En rojo se indican los residuos de la tríada catalítica, en azul la RAS a Paritaprevir Y168 (Tyr-168). Se indican las distancias respecto a los distintos C α al PTV (Pilot-Matías et al., 2015).

Finalmente, a fin de analizar si la sustitución de interés R123G podría, efectivamente, provocar algún cambio estructural que pueda afectar la unión del PTV, se procedió a realizar la mutagénesis puntual R123G en la estructura original de NS3 (4A92) para luego realizar el *docking* molecular de la estructura resultante y el PTV. En la Figura 31 se observa el resultado obtenido en este estudio, donde se muestra la estructura desde dos ángulos distintos a fin de poder visualizar las interacciones con la droga en mayor detalle. Al igual que para el caso de la sustitución D168Y, con la sustitución R123G, la droga se posiciona nuevamente de forma completamente diferente con respecto a su sitio de unión. Se observa también un aumento en las distancias entre los distintos residuos evaluados y las mismas posiciones de la droga (Tabla 5).

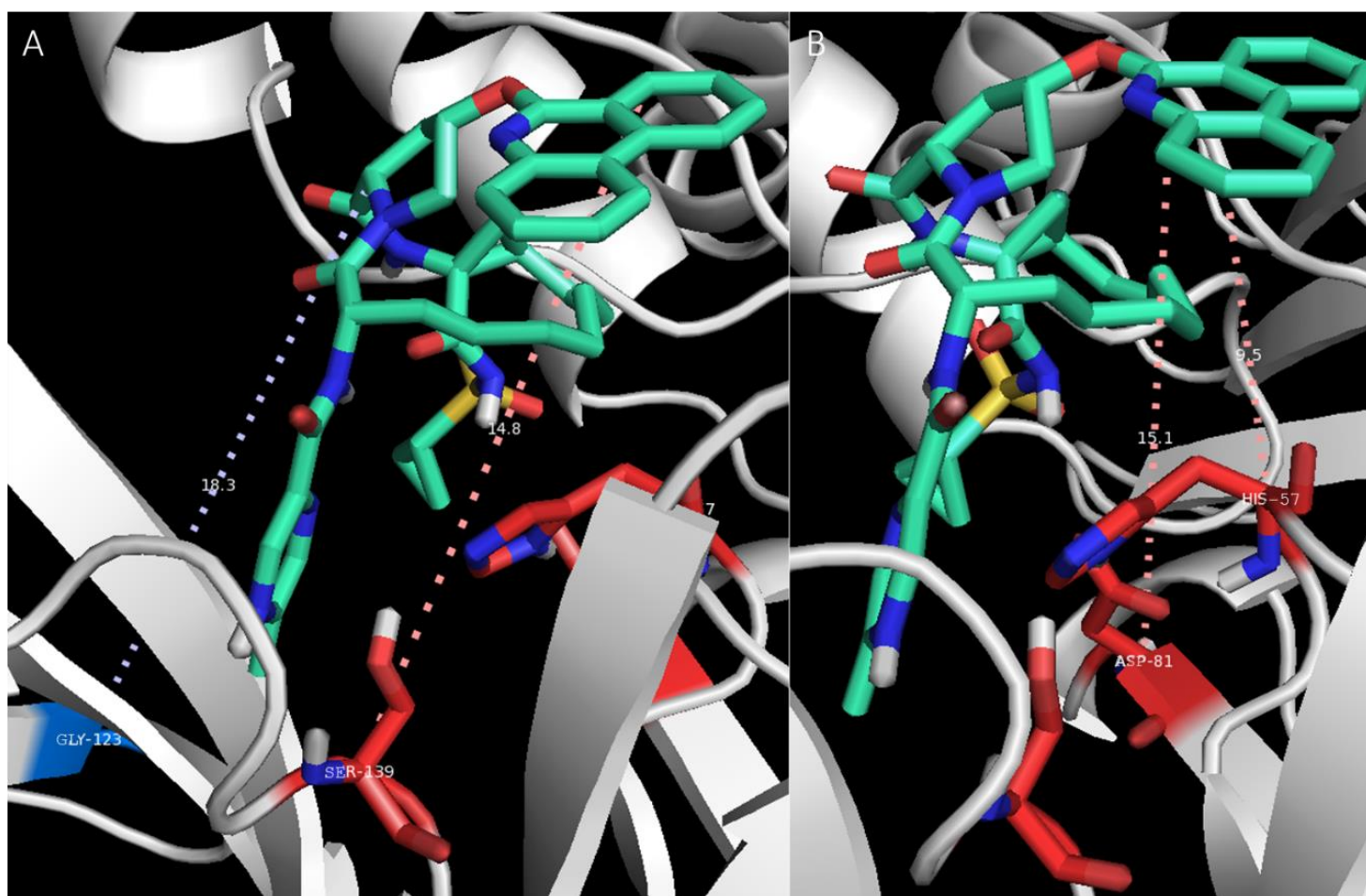


Figura 31. *Docking* molecular entre la estructura de NS3 4A92 (Schiering et al., 2011) con la sustitución de interés R123G y el Paritaprevir. Se muestran tres ángulos distintos. En rojo se indican los residuos de la tríada catalítica. En cada caso se indican las distancias entre los C α y el PTV. **A)** Se indica en azul la sustitución de interés G123 (Gly-123) y el residuo catalítico Ser-139. **B)** Se muestran los residuos catalíticos His-57 y Asp-81.

Tabla 5 – Resultados de las medidas evaluadas en las distintas etapas de análisis por *docking* molecular.

	Distancias (Å)		
Mediciones: C alfa – Posición en PTV	<i>Wild type</i> (Fig. 28)	Mutante Resistente a PTV: Y168 (Fig. 29)	Mutante de Interés: G123 (Fig. 30)
R/G123 – Posición A	9,5	-	18,3
D/Y168 – Posición B	6,0	18,1	-
H57 – Posición C	4,4	7,3	9,5
D81 – Posición D	4,4	14,1	15,1
S139 – Posición E	8,9	15,2	14,8

6. Discusión

El virus de la Hepatitis C (VHC), miembro del género *Hepacivirus*, familia *Flaviviridae*, es considerado el principal agente causal de hepatitis no A no B, post-transfusionales y parenteralmente adquiridas en todo el mundo (Kuo et al., 1989). En el 80% de los casos la infección por este virus genera una infección crónica (aproximadamente 71 millones de personas) que puede desencadenar cirrosis (5-20%) y hepatocarcinoma (1-5%), por lo que se ha convertido en una de las indicaciones más frecuentes para el trasplante de hígado (Hoofnagle, 2002; Pawlotsky, 2003; Simmonds, 2004; WHO, 2017). A lo largo de los años se han desarrollado diferentes terapias a fin de controlar y curar esta enfermedad. A partir del año 2011 se comenzaron a utilizar nuevas drogas que tienen como blanco proteínas virales, las DAAs, las cuales han provisto de regímenes terapéuticos más cortos y más efectivos.

En nuestro país las primeras DAAs en aprobarse fueron TVR y BOC (IP), discontinuados en la actualidad. Más recientemente, fueron aprobados el Viekira Pak (combinación de DAAs contra las tres proteínas blancos principales: NS3, NS5A y NS5B) y la combinación de SOF (inhibidor de la polimerasa) con LDV (inhibidor de la NS5A) (Asselah & Marcellin, 2013). Sin embargo, dados sus elevados costos, el Fondo Nacional de Recursos no cubre la mayoría de los tratamientos que impliquen DAAs. Es por todo esto que debe resaltarse la relevancia de buscar nuevos indicadores de respuesta a la terapia antiviral en la población uruguaya con el fin de proporcionar información que podría ser una guía útil para que los médicos puedan abordar así una terapia anti-VHC más personalizada para el paciente. En este marco, el estudio de la presencia natural de sustituciones asociadas a resistencia a los nuevos DAAs, o bien su rápida emergencia tras el tratamiento con estas drogas, constituye un importante aporte a la hora de la selección de la terapéutica a utilizar (Wyles, 2013; Sorbo et al., 2018).

Variabilidad genética y firma de secuencia encontrada en la región de NS3 de cepas de VHC uruguayas

En la actualidad, los G1 y G3 son los más prevalentes a nivel mundial (Bukh, 2016), mientras que en el continente americano lo son el G1 (74,5% de los infectados), G3 (10,6%), G2

(10,2%) y G4 (1,7%) (Petruzziello et al., 2016). En nuestro país se ha visto un patrón similar al descrito en otros países de América del Sur, con la mayoría de las infecciones causadas por VHC subtipo 1a (56%), 3a (26%) y 1b (18%) (Castells et al., 2015). En concordancia con estos datos, tanto a nivel global como regional, el 87% de las cepas analizadas en el presente trabajo fueron subtipo 1a y el 13% fueron subtipo 1b; no revelándose la presencia de cepas subtipo 3a (Figura 11). Esta disparidad con lo previamente reportado para nuestro país (Castells et al., 2015) podría deberse principalmente al diferente número de muestras evaluadas. A lo largo de esta tesis se evaluaron 15 muestras mientras que en el estudio de Castells y colaboradores (2015) se evaluaron 153.

Por otra parte, los resultados del estudio de firmas de secuencia, evidenciaron la presencia de una marca de secuencia característica en la región NS3 de VHC subtipo 1a de cepas aisladas en América del Sur (Figura 12). En una primera instancia fueron identificados cuatro sitios de interés (posiciones 386, 418, 557 y 615), de los cuales únicamente la posición 418 mostró una variación significativa entre las secuencias NS3 del VHC de las cepas aisladas en América del Sur y las cepas aisladas en el resto del mundo. En esta posición los aislados provenientes de América del Sur mostraron una Y, mientras que las cepas provenientes del resto del mundo mostraron una F.

Trabajos previos han evaluado firmas de secuencia específicas entre alineamientos, pero de diferentes genotipos y subtipos. López-Labrador y colaboradores (2008) identificaron firmas de secuencia de aa características para los distintos genotipos a nivel del dominio proteasa de NS3. Incluso, algunos aa de la firma de secuencia se localizaban en posiciones asociadas a resistencia a distintos inhibidores de la proteasa, como V36A/M/L (Lopez-labrador, Moya & González-Candelas, 2008). Otro reporte donde también utilizan la herramienta VESPA, identificó algunos patrones de sustituciones únicos asociados con resistencia a IP, donde también se revelaron patrones específicos de genotipo y subtipo (Vallet et al., 2011). Cada genotipo tuvo al menos una posición en la cual el aa involucrado se encontraba en el 100% de todas las secuencias del genotipo en cuestión, pero que se encontraba ausente en el resto, es decir, firmas de secuencia estrictas. En el caso del presente trabajo en cambio, la búsqueda de firmas de secuencia se realizó a fin de evidenciar la existencia de patrones de diversificación local de VHC, trabajando únicamente con cepas del subtipo 1a que se

diferenciaban por su procedencia geográfica (set de datos: América del Sur y resto del mundo). Esta característica determinó que la firma de secuencia hallada (Y418 en América del Sur) refleje la posible diversificación local de este virus en lugar de diferencias entre genotipos/subtipos, como fuera analizado anteriormente (Lopez-labrador et al., 2008; Vallet et al., 2011).

A diferencia de lo hallado en los reportes ya mencionados (Lopez-labrador et al., 2008; Vallet et al., 2011), la firma de secuencia de las cepas de la región no evidenció la presencia de sustituciones de resistencia ya descritas en el patrón estudiado. Las sustituciones encontradas en las posiciones 386, 557, 615 y concretamente en la posición 418, podrían ser características de la región, lo que sugeriría una diversificación local de VHC.

Adicionalmente, el hecho de revelar variaciones aminoacídicas entre diferentes aislamientos mundiales, sugiere que estas diferencias podrían sesgar la búsqueda de sustituciones en caso de seleccionar una única cepa como referencia. Es por este motivo que se decidió generar secuencias de referencia mundiales, tanto subtipo 1a como 1b, mediante el alineamiento de cepas provenientes de diferentes partes del mundo. En este punto es importante destacar la relevancia de la elección del uso de estas “secuencias consenso mundiales” (subtipo 1a o 1b) dado el alto porcentaje de polimorfismos aminoacídicos que presenta la secuencia de NS3 (33% y 29% de los sitios exhiben más de un aa en los subtipos 1a y 1b, respectivamente) (Vallet et al., 2011).

Análisis de sustituciones en la región NS3 de las cepas uruguayas: RASs, RAPs y sustituciones no asociadas *a priori* a resistencia

La introducción de IP constituye un hito en lo que respecta al tratamiento de VHC. Sin embargo, la emergencia de variantes resistentes a estos inhibidores representa un gran desafío a la hora de desarrollar terapias antivirales efectivas.

En este estudio se estableció por primera vez la presencia y frecuencia de mutaciones de resistencia naturales presentes en secuencias de NS3 aisladas de 15 pacientes uruguayos crónicamente infectados con VHC, naïve al tratamiento con DAAs. Se observó la presencia

de sustituciones aminoacídicas como V55A, Q80K/L, R117H y S122G, asociadas con resistencia *in vivo* e *in vitro* a inhibidores de la proteasa, en el 26,6% de los pacientes incluidos en este estudio (Tabla 3).

Estudios recientes, realizados a partir de secuencias de las bases de datos de Los Alamos así como de *GenBank*, mostraron una alta prevalencia de RASs a inhibidores de la proteasa NS3 (40%), mayoritariamente a SMV. Esta alta prevalencia se explica en gran parte por la presencia de la sustitución Q80K en un 35-37% de las cepas subtipo 1a. Por el contrario, las RASs a IP parecen ser menos frecuentes en cepas subtipo 1b (Chen et al., 2016; Costantino et al., 2015; Paolucci et al., 2012). A nivel mundial existe un vasto relevamiento de RASs, sin embargo, en nuestra región existe poca información con respecto a este tema. En Brasil, diferentes estudios encontraron que entre el 3,2% y 18,9% de los pacientes naïve al tratamiento con DAAs mostraban cepas de VHC con RASs de base (Hoffmann et al., 2013; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres da Silva et al., 2010; Zeminian et al., 2013). Estudios realizados en pacientes naïve en Argentina revelaron que la frecuencia de RASs se encontraba en un 36,9% (51,6% para subtipo 1a y 12,8% para subtipo 1b) (Martínez et al., 2017).

En el presente estudio, la prevalencia de RASs halladas fue del 26,6%. Si bien esta frecuencia se encuentra en el orden de algunos de los estudios realizados a nivel mundial, supera la prevalencia reportada en Brasil (3,2-18,9%), mientras que es inferior a lo reportado en Argentina (36,9%). Los valores reportados para Argentina son mucho más altos que los reportados en la región e incluso en países como Italia, Turquía o Australia (Altunok et al., 2016; Applegate et al., 2015; Vicenti et al., 2012). Esto puede deberse a que en este trabajo, de Martínez y colaboradores, clasifican distintas RAPs como RASs, como por ejemplo la sustitución S122N, la cual se ha confirmado no tiene efectos sobre DAAs (Lenz et al., 2015), o bien las RAPs R117C o S/N174A, por lo que se estaría sobreestimando la frecuencia real de RASs en ese país.

Con respecto a la RAS Q80K, asociada a resistencia a SMV, se encontró una alta prevalencia en pacientes naïve al tratamiento con DAAs en Estados Unidos (46%) y Europa (4-16%) (Nishiya et al., 2014; Vidal et al., 2016). Por el contrario, esta sustitución parece ser poco

frecuente en países de la región, como es el caso de Brasil (Hoffmann et al., 2015; Lisboa-Neto et al., 2015; Nishiya et al., 2014; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013). En Argentina, incluso, si bien hay autores que han reportado la presencia de esta RAS utilizando abordajes de secuenciación profunda (Sede, Laufer & Quarleri, 2015), no hay reportes de la presencia de esta sustitución en pacientes naïve al tratamiento con DAAs en estudios de secuencias consenso (Martínez et al., 2017). En esta tesis se identificó, a nivel de la secuencia consenso, un único paciente con la sustitución Q80K, por lo que sería, sin dudas, de gran importancia ampliar el número de pacientes estudiados así como incorporar nuevas metodologías de detección, como pueden ser los abordajes de secuenciación masiva.

La sustitución Q80K se ha hallado frecuentemente asociada a otras sustituciones. La presencia de esta sustitución por sí sola se ha asociado a resistencia a ASV (McPhee et al., 2012), PTV (Pilot-Matias et al., 2015), GZV (FDA, 2016) y SMV (Lenz et al., 2010; Verbinnen et al., 2015). Sin embargo, al asociarse con otras sustituciones los niveles de resistencia pueden aumentar, este es el caso de la asociación de Q80K con las RASs R155K o D168V/E, las cuales producen un aumento en la resistencia a ASV (McPhee et al., 2012). También en combinación con D168V/E/Y genera un fenotipo resistente a GZV, mientras que asociada a R155K confiere mayor resistencia a PTV (Pilot-Matias et al., 2015; Sorbo et al., 2018). En este estudio se observó un paciente genotipo 1a con la asociación de la RAS Q80K con la RAS S122G (asociada a baja resistencia al SMV y, en combinación con R155K, a VOX) (Halfon & Locarnini, 2011; Howe et al., 2014; Lenz et al., 2010; Sorbo et al., 2018; Verbinnen et al., 2015; Zeuzem et al., 2015).

Este trabajo reporta, además, otras RASs de interés como son: V55A, Q80L y R117H. La sustitución R117H confiere susceptibilidad reducida al TVR en el G1, tanto subtipo 1a como 1b (Martínez et al., 2017; Patiño-galindo et al., 2016), sin embargo, considerando que la producción de TVR ha sido discontinuada gracias a la disponibilidad de inhibidores de NS3 más efectivos, esta RAS parecería no ser relevante ya que no existen estudios que demuestren resistencia cruzada a otros IPs. La sustitución V55A genera resistencia a los DAAs de primera generación: TVR y BOC (Susser et al., 2009), así como susceptibilidad limitada al VOX si se halla junto a las sustituciones Q80R y D168E (Sorbo et al., 2018). La sustitución en la posición 80, pero en esta ocasión la sustitución Q80L, genera muy baja

resistencia a PTV (Pilot-Matias et al., 2015), pero al encontrarse con otras RASs complementarias se asocia a la resistencia a VOX (D168E; T54S + V55I) (Sorbo et al., 2018). Es de relevancia tener presentes estas asociaciones que generan susceptibilidad disminuida o resistencia al VOX, ya que, si bien esta droga no ha sido aprobada aún en nuestro país, podría en un futuro cercano constituir una opción terapéutica real para los pacientes uruguayos.

Es importante destacar que cuando se realizó la búsqueda de RASs en las variantes que componen la cuasiespecie, detectamos únicamente la R123G en un único clon. Esta sustitución emergió ante la presión selectiva de ASV en ensayos *in vitro* donde se pudo constatar que presenta un muy bajo *fitness* (McPhee et al., 2012). Este bajo nivel replicativo podría explicar por qué esta sustitución fue encontrada en una única variante de uno de nuestros pacientes.

Además de las sustituciones asociadas a resistencia, se encontraron polimorfismos en posiciones donde han sido reportadas previamente RASs (RAPs). Estas posiciones, donde una cierta sustitución genera resistencia a un determinado antiviral, muchas veces puede presentar otros cambios aminoacídicos que no necesariamente estén vinculados a resistencia. En este trabajo se detectó la sustitución R117C (en esta misma posición ha sido reportada la RAS a TVR R117H) (Susser et al., 2012). La sustitución R117C ha sido reportada previamente en distintos relevamientos con una prevalencia de 0.6-3% (Altunok et al., 2016; Martínez et al., 2017), la misma, si bien se ha propuesto como sustitución potencial de resistencia, no ha sido corroborada como RAS *in vitro* (Altunok et al., 2016). En cuanto a la posición A39, tres pacientes subtipo 1a presentaron sustituciones en esta posición (A39T/S/G), donde ha sido reportada la sustitución A39V, la cual confiere resistencia *in vitro* a un inhibidor antagonista del cofactor NS4A (Yang et al., 2008). Las RAPs A39T/S/G, podrían ser de interés si se retomara el desarrollo de más antagonistas del cofactor NS4A. Contrario al caso de R117C, no se ha reportado dato alguno de prevalencia de estas sustituciones, así como tampoco se las ha vinculado a resistencia a antagonistas de este cofactor. Estas RAPs fueron detectadas en las secuencias consenso de las cepas en estudio, por lo que este hallazgo podría implicar que estas variantes no afectarían el *fitness* viral.

En la posición R117, el cambio de aa de la RAS reportada (R117H) es de uno básico a uno polar con cadena lateral con un grupo imidazol, mientras que la cisteína (R117C) es un aa apolar con grupo sulfhidrilo, por tanto, ambos casos implican cambios bien distintos en las propiedades fisicoquímicas de los aa. Por el contrario, para las RAPs A39T/S, existe mayor conservación de las cadenas laterales a pesar de ocurrir un cambio de aa apolar por uno polar, mientras que en la RAP A39G se da un cambio entre aa apolares, del mismo modo que sucede en la RAS A39V.

A nivel de variantes de la cuasiespecie se detectó la RAP S122N; en esta posición las variantes resistentes son S122G/R/T. En este caso, se da un cambio entre aa polares, mientras que en el caso de las RASs se pasa de un aa polar a otro apolar, básico o polar, respectivamente. Aunque en la mayoría de las RAS se han visto cambios entre aa con propiedades fisicoquímicas distintas, también se han reportado casos de RAS donde se dan cambios entre aa de propiedades fisicoquímicas similares. En el caso del cambio S122N, las propiedades de ambos aa, polares, son similares, y se ha reportado que esta sustitución no tiene efecto alguno en la acción del SMV (Lenz et al., 2015). De todos modos, es importante destacar que, si la mayoría de las RASs reportadas involucran cambios en las propiedades fisicoquímicas, es importante siempre tener presente los tipos de cambios que se dan en las RAPs.

Hasta este punto, las distintas sustituciones se han considerado principalmente respecto a su efecto sobre la principal función (proteasa) de NS3, pero la mayoría de las sustituciones encontradas en este trabajo no parecen interferir en la unión entre los antivirales directos y el sitio activo de la enzima. Este trabajo confirma el alto grado de conservación de los aa involucrados en la tríada catalítica (H57, D81 y S139), dentro los cuales cualquier sustitución podría tener como consecuencia la pérdida de actividad de la misma, no permitiendo el clivaje de las proteínas NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B y, consecuentemente, no pudiendo generar proteínas virales funcionales (Bartenschlager & Lohmann, 2000; Shang et al., 2014). Por otra parte, la conservación a nivel de los aa que se involucran en la unión con el Zn es esencial a fin de brindar aporte estructural y funcional a la enzima; y en lo que refiere a la región de contacto con NS4A (T3-Q9 y E32-T38) (Yan et

al., 1998), la interacción es indispensable para que NS3 lleve a cabo su actividad serín-proteasa.

Dentro de las sustituciones no asociadas con resistencia se pudieron evidenciar algunas que podrían estar interfiriendo con otras interacciones de NS3. Estas sustituciones se localizan en regiones de NS3 involucradas en la interacción con el ion Zn, con la proteína viral y cofactor de NS3, NS4A, y en la región de interacción entre NS3 y la proteína celular APOBEC3G.

En la proteína NS3, el átomo de Zn está coordinado por tres cisteínas del extremo C-terminal, así como también por un residuo de histidina mediante una molécula de agua. El Zn resulta esencial en la hidrólisis de la unión NS2/3 mediante la molécula de agua a la que se encuentra ligado. Se desconoce si el efecto activador de la función de proteólisis es debido únicamente al correcto plegamiento de la proteasa NS3, desencadenado por la unión a este ion, o si este también puede interaccionar con NS2 (Bartenschlager, 1999; Bartenschlager & Lohmann, 2000; Wu et. al., 1998). Ha sido reportado que el sitio de unión al Zn muestra una mayor conservación que el sitio catalítico de la proteasa NS3. En este trabajo, acorde a la gran conservación de estos aa, se encontraron en secuencias consenso únicamente dos sustituciones en aa próximos a la H149 (A150V y A151V). A nivel de variantes de las cuasiespecies se identificaron sustituciones que involucran residuos de interacción directa o cercanos a la unión con el zinc (C97Y y G100D). Cualquiera de estos cambios podría alterar la interacción entre NS3 y el ion Zn afectando la estabilidad de la proteína y generando virus no viables. Sin embargo, se debe tener presente que el hecho de haber hallado aquellas sustituciones en baja frecuencia dentro de la cuasiespecie, puede hablar de su baja o nula capacidad replicativa, hecho que debería ser probado experimentalmente.

Por otra parte y en referencia a la importancia de la interacción de NS3 y su cofactor NS4A, es importante resaltar que la actividad serín-proteasa de NS3 sólo puede efectuarse en presencia del cofactor. Como se mencionó en la Introducción, la proteína NS4A es fundamental para estructurar los 30 residuos N-terminales de NS3, permitiendo la funcionalidad de esta proteína (Shang et al., 2014). Asimismo, NS4A contribuye posicionando al sustrato correctamente respecto a la tríada catalítica, asegurando la

eficiencia catalítica y la especificidad de sustrato (Raney et al., 2010). En este trabajo se describe la presencia de sustituciones que mapean en o contiguas a aminoácidos involucrados en la unión al cofactor NS4A (S7A, V33I y A40T/G) las cuales podrían estar alterando esta interacción. Las sustituciones S7 y V33 se localizan dentro de los residuos N-terminales de la proteasa involucrados en la unión al cofactor NS4A (T3-Q9 y E32-T38), mientras que el residuo A40, donde se encontraron las sustituciones A40T/G a nivel de las secuencias consenso, se encuentra cercano al sitio de unión con el cofactor y adyacente a una posición de interés, la posición A39 (A39V confiere resistencia *in vitro* a un inhibidor antagonista del cofactor NS4A, como fue mencionado anteriormente).

Por último, este trabajo identificó la presencia de las sustituciones T550A y T550V (en dos secuencias consenso), las cuales se localizan en una de las regiones de NS3 que interacciona con la enzima celular APOBEC3G. APOBEC3G es una enzima citidina deaminasa que restringe la replicación de muchos virus ARN, como VIH o VHC; por tanto, es un factor de la inmunidad innata ante la infección por VHC. Si bien se ha corroborado la actividad inhibitoria de APOBEC3G contra este virus, el mecanismo molecular por el cual esto ocurre permanece aún desconocido. La porción C-terminal de esta enzima celular se une directamente con la porción C-terminal de NS3, reduciendo su actividad helicasa y por tanto la replicación viral (Zhu et al., 2015). El hallazgo de sustituciones a nivel de estas regiones podría estar evidenciando la emergencia de cepas naturales que evadan la acción de APOBEC3G. Esto resulta interesante ya que APOBEC3G ha sido postulado como un potencial agente terapéutico, tanto solo como en terapias en combinación con inhibidores de la proteasa. Por lo tanto, las sustituciones en los residuos de NS3 involucrados en esta interacción se tornan de especial interés por posibles interferencias en la interacción APOBEC3G-NS3 (Peng et al., 2011; Zhu et al., 2015), y que puedan potencialmente estar colaborando en el establecimiento de la cronicidad.

Sería interesante tener presentes a todas estas sustituciones a la hora de pensar nuevas estrategias de cara al tratamiento de cada paciente, más allá de los inhibidores de la proteasa, ya que un estudio más profundo de estas sustituciones podría validar el potencial de las proteínas involucradas como nuevos blancos terapéuticos. En el caso de NS4A, existen ya antecedentes de desarrollos de drogas antagonistas al cofactor que luego fueron

discontinuas (Yang et al., 2008), por lo que, rever estos procesos y la forma en la que fueron evaluados podría indicar el camino hacia nuevos desarrollos en este tipo de drogas antagonistas. Por su parte, respecto a la utilización de APOBEC3G como agente terapéutico, parece ser bastante prometedor, incluso tomando en cuenta que el mecanismo molecular por el cual actúa contra VHC es desconocido, pero dado que actúa contra diversos virus ARN, incluso VIH, las posibilidades de investigación pueden ser amplias. Incluso podría pensarse en evaluar la búsqueda de estos nuevos blancos terapéuticos (NS4A) o agentes terapéuticos (APOBEC3G) no sólo como la búsqueda de alternativas a los actuales DAAs, sino también como complemento a estas terapias.

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman la alta variabilidad genética de este virus, reflejada en una gran variabilidad a nivel de la región que codifica para NS3, lo cual se traduce en un alto número de sustituciones aminoacídicas a nivel de la proteína. Si bien las regiones fundamentales para la acción enzimática de esta proteína se encuentran muy conservadas, se puede observar un gran número de sustituciones; algunas sin importancia funcional aparente así como otras vinculadas a resistencia.

En lo que refiere a las sustituciones de resistencia, poder conocer el patrón de resistencia basal en circulación en nuestro país podrá contribuir a identificar los tratamientos más efectivos para nuestra población. Como se mencionó anteriormente, Uruguay ha aprobado al momento, únicamente, las drogas PTV (en combinación con OBV y Dasasbuvir - Viekira Pak) y la combinación de LDV con SOF. Este trabajo evidenció la existencia de cepas virales naturales con RASs que confieren susceptibilidad disminuida al PTV (Q80L y Q80K) (Echeverría et al., 2016; Pilot-Matias et al., 2015); asimismo, se halló la sustitución P334S, la cual ha sido detectada como emergente en pacientes recaedores y no respondedores al tratamiento con Viekira Pak.

A lo largo de los años, se ha planteado la posibilidad de que la identificación de RASs en la región NS3 de VHC, así como también en las regiones NS5A y NS5B, podría proveer de información valiosa para los médicos tratantes a la hora de tomar una decisión terapéutica. Hoy en día, se sabe que mediante la utilización de estas terapias de combinaciones de DAAs se alcanzan altos niveles de RVS, aún en algunos casos en que se halle una sustitución que

confiera altos niveles de resistencia, cuando el tratamiento se realiza de forma adecuada (Forton, 2016). La RVS dependerá también de otros factores, como ser la presencia o no de cirrosis así como con qué genotipo se encuentra infectado el paciente. Actualmente existe un gran debate con respecto a la utilidad de la identificación de RASs en pacientes naïve como herramienta predictora de respuesta al tratamiento. Por un lado tenemos el alto costo de estos nuevos medicamentos y la poca accesibilidad a estos en países en vía de desarrollo, y por otro: el costo que implica el *screening* de las RASs (Palanisamy et al., 2018). En este punto, la discusión en países como Uruguay se debería centrar en, si frente a pacientes que necesiten de estas drogas de alto costo (las cuales actualmente no son financiadas por el FNR para todos los pacientes), el estudio previo de estas RASs podría ser una guía para el médico tratante a fin de seleccionar la mejor droga y de esta forma optimizar los recursos económicos.

Análisis de localización de las sustituciones encontradas en cepas de VHC subtipo 1a, no reportadas *a priori* como resistentes, en la estructura secundaria y terciaria de NS3

Además de las sustituciones mencionadas anteriormente (RASs, RAPs y de interés en interacciones de NS3), se han encontrado otras sustituciones sin importancia funcional aparente. A fin de determinar su localización y posible implicancia en la generación de resistencia, se realizó el mapeo de las mismas tanto a nivel de la estructura secundaria como terciaria de NS3.

Como se describe en la sección Resultados, las sustituciones identificadas en esta tesis se localizan a lo largo de toda la estructura secundaria de la proteína, a nivel de diferentes tipos de estructuras: hojas β , hélices α e inclusive giros β estrictos. Dentro de estas sustituciones, las que resultaron ser más interesantes fueron la P67S y la P334H/S. En el caso de estas sustituciones se pierde una de las prolina de los giros β estrictos, aa esencial para este tipo de conformaciones, pudiendo alterar de alguna forma la estructura final de NS3 debido a un plegamiento anormal a nivel de estas estructuras (Krieger, Möglich & Kiefhaber, 2005; Müller et al., 1993). La prolina se diferencia de otros aa en que posee un anillo tipo pirrolidina, este anillo de cinco lados se encuentra conectado al carbono β , por lo que los

ángulos Ψ alrededor del enlace peptídico tienen limitada su rotación y, por tanto, las conformaciones de la cadena lateral. Este aa generalmente actúa rompiendo la hélice debido a la ausencia de un grupo amino disponible para la formación de un puente de hidrógeno. Dado que las prolinas reducen los grados conformacionales de libertad en la mayoría de los polipéptidos, incrementan la termo-estabilización y la cooperatividad durante el plegamiento proteico (Watanabe & Suzuki, 1998), se ha demostrado que al aumentarse estos residuos en los giros cerrados, no se modifica significativamente la estructura secundaria o su función (Takor et al., 2015). Sin embargo, las sustituciones halladas en los giros β estrictos (P67S y la P334H/S) generarían el efecto contrario ya que se estarían removiendo prolinas. Por tanto, dichas variantes podrían afectar negativamente la estructura de la proteasa NS3.

Asimismo, a fin de caracterizar más en profundidad las sustituciones encontradas, se realizó su mapeo en la estructura terciaria de NS3. Estos estudios mostraron que la mayoría de las sustituciones identificadas en este trabajo localizan en la superficie de la proteína, alejadas de la tríada y por ende con poca probabilidad de generar resistencia. Este hecho era esperable, ya que cambios aminoacídicos en regiones de importancia funcional generarían virus no replicativos o con baja eficiencia de replicación, por lo que estas regiones son, en general, las que se evidencian como más conservadas. Estas observaciones nos confirman la gran conservación existente a nivel de la tríada catalítica y a nivel de aa fundamentales en la mantención de la estructura proteica. Las sustituciones *a priori* no reportadas como resistentes parecen, efectivamente, no revertir gran importancia en lo que respecta a la interacción de la proteasa con los antivirales directos ya que localizan en la superficie proteica.

Habitualmente, los residuos que se encuentran en la superficie de una proteína toleran ser sustituidos, dado que los sitios expuestos en el estado nativo se encontrarían también expuestos en el estado desnaturalizado; la sustitución no afectaría la estabilidad de la proteína. De hecho, los cambios energéticos de estas sustituciones han sido reportados como menores en comparación con aquellos que ocurren en el interior de la proteína (Bowie et al., 1990; Reidhaar-Olson & Sauer, 1988; Rennell et al., 1991).

Las sustituciones en posiciones expuestas al disolvente pueden llevar a cambios en las contribuciones de los factores de estabilización proteica (hidrofobicidad, interacción

electrostática, enlaces de hidrógeno, entropía conformacional) (Funahashi et al., 2000). Estudios de mutagénesis a nivel de la superficie de una proteína evidenciaron que se afecta su estabilidad de diversas formas (Herrmann & Bowler, 1997; Pakula & Sauer, 1990; Perl et al., 2000; Tamura & Sturtevant, 1995; Van den Burg et al., 1994). Por ejemplo, cuando un aa en un sitio hiperexpuesto en la superficie se sustituye por un aa hidrofóbico, la proteína puede desestabilizarse a causa de un aumento de la hidrofobicidad (Pakula & Sauer, 1990). Aunque también existen grupos de trabajo que han publicado respecto a los efectos estabilizadores de este tipo de sustituciones (Tisi & Evans, 1995; Van den Burg et al., 1994). Estos resultados sugieren que los efectos de las sustituciones en la superficie de las proteínas sobre la estabilidad conformacional cambian de forma diversa, dependiendo del entorno de los sitios de mutación (Funahashi et al., 2000), por lo cual, estudios *in vitro* y *ex vivo* deberían de llevarse a cabo en caso de querer determinar los efectos de las sustituciones encontradas sobre la estructura y función de NS3/4A.

Estudio de la diversidad de las cuasiespecies de NS3 de cepas de VHC genotipo 1a

Los análisis genotípicos para identificar RASs incluyen a la secuenciación poblacional así como también la secuenciación de nueva generación (NGS, por su sigla en inglés: *Next Generation Sequencing*). Estas técnicas difieren en la habilidad de detectar una mutación específica dentro de la nube de cuasiespecies virales infectantes. La secuenciación poblacional detecta sólo aquellas variantes que se encuentran representadas en más de un 15-20% de la cuasiespecie mientras que la NGS permite detectar incluso aquellas presentes en 0,1-1% de las variantes.

Si bien se ha determinado en ensayos clínicos que solo las RASs presentes en proporciones mayores al 15% son las clínicamente relevantes (Sorbo et al., 2018), existe una infinidad de variantes minoritarias, algunas de las cuales pueden contener RASs, que pueden, eventualmente y frente a alguna presión selectiva, emerger hasta ser las predominantes. Como se mencionó anteriormente, la dinámica de las cuasiespecies virales permite la adaptación frente a diferentes presiones selectivas, un ejemplo de esto es la exposición de una determinada población viral a un cierto DAA, lo que generará que aquellas variantes

virales con susceptibilidad reducida sean probablemente las variantes seleccionadas y determinen un fenotipo resistente a la droga empleada. La inhibición completa de los virus *wild type* sensibles al DAA permitirá entonces que las variantes con susceptibilidad disminuida crezcan rápidamente (Pawlotsky, 2016).

En este trabajo se propuso estudiar la diversidad de las cuasiespecies virales por clonado, con el fin de estudiar aquellas variantes que se encontraban presentes en frecuencias menores a las detectadas por secuenciación poblacional. Con este propósito se seleccionaron 3 muestras del subtipo 1a que a nivel de sus secuencias consenso no presentaban RASs a inhibidores de la proteasa (muestras 624, 983 y 1019).

Como se menciona en la sección Materiales y Métodos, una vez amplificada la región de interés, esta fue clonada y el vector introducido en bacterias competentes para posteriormente seleccionar 100 colonias de cada una de las muestras. Uno de los principales problemas al que nos enfrentamos en esta etapa fue que solamente entre un 29% y un 54% de las colonias seleccionadas (colonias blancas) contenían el inserto de interés. Esto evidenciaba un posible problema en la α -complementación, ya que las colonias deberían de haberse coloreado de azul. Ante esta situación y con el objetivo de diagnosticar el origen del mal funcionamiento, se realizaron múltiples aproximaciones que incluyeron desde renovar todos los reactivos a utilizar nuevas células competentes. Los resultados de los ensayos realizados nos llevaron a la conclusión de que el problema era inherente a la cepa bacteriana utilizada, ya que la misma parecía haber perdido el episoma que codifica para el péptido ω . Esto puede ser debido a que se trabajó con un stock de células no comerciales, las cuales han pasado por múltiples ciclos de descongelamiento y expansiones sin presión selectiva (para conservar el episoma) previo a la generación de las células competentes utilizadas para los ensayos de clonación.

Más allá de los inconvenientes que se presentaron en esta instancia del trabajo, se pudo obtener un buen número de clones como para continuar con el protocolo planteado. En esta etapa los estudios evidenciaron que la mayoría de las variantes dentro de la cuasiespecies presentaban la misma secuencia que su consenso (79,3%, 55,6% y 66,7% de los clones para cada una de las tres muestras analizadas) y se encontraron relativamente pocos cambios,

donde los más relevantes fueron: la RAS R123G, la RAP S122N y las sustituciones involucradas en la interacción con el zinc o contiguas a los residuos de esta interacción (C97Y y G100D, respectivamente), como se describió en la sección anterior. Como ya se ha mencionado en el presente trabajo, ante las bajas frecuencias pero sin haber analizado sus capacidades replicativas (a excepción de la RAS R123G, como se mencionará en la próxima sección), no se puede descartar que sean variantes de poco *fitness* que hayan sido generadas en un momento dado de la infección, pero que puedan replicar de forma ineficiente y generar poca o ninguna progenie.

El hecho de que la RAS R123G se hallara únicamente en una variante de baja frecuencia, podría indicar que estos pacientes serían buenos candidatos para ser tratados con distintos IPs, pero para el caso de la indicación del Viekira Pak sería necesario el análisis previo de las secuencias de NS5A y NS5B para la búsqueda de RASs a DAAs dirigidas a estas proteínas. Esto indica que la secuenciación poblacional y su posterior análisis para la búsqueda de RASs serían suficientes para evaluar el tratamiento terapéutico al cual el paciente debería ser sometido. Igualmente, sería oportuno darle seguimiento a un mayor número pacientes bajo este mismo protocolo (análisis de variantes de menor frecuencia de la cuasiespecies de aquellas muestras que no presentaron RASs en su secuencias consenso) para establecer claramente si esto sucede también en otros casos y evaluar el costo-beneficio de la realización de este análisis de variantes de menor frecuencia en la cuasiespecie a la hora de una decisión terapéutica.

El estudio mediante clonado permitió visualizar con claridad posiciones polimórficas, que en la secuencia consenso se revelaban por picos dobles en primeras y segundas posiciones del codón, generando así la traducción de aa diferentes. Un porcentaje importante (16-39%) de polimorfismos han sido reportados en la secuencia de NS3 de todos los genotipos (Vallet et al., 2011), lo que hace a la necesidad de la generación de secuencias consenso mundiales (tal como se realizó en esta tesis) a la hora de analizar la presencia de sustituciones y que estas no se confundan con variaciones debidas a la diversificación del virus.

Por otra parte, los estudios de MDS nos permitieron evidenciar, como era de esperar, que las variantes que componen la cuasiespecie de cada una de las cepas subtipo 1a seleccionadas

(624, 983 y 1019) se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con las variantes de las otras cepas. Esto refleja la circulación de poblaciones bien diferenciadas en cada paciente, lo cual evidencia una evolución viral distinta dependiendo de características virales y del hospedero.

La tendencia de heterogeneidad observada en la composición aminoacídica se vio en parte también en las distancias nucleotídicas entre las distintas variantes de las cuasiespecies de cada una de las muestras. Para el caso de la muestra 624, los cambios nucleotídicos, al igual que los aminoacídicos, fueron pocos. Para las muestras 983 y 1019, en cambio, se vio mayor variabilidad. Es importante recordar que la variabilidad nucleotídica no siempre se ve reflejada en cambios de aa, ya que sólo habrá cambio aminoacídico si hay cambios en las primeras y segundas posiciones de los codones.

En el presente trabajo, cada una de las cuasiespecies, así como también las variantes mayoritarias, muestran diversas sustituciones, donde la mayoría implican cambios entre aa de igual polaridad seguidos de aquellos que varían entre aa polares y apolares. En el caso de éstos últimos, donde podría verse involucrado un cambio en la hidrofobicidad, debería examinarse a mayor profundidad así como también cuantitativamente, involucrando cada vez un mayor número de cambios aminoacídicos a evaluar.

Estudios de *Docking* molecular

En la proteasa NS3/4A, la unión de alta afinidad al ligando se caracteriza por la formación de una red electrostática que se expande involucrando a los residuos D81, R155, D168 y R123. La interacción R155-D168 es esencial para mantener la superficie electrostática que posicionará a los ligandos para uniones de alta afinidad. La interrupción y reordenamiento de esta interacción electrostática subyace al mecanismo de resistencia de muchos inhibidores de la proteasa, incluyendo ASV, vanoprevir y danoprevir en el G1. La cadena lateral de D168 se desplaza hacia R123 para la interacción electrostática (Soumana et al., 2016). Según reportes recientes (Özen, Sherman & Schiffer, 2013), la interacción R123-D168 se observó en el 30% de los complejos con ASV y vanoprevir, por lo que resulta interesante ahondar en

el rol de R123 en la estabilidad de la red, así como también conocer si el PTV afecta dicha red.

La RAS R123G, sustitución emergente ante la presión selectiva de ASV y que en los estudios de clonado fue encontrada en un único clon proveniente de un único paciente, presenta muy bajo *fitness* (McPhee et al., 2012). Este paciente nunca había sido tratado con ASV, por tanto, esta variante tan ineficiente a nivel replicativo solamente puede surgir en baja frecuencia, y en ausencia de presión selectiva no tiene la capacidad de emerger y predominar en la cuasiespecie. A pesar del bajo *fitness* viral reportado, se encontró a esta RAS interesante para continuar con el objetivo de estudiar si podría afectar la unión del PTV a NS3, dada su resistencia a ASV y teniendo presente que es un residuo involucrado en la generación de la red electrostática para la unión de alta afinidad a los ligandos.

Para poder analizar si la sustitución R123G podría afectar la unión del PTV con la proteasa y a modo de evaluar una posible herramienta de *screening* inicial de RASs, se procedió a realizar el *docking* molecular. Este estudio fue realizado utilizando la estructura 3D de NS3 4A92 (Schiering et al., 2011) con el antiviral macrocíclico acilsulfonamida aprobado en nuestro país, PTV (McCauley & Rudd, 2016), en tres condiciones diferentes: sin mutar (Figura 28), mutando D168Y (Figura 29) y mutando con la sustitución de interés R123G (Figura 30).

Tras realizarse el *docking* molecular en las tres condiciones mencionadas, quedó en evidencia que en la condición resistente (D168Y) y en la condición a evaluar (R123G) había aumento en las distancias evaluadas (Tabla 5) entre el PTV y las posiciones ensayadas (Figuras 28, 29 y 30), así como un posicionamiento del PTV respecto al sitio de unión de NS3 completamente diferente.

Estos resultados darían la pauta de que ensayos de *docking* molecular podrían efectivamente ser útiles como *screening* de posibles sustituciones de resistencia, dado que permitió ver indicios respecto a las sustituciones y sus posibles efectos sobre la unión, en este caso al PTV, en el sentido que se hallaron resultados similares al comparar la mutagénesis D168Y (condición resistente) con la R123G (condición de interés). El posicionamiento diferencial de PTV alejado de la tríada catalítica podría indicar que la droga no es capaz de unirse

correctamente para ejercer su acción. Estas suposiciones podrían confirmarse, por una parte, con ensayos más profundos de modelado que permitan tener en cuenta la red de interacciones electrostáticas que se genera por la unión de alta afinidad entre la NS3 y su ligando, pero fundamentalmente, tras ensayos *ex vivo*, los cuales permitirían evaluar también el *fitness* viral de la variante R123G respecto a la presión selectiva del PTV. En conclusión, el *docking* molecular mostró ser un buen abordaje como un *screening* inicial de sustituciones para evaluar su potencial como nuevas sustituciones de resistencia, previo a embarcarse en ensayos *ex vivo* con replicones.

7. Conclusiones

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de la variabilidad genética del gen que codifica para la serín-proteasa NS3 de VHC en pacientes uruguayos infectados crónicamente y naïve al tratamiento con DAAs. A continuación se describen las principales conclusiones obtenidas en el marco de este trabajo:

- Se logró la puesta a punto de tres metodologías diferentes para obtener las secuencias nucleotídicas de la región que codifica para NS3 del genoma de VHC.
- Este estudio confirma, una vez más, la predominancia de circulación del genotipo 1 de VHC en nuestro país.
- Se evidenció una firma de secuencia aminoacídica característica de las cepas de nuestra región respecto a aquellas del resto del mundo, lo cual estaría indicando una diversificación local de VHC.
- Se estableció por primera vez la presencia y frecuencia de sustituciones asociadas a resistencia a nivel de NS3 en cepas de VHC aisladas de pacientes uruguayos crónicamente infectados naïve al tratamiento. El 26,6% de los pacientes presentaron sustituciones asociadas con resistencia *in vivo* e *in vitro* a IPs de primera, segunda y tercera generación.
- Se detectó además la presencia de sustituciones, que si bien no han sido reportadas como resistentes, se ubican en posiciones donde otra sustitución ha sido asociada a resistencia (RAPs).
- Los estudios de mapeo de las sustituciones encontradas muestran que la gran mayoría caen en la superficie proteica, confirmando la gran conservación de las regiones funcionales fundamentales como son la triada catalítica y las regiones de interacción con el cofactor NS4A y el ion Zn.
- En el estudio de la diversidad de las cuasiespecies de NS3 de VHC genotipo 1a, se constató la presencia de variantes virales con diversas sustituciones, no detectándose en ninguno de los casos estudiados variantes con RASs a IPs a excepción de la sustitución R123G.
- Se detectaron también, en baja frecuencia, sustituciones que no han sido asociadas *a priori* con resistencia a DAAs, pero que se ubican en regiones claves para la

funcionalidad de esta proteína, como son las regiones de contacto con el cofactor NS4A, con el ion Zn o con la enzima celular APOBEC3G.

- Los estudios de *docking* molecular mostraron que la sustitución R123G, reportada como resistente al ASV, también podría afectar la unión del PTV. Esta metodología *in silico* podría representar un abordaje de *screening* inicial de sustituciones de resistencia.
- Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la alta variabilidad genética de VHC, reflejada en una gran diversidad a nivel de la región que codifica para NS3, evidenciada por el hallazgo de numerosas sustituciones a nivel de esta región.

8. Perspectivas

Como perspectivas de esta tesis se plantea:

- 1) Realizar el estudio en un número mayor de pacientes a fin de poder establecer certeramente la frecuencia y tipos de RASs circulantes en nuestro país.
- 2) Realizar estudios de las variantes de la cuasiespecie por secuenciación masiva a fin de poder estudiar variantes minoritarias (frecuencia menor al 1%) y efectivamente poder evidenciar la presencia de RAS en estas poblaciones.
- 3) Los estudios a nivel de la región NS3 podrían complementarse con estudios de variabilidad genética en las otras regiones que codifican para las otras proteínas frente a las cuales se han desarrollado otros DAAs.
- 4) Asimismo, el hallazgo de otras sustituciones abre las puertas al estudio de mutantes de evasión como pueden ser aquellos en los que se encuentran mutados el sitio de unión de la proteína APOBEC3G.
- 5) Por otra parte, sería de interés realizar estudios *in silico* e *in vitro* a fin de evaluar en más profundidad el efecto de las sustituciones a nivel de las prolinas de los giros estrictos en la conformación, funcionalidad y estabilidad de la proteína.
- 6) Mediante los estudios de *docking* molecular se plantea la potencial resistencia de la sustitución R123G al tratamiento con PTV, este hecho deberá ser evaluado en más profundidad con ensayos *in silico* más robustos y ensayos *ex vivo* con replicones de VHC y la droga en cuestión.
- 7) Sería de gran interés además realizar más estudios a fin de corroborar el potencial uso del *docking* molecular como herramienta de *screening* inicial para evaluar posibles sustituciones de resistencia.

9. Bibliografía

- AIDSinfo. (2017). U.S. Department of Health and Human Services (HHS)-National Library of Medicine (NLM), which is part of the National Institutes of Health (NIH). Retrieved from <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/543/ombitasvir-paritaprevir-ritonavir-plus-dasabuvir/182/professional>
- Altunok, E. S., Sayan, M., Akhan, S., Aygen, B., Yildiz, O., Koruk, S. T., ... Yildirmak, T. (2016). Inhibitors Drug Resistance Mutations in Turkish Patients with Chronic Hepatitis C. *International Journal of Infectious Diseases*, 50, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.003>
- Applegate, T. L., Gaudieri, S., Plauzolles, A., Chopra, A., Grebely, J., Lucas, M., ... Matthews, G. V. (2015). Naturally occurring dominant drug resistance mutations occur infrequently in the setting of recently acquired hepatitis C. *Antiviral Therapy*, 20(2), 199–208. <https://doi.org/10.3851/IMP2821>
- Asselah, T. & Marcellin, P. (2013). Interferon free therapy with direct acting antivirals for HCV. *Liver International*, 33(1), 93–104. <https://doi.org/10.1111/liv.12076>
- Baechlein, C., Fischer, N., Grundhoff, A., Alawi, M., Indenbirken, D., Postel, A., ... Becher, P. (2015). Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. *Journal of Virology*, 89(14), 7007–7015. <https://doi.org/10.1128/JVI.00534-15>
- Bartenschlager, R. (1999). The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: Unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *Journal of Viral Hepatitis*, 6(3), 165–181. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.1999.00152.x>
- Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, 81, 1631–1648. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-7-1631>
- Berger, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Terreux, R., Zayas, M., Paul, D., ... Bartenschlager, R. (2014). Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication. *Gastroenterology*, 147(5), 1094–1105.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.019>
- Biebricher, C. K. & Eigen, M. (2005). The error threshold. *Virus Research*, 107(2), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.002>
- Bj ro, K., Fr land, S. S., Yun, Z., Samdal, H. H. & Haaland, T. (1994). Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *The New England Journal of Medicine*, 331(24), 1607–1611.
- Bostan, N. & Mahmood, T. (2010). An overview about hepatitis C: A devastating virus. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 91–133. <https://doi.org/10.3109/10408410903357455>
- Bowie, J. U., Reidhaar-olson, J. F., Lim, W. A. & Sauer, R. T. (1990). Deciphering the

- Message in Protein Sequences. *Science*, 247, 1306–1310.
<https://doi.org/10.1126/science.2315699>
- Bukh, J. (2016). The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *Journal of Hepatology*, 65(1), S2–S21.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.035>
- Burbelo, P. D., Dubovi, E. J., Simmonds, P., Medina, J. L., Henriquez, J. A., Mishra, N., ... Kapoor, A. (2012). Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. *Journal of Virology*, 86(11), 6171–6178.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00250-12>
- Bürgel, B., Friesland, M., Koch, A., Manns, M. P., Wedemeyer, H., Weissenborn, K., ... Ciesek, S. (2011). Hepatitis C virus enters human peripheral neuroblastoma cells - Evidence for extra-hepatic cells sustaining hepatitis C virus penetration. *Journal of Viral Hepatitis*, 18(8), 562–570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01339.x>
- Caiaffa, W. T., Zocratto, K. F., Osimani, M. L., Martínez, P. L., Radulich, G., Latorre, L., ... Weissenbacher, M. (2011). Hepatitis C virus among non-injecting cocaine users (NICUs) in South America: Can injectors be a bridge? *Addiction Research Report*, 106(1), 143–151. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03118.x>
- Castells, M., Bello, G., Ifrán, S., Pereyra, S., Boschi, S., Uriarte, R., ... Colina, R. (2015). Epidemic history of major genotypes of hepatitis C virus in Uruguay. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.021>
- Chambers, T. J., Fan, X., Droll, D. A., Hembrador, E., Slater, T., Nickells, M. W., ... Dibisceglie, A. M. (2005). Quasispecies Heterogeneity within the E1 / E2 Region as a Pretreatment Variable during Pegylated Interferon Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Society*, 79(5), 3071–3083. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.3071-3083.2005>
- Chen, Y., Shang, Y. & Xu, D. (2014). Multi-Dimensional Scaling and MODELLER-Based Evolutionary Algorithms for Protein Model Refinement. *Proceedings of the Congress on Evolutionary Computation Congress on Evolutionary Computation.*, 1038–1045. <https://doi.org/10.1109/CEC.2014.6900443>
- Chen, Z. W., Li, H., Ren, H. & Hu, P. (2016). Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): Mining the GenBank HCV genome data. *Scientific Reports*, 6(20310), 4–12. <https://doi.org/10.1038/srep20310>
- Colina, R., Casane, D., Vasquez, S., Garcı, L., Khan, B., Cristina, J., ... Cristina, J. (2004). Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, 85, 31–37. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19472-0>
- Corman, V. M., Grundhoff, A., Baechlein, C., Fischer, N., Gmyl, A., Wollny, R., ... Drexler, J. F. (2015). Highly Divergent Hepaciviruses from African Cattle. *Journal of Virology*, 89(11), 5876–5882. <https://doi.org/10.1128/JVI.00393-15>
- Costantino, A., Spada, E., Equestre, M., Bruni, R., Tritarelli, E., Coppola, N., ...

- Ciccaglione, A. R. (2015). Naturally occurring mutations associated with resistance to HCV NS5B polymerase and NS3 protease inhibitors in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Virology Journal*, 12(186), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0414-1>
- Cristina, J. & Colina, R. (2006). Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. *Virology Journal*, 3(53), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-53>
- Crooks, G., Hon, G., Chandonia, J. & Brenner, S. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14, 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004.1>
- Deeks, E. D. (2015). Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir Plus Dasabuvir: A Review in Chronic HCV Genotype 1 Infection. *Drugs*, 75(9), 1027–1038. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0412-z>
- Dirchwolf, M., Marciano, S., Mauro, E., Ruf, A. E., Rezzonico, L., Anders, M., ... Fainboim, H. (2016). Clinical epidemiology of acute hepatitis C in South America. *Journal of Medical Virology*, 89(2), 276–283. <https://doi.org/10.1002/jmv.24588>
- Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Martín-Hernández, A. M., Sáiz, J. C. & Escarmís, C. (1998). Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 521–527. <https://doi.org/10.3201/eid0404.980402>
- Domingo, E., Escarmís, C., Lázaro, E. & Manrubia, S. C. (2005). Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Research*, 107(2), 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.003>
- Domingo, E. & Gomez, J. (2007). Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Research*, 127, 131–150. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.001>
- Drexler, J. F., Corman, V. M., Müller, M. A., Lukashev, A. N., Gmyl, A., Coutard, B., ... Drosten, C. (2013). Evidence for Novel Hepaciviruses in Rodents. *PLoS Pathogens*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003438>
- Echeverría, N., Betancour, G., Gámbaro, F., Hernández, N., López, P., Chiodi, D., ... Moreno, P. (2016). Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1 : Their relevance for developing countries, 223, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.07.008>
- Echeverría, N., Moratorio, G., Cristina, J. & Moreno, P. (2015). Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World Journal of Hepatology*, 7(6), 831–845. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i6.831>
- Ertl, P. (2010). Molecular structure input on the web. *Journal of Cheminformatics*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-2-1>
- Esposito, I., Trinks, J. & Soriano, V. (2016). Hepatitis C virus resistance to the new direct-acting antivirals. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12(10), 1197–1209. <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1209484>
- Fabrizi, F., Martin, P. & Messa, P. (2016). New treatment for hepatitis C in chronic kidney

- disease, dialysis, and transplant. *Kidney International*, 89(5), 988–994.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.01.011>
- Farci, P., Alter, H. J., Shimoda, A., Govindarajan, S., Cheung, L. C., Melpolder, J. C., ... Purcell, R. H. (1996). Hepatitis C Virus-associated fulminant hepatic failure. *The New England Journal of Medicine*, 9, 631–634.
- FDA. (2016). ZEPATIER (elbasvir and grazoprevir) tablets, [package insert]. Whitehouse Station, NJ: Merck & CO, Inc. 2016 (approved). Retrieved from
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/208261Orig1s000lbl.pdf
- Feld, J. J. & Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, 436, 967–972. <https://doi.org/10.1038/nature04082>
- Feliu, A., Gay, E., García-Retortillo, M., Saiz, J. C. & Forns, X. (2004). Evolution of hepatitis C virus quasispecies immediately following liver transplantation. *Liver Transplantation*, 10(9), 1131–1139. <https://doi.org/10.1002/lt.20206>
- Firth, C., Bhat, M., Firth, M. A., Williams, S. H., Frye, M. J., Simmonds, P., ... Lipkin, I. W. (2014). Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York city. *MBio*, 5(5), 1–16.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01933-14>.
- Fishman, S. L. & Branch, A. D. (2009). The Quasispecies Nature and Biological Implications of the Hepatitis C Virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1158–1167. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.011>
- FNR. (2018). Fondo Nacional de Recursos. Retrieved from <http://www.fnr.gub.uy>
- Forton, D. M. (2016). How much of a problem is resistance in treating hepatitis C? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(6), 625–631.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000319>
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, R., Smith, C., Marinos, G., GonÇales, F. L. J., ... Yu, J. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 347(13), 975–982.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa020047>
- Funahashi, J., Takano, K., Yamagata, Y. & Yutani, K. (2000). Role of surface hydrophobic residues in the conformational stability of human lysozyme at three different positions. *Biochemistry*, 39(47), 14448–14456. <https://doi.org/10.1021/bi0015717>
- Galli, A. & Bukh, J. (2014). Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C virus. *Trends in Microbiology*, 22(6), 354–364.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.005>
- Gaspareto, K. V., Ribeiro, R. M., De Mello Malta, F., Gomes-Gouvêa, M. S., Muto, N. H., Romano, C. M., ... Rebello Pinho, J. R. (2016). Resistance-associated variants in HCV subtypes 1a and 1b detected by Ion Torrent sequencing platform. *Antiviral Therapy*, 21(8), 653–660. <https://doi.org/10.3851/IMP3057>
- Glue, P., Fang, J. W. S., Rouzier-Panis, R., Raffanel, C., Sabo, R., Gupta, S. K., ... Jacobs,

- S. (2000). Pegylated interferon- α 2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 68(5), 556–567. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.110973>
- González-Candelas, F., Xavier López-Labrador, F. & Bracho, M. A. (2011). Recombination in hepatitis C virus. *Viruses*, 3(10), 2006–2024. <https://doi.org/10.3390/v3102006>
- Götte, M. & Feld, J. J. (2016). Direct-acting antiviral agents for hepatitis C : structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(6), 338–351. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.60>
- Guillou-guillemette, H. Le, Vallet, S., Payan, C., Pivert, A. & Goudeau, A. (2007). Genetic diversity of the hepatitis C virus and antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 13(17), 2416–2426.
- Hadziyannis, S. J., Sette, H. J., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., ... Ackrill, A. M. (2004). Peginterferon- 2a and Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C: a Randomized Study of Treatment Duration and Ribavirin Dose. *Annals of Internal Medicine*, 140(5), 346–355. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-5-200403020-00010>
- Halfon, P. & Locarnini, S. (2011). Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *Journal of Hepatology*, 55(1), 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.011>
- Heathcote, J., Shiffman, M. L., Cooksley, G. E., Dusheiko, G. M., Lee, S. S., Balart, L., ... De Pamphilis, J. (2000). Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *The New England Journal of Medicine*, 343(23), 1673–1680. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012073432302>
- Herrmann, L. M. & Bowler, B. E. (1997). Thermal denaturation of iso- 1 -cytochrome c variants: comparison with solvent denaturation. *Protein Science*, 6, 657–665. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060315>
- Hoffmann, L., Faffe, D. S., Lima, J. F. C., Capitanio, T. A., Cabral, B. C. A., Ürményi, T. P., ... Silva, R. (2015). No correspondence between resistance mutations in the HCV- NS3 protease at baseline and early telaprevir-based triple therapy. *BBA Clinical*, 3, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.01.004>
- Hoffmann, L., Ramos, J. A., De Souza, E. V., De Araújo Ramos, A. L., Villela-Nogueira, C. A., Ürményi, T. P., ... Silva, R. (2013). Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: A prospective longitudinal study. *Virology Journal*, 10(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-57>
- Hoofnagle, J. H. (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, 36(5 I), 21–29. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36227>
- Howe, A. Y. M., Black, S., Curry, S., Ludmerer, S. W., Liu, R., Barnard, R. J. O., ... Dinubile, M. J. (2014). Virologic Resistance Analysis From a Phase 2 Study of MK-

- 5172 Combined With Pegylated Interferon / Ribavirin in Treatment-Naive Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 59, 1657–1665. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu696>
- ICTV. (2017). International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Retrieved from <https://talk.ictvonline.org/>
- Kageyama, S., Agdamag, D. M., Alesna, E. T., Lean, P. S., Heredia, A. M. L., Abellanos-tac-an, I. P., ... Ichimura, H. (2006). A Natural Inter-Genotypic (2b / 1b) Recombinant of Hepatitis C Virus in the Philippines. *Journal of Medic*, 78, 1423–1428. <https://doi.org/10.1002/jmv20714>
- Kalaghatgi, P., Maria Sikorski, A., Knops, E., Rupp, D., Sierra, S., Heger, E., ... Lengauer, T. (2016). Geno2pheno[HCV]- A web-based interpretation system to support hepatitis c treatment decisions in the era of direct-acting antiviral agents. *PLoS ONE*, 11(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155869>
- Kalinina, O., Norder, H., Mukomolov, S. & Magnus, L. O. (2002). A Natural Intergenotypic Recombinant of Hepatitis C Virus Identified in St . Petersburg. *Journal of Virology*, 76(8), 4034–4043. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.4034-4043.2002>
- Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J. A., ... Lipkin, W. I. (2011). Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11608–11613. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101794108>
- Kapoor, A., Simmonds, P., Scheel, T. K. H., Hjelle, B., Cullen, J. M., Burbelo, P. D., ... Lipkin, W. I. (2013). Identification of Rodent Homologs of Hepatitis C Virus and Pegviruses. *MBio*, 4(2), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00216-13>
- Keane, T. M., Creevey, C. J., Pentony, M. M., Naughton, T. J. & McInerney, J. O. (2006). Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology*, 6(29), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-29>
- Korber, B. & Myers, G. (1992). Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 8(9), 1549–1560. <https://doi.org/10.1089/aid.1992.8.1549>
- Krieger, F., Möglich, A. & Kiefhaber, T. (2005). Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *Journal of the American Chemical Society*, 127(10), 3346–3352. <https://doi.org/10.1021/ja042798i>
- Kuiken, C., Yusim, K., Boykin, L. & Richardson, R. (2005). The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics*, 21(3), 379–384. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth485>
- Kumthip, K. & Maneekarn, N. (2015). The role of HCV proteins on treatment outcomes. *Virology Journal*, 12(217), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0450-x>
- Kuo, G., Choo, Q., Alter, H., Gitnick, G., Redeker, A., Purcell, R., ... et, al. (1989). An

- assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 244(4902), 362–364. <https://doi.org/10.1126/science.2496467>
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Avazova, D., Khan, A., Sugauchi, F., Kan, N., ... Khikmatullaeva, A. (2008). in Uzbekistan. *Hepatology Research*, 38, 457–464. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00293.x>
- Laskus, T., Wilkinson, J., Gallegos-Orozco, J. F., Radkowski, M., Adair, D. M., Nowicki, M., ... Rakela, J. (2004). Analysis of hepatitis C virus quasispecies transmission and evolution in patients infected through blood transfusion. *Gastroenterology*, 127(3), 764–776. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.06.005>
- Lauring, A. S. & Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathogens*, 6(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- Legrand-abravanel, F., Claudinon, J., Nicot, F., Dubois, M., Chapuy-regaud, S., Sandres-saune, K., ... Izopet, J. (2007). New Natural Intergenotypic (2 / 5) Recombinant of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 81(8), 4357–4362. <https://doi.org/10.1128/JVI.02639-06>
- Lenz, O., Verbinnen, T., Fevery, B., Tambuyzer, L., Vijgen, L., Peeters, M., ... De Meyer, S. (2015). Virology analyses of HCV isolates from genotype 1-infected patients treated with simeprevir plus peginterferon/ribavirin in Phase IIb/III studies. *Journal of Hepatology*, 62(5), 1008–1014. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.032>
- Lenz, O., Verbinnen, T., Lin, T. I., Vijgen, L., Cummings, M. D., Lindberg, J., ... Simmen, K. A. (2010). In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 1878–1887. <https://doi.org/10.1128/AAC.01452-09>
- Levin, M. K., Wang, Y. H. & Patel, S. S. (2004). The functional interaction of the hepatitis C virus helicase molecules is responsible for unwinding processivity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26005–26012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403257200>
- Li, Z., Zhang, Y., Liu, Y., Shao, X., Luo, Q., Cai, Q. & Zhao, Z. (2017). Naturally occurring drug resistance associated variants to hepatitis C virus direct-acting antiviral agents in treatment-naïve HCV genotype 1b-infected patients in China. *Medicine (United States)*, 96(19), 2–7. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006830>
- Lindenbach, B. D. (2013). Virion Assembly and Release. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 369, 199–218. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_8
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 688–700. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3098>
- Lindsay, K. L., Trepo, C., Heintges, T., Shiffman, M. L., Gordon, S. C., Hoefs, J. C., ... Albrecht, J. K. (2001). A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*, 34(2), 395–403. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.26371>

- Lisboa-Neto, G., Noble, C. F., Rebello Pinho, J. R., Malta, F. M., Gomes-Gouvêa, M. S., Alvarado-Mora, M. V., ... Mendes-Correa, M. C. (2015). Resistance mutations are rare among protease inhibitor treatment-naïve hepatitis C genotype-1 patients with or without HIV coinfection. *Antiviral Therapy*, 20(3), 281–287. <https://doi.org/10.3851/IMP2873>
- Lopez-labrador, F. X., Moya, A. & González-Candelas, F. (2008). Mapping natural polymorphisms of hepatitis C virus NS3/4A protease and antiviral resistance to inhibitors in worldwide isolates. *Antiviral Therapy*, 13(4), 481–494.
- Luz Osimani, M., Latorre, L., Garibotto, G., Scarlatta, L., Chiparelli, H. & Vidal, J. (2005). VIH, hepatitis B, hepatitis C y VDRL en usuarios de cocaína no inyectable en Uruguay. *Adicciones*, 17(2), 157–162. <https://doi.org/10.20882/adicciones.380>
- Ma, H. C., Lin, T. W., Li, H., Iguchi-Ariga, S. M. M., Ariga, H., Chuang, Y. L., ... Lo, S. Y. (2008). Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *Journal of Biomedical Science*, 15(4), 417–425. <https://doi.org/10.1007/s11373-008-9248-9>
- Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., ... Albrecht, J. K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, 358, 958–965. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020047>
- Marsault, E. & Peterson, M. L. (2016). Macrocycles Are Great Cycles: Applications, opportunities, and Challenges of Synthetic Macrocycles in Drug Discovery. *Journal of Medical Chemistry*, 54, 1961–2004. <https://doi.org/10.1021/jm1012374>
- Martin, P., Di Bisceglie, A. M., Kassianides, C., Lisker-Melman, M. & Hoofnagle, J. H. (1989). Rapidly progressive non-A, non-B hepatitis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Gastroenterology*, 97(6), 1559–1561. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2511056>
- Martínez, A. P., Culasso, A. C. A., Pérez, P. S., Romano, V., Campos, R. H., Ridruejo, E., ... Di Lello, F. A. (2017). Polymorphisms associated with resistance to protease inhibitors in naïve patients infected with hepatitis C virus genotype 1 in Argentina: Low prevalence of Q80K. *Virus Research*, 240, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.006>
- McCauley, J. A. & Rudd, M. T. (2016). Hepatitis C virus NS3/4a protease inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 30, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.07.015>
- McPhee, F., Friborg, J., Levine, S., Chen, C., Falk, P., Yu, F., ... Pasquinelli, C. (2012). Resistance analysis of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor asunaprevir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 3670–3681. <https://doi.org/10.1128/AAC.00308-12>
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*, 5(6), 453–463. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1645>

- Morel, V., Descamps, V., Franc, C., Fournier, C., Brochet, E., Capron, D., ... Castelain, S. (2010). Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k / 1b strain during a mixed Hepatitis C infection : A case report &. *Journal of Clinical Virology*, 47, 382–386. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.01.011>
- Moreno, P., Alvarez, M., López, L., Moratorio, G., Casane, D., Castells, M., ... Colina, R. (2009). Evidence of recombination in Hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virology Journal*, 6(203), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-203>
- Müller, G., Gurrath, M., Kurz, M. & Kessler, H. (1993). β VI Turns in peptides and proteins: A model peptide mimicry. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 15(3), 235–251. <https://doi.org/10.1002/prot.340150303>
- Murphy, D. G., Sablon, E., Chamberland, J., Fournier, E., Dandavino, R. & Tremblay, C. L. (2015). Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from Central Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), 967–972. <https://doi.org/10.1128/JCM.02831-14>
- Nalpas, B., Thiers, V., Pol, S., Driss, F., Thepot, V., Berthelot, P. & Brechet, C. (1992). Hepatitis C viremia and anti-HCV antibodies in alcoholics. *Journal of Hepatology*, 14, 381–384.
- Nishiya, A. S., De Almeida-Neto, C., Ferreira, S. C., Alencar, C. S., Di-Lorenzo-Oliveira, C., Levi, J. E., ... Sabino, E. C. (2014). HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS ONE*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086413>
- Noppornpanth, S., Lien, T. X., Poovorawan, Y., Smits, S. L., Osterhaus, A. D. M. E. & Haagmans, B. L. (2006). Identification of a Naturally Occurring Recombinant Genotype 2 / 6 Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 80(15), 7569–7577. <https://doi.org/10.1128/JVI.00312-06>
- Özen, A., Sherman, W. & Schiffer, C. A. (2013). Improving the resistance profile of hepatitis C NS3/4A inhibitors: Dynamic substrate envelope guided design. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(12), 5693–5705. <https://doi.org/10.1021/ct400603p>
- PAHO. (2017). *Supply of blood for transfusion in Latin American and Caribbean countries 2014 and 2015*. Retrieved from <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34083/9789275119587-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pakula, A. A. & Sauer, R. T. (1990). Reverse hydrophobic effects relieved by amino acid substitution at a protein surface. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/344363a0>
- Palanisamy, N., Kalaghatgi, P., Akaberi, D., Lundkvist, A., Chen, Z. W., Hu, P. & Lennerstrand, J. (2018). Worldwide prevalence of baseline resistance-associated polymorphisms and resistance mutations in HCV against current direct-acting antivirals. *Antivir Ther*. <https://doi.org/10.3851/IMP3237>

- Paolucci, S., Fiorina, L., Piralla, A., Gulminetti, R., Novati, S., Barbarini, G., ... Baldanti, F. (2012). Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Virology Journal*, 9(245), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-245>
- Patiño-galindo, J. Á., Salvatierra, K., González-candelas, F. & López-labrador, F. X. (2016). Comprehensive Screening for Naturally Occurring Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antivirals in the NS3 , NS5A , and NS5B Genes in Worldwide Isolates of Viral Genotypes 1 to 6. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(4), 2402–2416. <https://doi.org/10.1128/AAC.02776-15>
- Pawlotsky, J. M. (2003). Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clinics in Liver Disease.*, 7, 45–66.
- Pawlotsky, J. M. (2006). Hepatitis C virus population dynamics during infection. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 299, pp. 261–284). Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_9
- Pawlotsky, J. M. (2016). Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology*, 151(1), 70–86. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.003>
- Pellerin, M., Lopez-Aguirre, Y., Penin, F., Dhumeaux, D. & Pawlotsky, J.-M. (2004). Hepatitis C Virus Quasispecies Variability Modulates Nonstructural Protein 5A Transcriptional Activation, Pointing to Cellular Compartmentalization of Virus-Host Interactions. *Journal of Virology*, 78(9), 4617–4627. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4617-4627.2004>
- Peng, Z. G., Zhao, Z. Y., Li, Y. P., Wang, Y. P., Hao, L. H., Fan, B., ... Jiang, J. D. (2011). Host apolipoprotein b messenger RNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G is an innate defensive factor and drug target against hepatitis C virus. *Hepatology*, 53(4), 1080–1089. <https://doi.org/10.1002/hep.24160>
- Peres-da-Silva, A., de Almeida, A. J. & Lampe, E. (2012). Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(2), 254–261. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000200016>
- Peres da Silva, A., de Almeida, A. J. & Lampe, E. (2010). Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. *Archives of Virology*, 155(5), 807–811. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0642-z>
- Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. & Schmid, F. X. (2000). Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nature Structural Biology*, 7(5), 380–383. <https://doi.org/10.1038/75151>
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. T. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes and Development*, 12(1), 67–83.

<https://doi.org/10.1101/gad.12.1.67>

- PetruzzIELLO, A., Marigliano, S., Loquercio, G., Cozzolino, A. & Cacciapuoti, C. (2016). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology*, 22(34), 7824–7840. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i34.7824>
- Pilot-Matias, T., Tripathi, R., Cohen, D., Gaultier, I., Dekhtyar, T., Lu, L., ... Collins, C. (2015). In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor ABT-450. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 988–997. <https://doi.org/10.1128/AAC.04227-14>
- Pozzato, G., Moretti, M., Franzin, F., Crocé, L. S., Tiribelli, C., Masayu, T., ... Kobayashi, K. (1991). Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet*, 338, 509.
- Quan, P., Firth, C., Conte, J. M., Williams, S. H. & Zambrana-torrelío, C. M. (2013). Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(20), 8194–8199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303037110/-/DCSupplemental>.
- Raney, K. D., Sharma, S. D., Moustafa, I. M. & Cameron, C. E. (2010). Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): A multifunctional antiviral target. *Journal of Biological Chemistry*, 285(30), 22725–22731. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.125294>
- Reidhaar-Olson, J. F. & Sauer, R. T. (1988). Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the information content of protein sequences. *Science*, 241, 53–57. <https://doi.org/10.1126/science.3388019>
- Rennell, D., Bouvier, S. E., Hardy, L. W. & Poteete, A. R. (1991). Systematic mutation of bacteriophage T4 lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 222(1), 67–87. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90738-R](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90738-R)
- Robert, X. & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 320–324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Rosen, H. R. & Gretch, D. R. (1999). Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Molecular Medicine Today*, 5(9), 393–399. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01523-3](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01523-3)
- Russelli, G., Pizzillo, P., Iannolo, G., Barbera, F., Tuzzolino, F., Liotta, R., ... Conaldi, P. G. (2017). HCV replication in gastrointestinal mucosa : Potential extra-hepatic viral reservoir and possible role in HCV infection recurrence after liver transplantation. *PLoS ONE*, 12(7), 1–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181683>
- Salam, K. A. & Akimitsu, N. (2013). Hepatitis C virus NS3 inhibitors: Current and future perspectives. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/467869>
- Salmona, M., Caporossi, A., Simmonds, P., Thélú, M. A., Fusillier, K., Mercier-Delarue,

- S., ... Maylin, S. (2016). First NGS full genome characterization of a hepatitis C virus genotype 7 divergent subtype. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(11), 947.e1-947.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.032>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1096/fj.201600781R>
- Sarrazin, C., Lathouwers, E., Peeters, M., Daems, B., Buelens, A., Witek, J., ... Lenz, O. (2015). Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 patients in the European region. *Antiviral Research*, 116, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.01.003>
- Schiering, N., D'Arcy, A., Villard, F., Simic, O., Kamke, M., Monnet, G., ... Bodendorf, U. (2011). A macrocyclic HCV NS3/4A protease inhibitor interacts with protease and helicase residues in the complex with its full-length target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52), 21052–21056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110534108>
- Sede, M. M., Laufer, N. L. & Quarleri, J. (2015). Previous failure of interferon-based therapy does not alter the frequency of HCV NS3 protease or NS5B polymerase inhibitor resistance-associated variants: longitudinal analysis in HCV/HIV co-infected patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(2), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.011>
- Seeliger, D. & De Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24(5), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>
- Shang, L., Lin, K. & Yin, Z. (2014). Resistance mutations against HCV protease inhibitors and antiviral drug design. *Current Pharmaceutical Design*, 20(5), 694–703. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990008>
- Shao, S. W., Wu, W. B., Bian, Z. Q., Yu, J. G., Zhao, P., Zhao, L. J., ... Qi, Z. T. (2009). Hepatitis C virus F protein inhibits cell apoptosis by activation of intracellular NF-kappaB pathway. *Hepatology Research*, 39(3), 282–289. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00452.x>
- Sibley, S. D., Lauck, M., Bailey, A. L., Hyeroba, D., Tumukunde, A., Weny, G., ... Friedrich, T. C. (2014). Discovery and characterization of distinct simian pegiviruses in three wild African Old World monkey species. *PloS One*, 9(6), e98569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098569>
- Simmonds, P. (1995). Variability of Hepatitis C Virus. *Hepatology*, 21(2), 570–583. <https://doi.org/10.1002/hep.1840210243>
- Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. *Journal of General Virology*, 85(11), 3173–3188. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80401-0>
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T. &

- Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 59(1), 318–327. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>
- Sorbo, A. M. C., Cento, V., Maio, V. C. Di, Howe, A. Y. M., Garcia, F. & Perno, C. F. (2018). Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: update 2018. *Drug Resistance Updates*, 37, 17–39. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.01.004>
- Soumana, D. I., Yilmaz, N. K., Ali, A., Pranchanronarong, K. L. & Schiffer, C. A. (2016). Molecular and Dynamic Mechanism Underlying Drug Resistance in Genotype 3 Hepatitis C NS3/4A Protease. *Journal of the American Chemical Society*, 138(36), 11850–11859. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b06454>
- Susser, S., Schelhorn, S., Lange, C., Welsch, C., Vermehren, J., Perner, D., ... Sarrazin, C. (2012). Ultratiefe Pyrosequenz-Analyse (UDPS) von neu beschriebenen seltenen Resistenzvarianten der Hepatitis C Virus NS3 Protease bei Patienten, die mit Telaprevir oder Boceprevir behandelt wurden. *Z Gastroenterol*, 50(K052), 3–7. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323987>
- Susser, S., Welsch, C., Wang, Y., Zettler, M., Domingues, F. S., Karey, U., ... Sarrazin, C. (2009). Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology*, 50(6), 1709–1718. <https://doi.org/10.1002/hep.23192>
- Takase, S., Tsutsumi, M., Kawahara, H., Takada, N. & Takada, A. (1993). The alcohol-altered liver membrane antibody and hepatitis C virus infection in the progression of alcoholic liver disease. *Hepatology*, 17(1), 9–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678578>
- Takor, G. A., Higashiya, S., Sikirzhyski, V. K., Seeley, J. P., Lednev, I. K. & Welch, J. T. (2015). The role of proline-containing peptide triads in ??-sheet formation: A kinetic study. *Biopolymers*, 103(6), 339–350. <https://doi.org/10.1002/bip.22622>
- Tamura, A. & Sturtevant, J. M. (1995). A thermodynamic study of mutant forms of *Streptomyces subtilisin* inhibitor. III. Replacements of a hyper-exposed residue, Met73. *Journal of Molecular Biology*, 249(3), 646–653. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0325>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tellinghuisen, T. L. & Rice, C. M. (2002). Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Current Opinion in Microbiology*, 5(4), 419–427. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00341-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00341-7)
- Terrault, N. A., Dodge, J. L., Murphy, E. L., Tavis, J. E., Kiss, A., Levin, T. R., ... Alter, M. J. (2013). Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: The HCV partners study. *Hepatology*, 57(3), 881–889.

<https://doi.org/10.1002/hep.26164>

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tisi, L. C. & Evans, P. A. (1995). Conserved structural features on protein surfaces: Small exterior hydrophobic clusters. *Journal of Molecular Biology*, 249(2), 251–258. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0294>
- Tong, X., Chase, R., Skelton, A., Chen, T., Wright-Minogue, J. & Malcolm, B. A. (2006). Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Research*, 70(2), 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.12.003>
- Vallet, S., Viron, F., Henquell, C., Le Guillou-Guillemette, H., Lagathu, G., Abravanel, F., ... Payan, C. (2011). NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1-5. *Antiviral Therapy*, 16(7), 1093–1102. <https://doi.org/10.3851/IMP1900>
- Van den Burg, B., Dijkstra, B. W., Vriend, G., Van der Vinne, B., Venema, G. & Eijssink, V. G. (1994). Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface. *European Journal of Biochemistry*, 220(3), 981–985. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18702.x>
- Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., ... Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>
- Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U. & Mavromara, P. (2002). Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17713–17721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201722200>
- Verbinnen, T., Fevery, B., Vijgen, L., Jacobs, T., De Meyer, S. & Lenz, O. (2015). In vitro activity of simeprevir against hepatitis C virus genotype 1 clinical isolates and its correlation with NS3 sequence and site-directed mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7548–7557. <https://doi.org/10.1128/AAC.01444-15>
- Vicenti, I., Rosi, A., Saladini, F., Meini, G., Pippi, F., Rossetti, B., ... Zazzi, M. (2012). Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3 / 4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 984–987. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr581>
- Vidal, L. L., Soares, M. A. & Santos, A. F. (2016). NS3 protease polymorphisms and genetic barrier to drug resistance of distinct hepatitis C virus genotypes from worldwide treatment-naïve subjects. *Journal of Viral Hepatitis*, 23(11), 840–849. <https://doi.org/10.1111/jvh.12503>

- Watanabe, K. & Suzuki, Y. (1998). Protein thermostabilization by proline substitutions. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 4(4), 167–180. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(97\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(97)00031-3)
- Weltman, W. D., Brotodihardjo, A., Crewe, E. B., Farrell, G. C., Bilous, M., Grierson, J. M. & Liddle, C. (1995). Coinfection with hepatitis B and C or B, C and D viruses results in severe chronic liver disease and responds poorly to interferon- α treatment. *Journal of Viral Hepatitis*, 2, 39–45.
- WHO, 2017. (2017). Global Hepatitis Report 2017, World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>
- Wu, W. Bin, Shao, S. W., Zhao, L. J., Luan, J., Cao, J., Gao, J., ... Qi, Z. T. (2007). Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology*, 50(5), 341–346. <https://doi.org/10.1159/000107271>
- Wu, Z., Yao, N., Le, H. V. & Weber, P. C. (1998). Mechanism of autoproteolysis at the NS2-NS3 junction of the hepatitis C virus polyprotein. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(3), 92–93. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01180-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01180-3)
- Wyles, D. L. (2013). Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *Journal of Infectious Diseases*, 207(1), 33–39. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis761>
- Xu, Z., Choi, J., Lu, W. & Ou, J. (2003). Hepatitis C Virus F Protein Is a Short-Lived Protein Associated with the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Virology*, 77(2), 1578–1583. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.2.1578-1583.2003>
- Yan, Y., Li, Y., Sardana, V., Cole, J. L., Sardana, M., Steinkuehler, C., ... Chen, Z. (1998). Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: A 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Science*, 7, 837–847. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070402>
- Yang, W., Zhao, Y., Fabrycki, J., Hou, X., Nie, X., Sanchez, A., ... Huang, M. (2008). Selection of replicon variants resistant to ACH-806, a novel hepatitis C virus inhibitor with no cross-resistance to NS3 protease and NS5B polymerase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6), 2043–2052. <https://doi.org/10.1128/AAC.01548-07>
- Yuki, N., Hayashi, N. & Kamada, T. (1993). HCV viraemia and liver injury in symptom-free blood donors. *Lancet*, 342–344.
- Zeminian, L. B., Padovani, J. L., Corvino, S. M., Silva, G. F., Pardini, M. I. D. M. C. & Grotto, R. M. T. (2013). Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(1), 13–17. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100002>
- Zeuzem, S., Feinman, V., Rasenack, J., Heathcote, J., Lai, M.-Y., Gane, E., ... Brunda, M. J. (2000). Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, 343(23), 1666–1672.

<https://doi.org/10.1056/NEJM200012073432301>

- Zeuzem, S., Ghalib, R., Reddy, K. R., Pockros, P. J., Ari, Z. Ben, Zhao, Y., ... Butterton, J. R. (2015). Grazoprevir-Elbasvir combination therapy for treatment-naïve cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus genotype 1, 4, or 6 infection: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 163(1), 1–13.
<https://doi.org/10.7326/M15-0785>
- Zhu, Y. P., Peng, Z. G., Wu, Z. Y., Li, J. R., Huang, M. H., Si, S. Y. & Jiang, J. D. (2015). Host APOBEC3G protein inhibits HCV replication through direct binding at NS3. *PLoS ONE*, 10(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121608>

10. *Apéndice*

Tabla Suplementaria 1. Número de acceso de las secuencias de NS3 de VHC representativas de cada genotipo utilizadas para realizar el árbol filogenético.

Genotipo	País	GenBank Accession Nr
1a	Brasil	EF032886
	China	KC844049
	Alemania	EU256107
	Japón	D10749
	USA	AF009606
	USA	EU155213
	USA	EU155214
	USA	EU155233
	USA	EU155238
1b	Brasil	EF032892
	Alemania	AJ132996
	Alemania	AJ238799
	Corea del Sur	U01214
	Corea del Sur	U16362
	Rusia	AF176573
	Suiza	EU155359
	Taiwan	DQ071885
	USA	EU155264
1c	China	KC844047
	India	AY051292
	Indonesia	D14853
2a	China	KF676352
	Dinamarca	KC967476
	Japón	AB047639
	Japón	AY746460
	Japón	AB690460
	USA	KF700370
2b	Dinamarca	JQ745651
	Francia	KC197226
	Japón	D10988
	Japón	AB559564
	USA	DQ430815
	USA	DQ430817
3a	China	KC844041
	India	GQ275355
	India	JQ717260
	Irlanda	JQ514563
	Nueva Zelanda	D17763
	USA	AY956467
3b	China	JQ065709

	China	KC844044
	India	DQ284965
	Japón	D49374
4a	Egipto	Y11604
	Egipto	DQ988073
	Francia	GU085486
	Japón	AB795432
	España	DQ516084
5a	China	KC844046
	Francia	GU085487
	Sudáfrica	KC767831
	Sudáfrica	KC767833
	Reino Unido	Y13184
6a	China	HQ912954
	China	KC844037
	Hong Kong	AY859526
	Hong Kong	DQ480513
	Hong Kong	DQ480512
7a	Canada	EF108306

Tabla Suplementaria 2. Secuencias de NS3 utilizadas para generar la secuencia 1a consenso mundial, referencia de los análisis de sustituciones.

País	GenBank Accession Nr		
USA	AF009606	EU155236	EU255966
	DQ889252	EU155237	EU255967
	DQ838739	EU155238	EU255968
	DQ838745	EU155338	EU255969
	DQ889262	EU155339	EU255970
	DQ889263	EU155340	EU255971
	DQ889267	EU155341	EU255973
	DQ889280	EU155342	EU255975
	DQ889291	EU155343	EU781746
	DQ889292	EU155344	EU862827
	DQ889301	EU234063	FJ024274
	DQ889303	EU234064	FJ024275
	DQ889319	EU234065	FJ390394
	EF032883	EU255935	JX463525
	EF032884	EU255936	JX463526
	EF032885	EU255937	JX463530
	EU155214	EU255942	JX463586
	EU155215	EU255965	
Brasil	EF032886	EF032896	EF032900
	EF032887	EF032898	
Alemania	EU482873	EU687194	JQ914274
	EU256107	EU687195	JQ914272
	EU482832	EU862824	JQ914273
	EU687193	EU862832	KC155254
España	DQ068178	DQ068180	DQ068182
	DQ068179	DQ068181	
Suiza	EU155345	EU482854	EU482858

	EU155346	EU482857	EU660385
	EU155350	EU255943	EU155352
	EU256071	EU255944	EU155355
	EU256073	EU255945	EU862836
	EU482853	EU255946	EU255947
Italia	JN704198	JN704293	
Australia	JQ417894	JX437292	
Nueva Zelanda	JX437282	JX437299	
Japón	D10749		
China	KC844049		
No documentado	EU781805	EU781809	AJ278830
	EU781807	AB520610	EU781810
			EU781811

Tabla Suplementaria 3. Secuencias de NS3 utilizadas para generar la secuencia 1b consenso mundial, referencia de los análisis de sustituciones.

País	GenBank Accession Nr		
USA	EF407459	EU155218	EU155332
	EF407460	EU155219	EU155334
	EF407470	EU155224	FJ024086
	EF407471	EU155235	FJ024277
	EF407472	EU155262	FJ390397
	EF407483	EU155263	FJ390398
	EF407485	EU155325	FJ478453
	EF407498	EU155326	HQ110091
	EF407500	EU155330	
	EU155217	EU155331	
Brasil	EF032892	EF032893	EF032894
Alemania	AJ238799	EU155381	U45476
	AJ132997	EU482833	
Suiza	EU155356	EU155361	EU155368
	EU155357	EU155362	EU155376
	EU155358	EU155363	EU482875
	EU155360	EU155364	
Irlanda	AB154177	AB154180	AB154191
	AB154178	AB154181	AB154192
	AB154179	AB154190	AB154193
Francia	JN120912		
Turquía	AF483269		
Rusia	AF176573	AY587844	
Japón	AB049087	AF165046	AF207754
	AB049088	AF165054	D50481
	AB249644	M58335	D50482
	AB429050	X61596	D89815

	AF165045	AF207753	D50480
China	AY587016	GU451220	HQ639947
	D10934	GU451223	KC844051
	GU451218	GU451224	KC844052
	GU451219	HQ639946	L02836
Taiwan	M84754	DQ071885	
Corea del Sur	U01214	U16362	
Australia	AJ000009		
No documentado	M96362	D85516	EU781830
	AB080299	D30613	EU781831
	EU781825	D45172	AB691953
	EU781826	AF313916	AB779562
	EU781827	AF356827	AB779679
	EU781828	EU781829	

Tabla Suplementaria 4. *Accession numbers* de las secuencias de NS3 de VHC utilizadas en el análisis de VESPA.

País	GenBank Accession Nr		
Set de secuencias <i>background</i>			
Australia	JQ417894	JX437346	JX437308
	EF139671	JX437348	JX437311
	EF139676	JX437342	JX437323
	EF139683	EF139657	JX437357
	EF139695	EF139658	JX437361
	EF139759	JX437292	
	EF139773	JX437307	
Nueva Zelanda	JX437293	JX437331	JX437289
	JX437294	JX437339	JX437290
	JX437295	JX437340	JX437291
	JX437298	JX437344	JX437364
	JX437300	JX437345	JX437365
	JX437301	JX437359	JX437367
	JX437302	JX437362	JX437282
JX437330	JX437283	JX437299	
Alemania	EU482873	JQ914274	EU155378
	EU256107	JQ914272	EU155379
	EU482832	JQ914273	EU155380
	EU687193	KC155254	EU256106
	EU687195	EU687194	EU482831
	EU862832	EU862824	EU862833
España	DQ068178	DQ068180	DQ068182
	DQ068179	DQ068181	
Italia	JN704198		

Italia	JN704293		
Suiza	EU256071	EU155352	EU862836
	EU256073	EU155345	EU255947
	EU482853	EU155346	EU255929
	EU482854	EU155350	EU256069
	EU255943	EU482857	EU155348
	EU255945	EU255944	EU155349
	EU255946	EU660385	EU255930
	EU482858	EU155355	
USA	EU781802	EU255967	EF032883
	EU781799	EU255975	EU155214
	EU781790	EU862827	EU155215
	DQ889291	FJ024275	EU155236
	EU781770	FJ390394	EU155342
	EF032884	JX463525	EU155344
	EF032885	JX463526	EU234063
	EU155237	JX463530	EU234064
	EU155238	JX463586	EU234065
	EU155338	AF009606	EU255937
	EU155339	DQ838739	EU255965
	EU155340	DQ838745	EU255966
	EU155341	EU781798	EU255968
	EU155343	DQ889263	EU255969
	EU255935	EU781764	EU255970
	EU255936	EU781765	EU781746
	EU255942	EU781778	FJ024274
Chipre	HQ537007		
Japón	D10749		
China	KC844049		

Set de secuencias problema			
Brasil	EF032886	EF032891	EF032899
	EF032887	EF032895	EF032900
	EF032889	EF032896	EF032897
	EF032890	EF032898	
Uruguay	KX247138	KX236175	KX247143
	KX247142	KX247137	KX247135
	KX236177	KX236172	KX247139
	KX247141	KX247131	KX236171
	KX236173	KX247140	KX247132
	KX236174	KX247136	KX236176

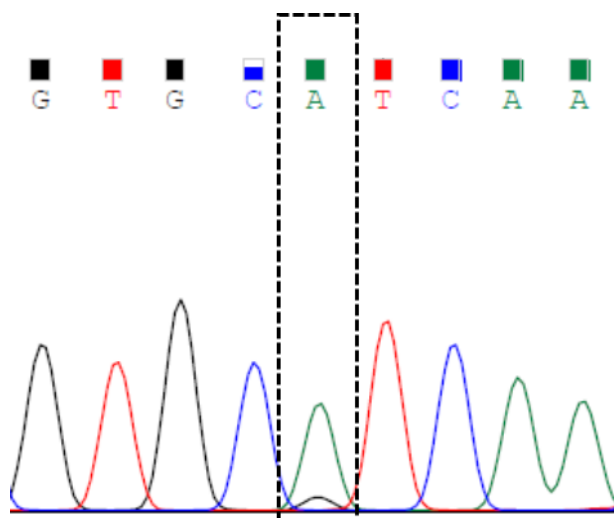


Figura Suplementaria 1. Cromatograma de la secuenciación poblacional (consenso) de la muestra 983. Se recuadra con línea negra punteada la posición del nucleótido 142, donde se evidencia un doble pico en la primera posición del codón codificante para el aa de la posición 48, lo cual hace a esta posición polimórfica.



Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: Their relevance for developing countries



Natalia Echeverría^{a,1}, Gabriela Betancour^{a,1}, Fabiana Gámbaro^a, Nelia Hernández^b, Pablo López^b, Daniela Chiodi^b, Adriana Sánchez^b, Susana Boschi^c, Alvaro Fajardo^a, Martín Sónora^a, Gonzalo Moratorio^a, Juan Cristina^a, Pilar Moreno^{a,*}

^a Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay

^b Clínica de Gastroenterología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11600 Montevideo, Uruguay

^c Laboratorio de Biología Molecular, Asociación Española, Palmar 1465, Montevideo, Uruguay, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2016

Received in revised form 15 July 2016

Accepted 18 July 2016

Available online 19 July 2016

Keywords:

HCV variability

DAAs

Resistance-associated variants

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of global morbidity and mortality, with an estimated 130–150 million infected individuals worldwide. HCV is a leading cause of chronic liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current treatment options in developing countries involve pegylated interferon- α and ribavirin as dual therapy or in combination with one or more direct-acting antiviral agents (DAA). The emergence of resistance-associated variants (RAVs) after treatment reveals the great variability of this virus leading to a great difficulty in developing effective antiviral strategies. Baseline RAVs detected in DAA treatment-naïve HCV-infected patients could be of great importance for clinical management and outcome prediction. Although the frequency of naturally occurring HCV NS3 protease inhibitor mutations has been addressed in many countries, there are only a few reports on their prevalence in South America. In this study, we investigated the presence of RAVs in the HCV NS3 serine protease region by analysing a cohort of Uruguayan patients with chronic hepatitis C who had not been treated with any DAAs and compare them with the results found for other South American countries. The results of these studies revealed that naturally occurring mutations conferring resistance to NS3 inhibitors exist in a substantial proportion of Uruguayan treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1 enrolled in these studies. The identification of these baseline RAVs could be of great importance for patients' management and outcome prediction in developing countries.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a significant human pathogen affecting nearly 3% of the world's population, and is a leading cause of chronic liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Infections with HCV have become a major cause of liver cancer and one of the most common indications for liver transplantation (Hoofnagle, 2002; Martin et al., 2013; Pawlotsky, 2003; Simmonds, 2004; World Health Organization, 2015).

HCV belongs to the family *Flaviviridae* and has a single stranded positive sense RNA genome that is 9.6 kb in length. This genome

contains a single open-reading frame and encodes a unique polyprotein that is processed to yield ten structural (core, E1 and E2) and non-structural (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B) proteins (Scheel and Rice, 2013).

The high error rate of the viral RNA-dependent RNA-polymerase and the pressure exerted by the host immune system, have driven the evolution of HCV towards the development of a global diversity that reveals the existence of seven genetic lineages (genotypes 1–7) and more than 67 subtypes (Smith et al., 2014). Subtypes 1a, 1b and 3a are widely distributed and account for the vast majority of infections in Western countries including the South American region (World Health Organization, 2015).

HCV NS3 protein is responsible for processing the non-structural region of the viral polyprotein. NS3 is a bifunctional protein with an amino-terminal domain exhibiting a zinc-dependent serine protease activity, and a carboxyl-terminal one with helicase activity (Bartenschlager and Lohmann, 2000).

* Corresponding author at: Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Matazo 2055, 11400 Montevideo, Uruguay.

E-mail address: pmoreno@cin.edu.uy (P. Moreno).

¹ both authors contributed equally to this work.

With the advent of direct antiviral agents (DAAs) for the treatment of HCV infections, there is a need to monitor the emergence of resistance-associated variants before and after treatment (Fonseca-Coronado et al., 2012). Although the most recent DAAs increase response rates and allow shortened and simplified regimens, the emergence of genetic variants that could induce changes in the drug binding properties of these compounds, and by doing so, generate resistant phenotypes, is a matter of concern and may jeopardize the effectiveness of DAAs (Wyles, 2013). These resistance-associated variants (RAVs) usually emerge after a few days of DAA treatment and have been accounted responsible for the failure or hyporesponsiveness to treatment. Moreover, they can also be detected in HCV-infected treatment-naïve patients (Applegate et al., 2015).

The circulation of DAAs resistance mutations in treatment-naïve patients has not been reported in depth in South America, with the exception of Brazil (de Carvalho et al., 2014; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013) and Argentina (Sede et al., 2015).

It is extremely important for low income countries, like Uruguay and other South American countries, to determine the presence of naturally occurring RAVs prior to the incorporation of these expensive DAAs regimens to treat HCV-infected patients.

In this study, we investigated the presence of resistance variants to protease inhibitors (PIs) in the HCV NS3 serine protease region, by analysing a cohort of Uruguayan patients with chronic hepatitis C who had not been treated with any DAAs.

2. Materials and methods

2.1. Patients and clinical samples

Serum samples were obtained from 20 patients with serological markers for HCV which attended either the Hospital de Clínicas or the Asociación Española (Montevideo, Uruguay). All of the patients were DAA treatment-naïve at the time of blood extraction. Written informed consent was obtained from all patients. The studies have been performed according to the World Medical Association Declaration of Helsinki and approved by appropriate institutional boards.

2.2. RNA extraction, cDNA synthesis and NS3 amplification

Viral RNA was extracted from serum using the QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN). cDNA synthesis and PCR amplification of the complete NS3 genome region was carried out as previously described (Chusri et al., 2015; Vicenti et al., 2012). Amplicons were purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Lifescience).

2.3. NS3 sequencing

Full-length NS3 sequencing was performed by Macrogen, Korea, with previously described primers (Vicenti et al., 2012).

2.4. NS3 genotype determination and sequence analysis

HCV NS3 sequences obtained from Uruguayan patients were aligned with sequences from strains corresponding to representatives of all HCV genotypes, isolated in different geographic regions of the world. Sequences were obtained from Los Alamos HCV Sequence database (Kuiken et al., 2005). For strains enrolled in these studies, see Supplementary material Table S1. Sequences were aligned using the CLUSTAL W software (Thompson et al., 1994). Once aligned, the best evolutionary model that described our sequence data was assessed using Modelgenerator program (Keane et al., 2006). Using the T92 plus gamma plus invariant sites model,

Maximum Likelihood Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 5.0 software (Tamura et al., 2011). As a measure of the robustness of each node, we employed the bootstrapping method (500 pseudo-replicates).

In order to properly identify substitution changes in NS3 region from HCV strains circulating in Uruguayan patients, we generated consensus sequences for 1a and 1b subtypes using a wide range of NS3 sequences from HCV strains isolated from all regions of the world. For this purpose, we downloaded 110 genotype 1a and 100 genotype 1b NS3 sequences from Los Alamos HCV Sequence database (Kuiken et al., 2005) and aligned them using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994). Once aligned, we generated each genotype consensus sequence by using the Lasergene application SeqMan, Version 7.0.0 (DNASTAR, Madison, WI), and each NS3 sequence derived from Uruguayan patients was compared to the corresponding generated consensus sequence in order to determine the substitutions present.

2.5. Signature pattern analysis of HCV genotype 1a

Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis (VESPA) identifies particular sites in amino acid or nucleic acid alignments of a set of sequences that are distinctly represented between a query set and a background set (Korber and Myers, 1992). The query set included 26 sequences corresponding to HCV NS3 region subtype 1a isolated in South America (Brazil and Uruguay). The background set included 146 sequences corresponding to HCV NS3 region subtype 1a isolated elsewhere, which were downloaded from Los Alamos HCV Sequence Database (Kuiken et al., 2005).

2.6. Mapping amino acid substitutions in NS3 3D structure

The crystallographic structure of HCV NS3 protein was determined by Schiering, and co-workers (Schiering et al., 2011) and deposited in the Protein Data Bank (PDB) under accession ID: 4A92. In order to map amino acid substitutions found in Uruguayan strains, crystallographic data were imported from PDB database and amino acids substitutions found in HCV NS3 protein from Uruguayan patients were mapped using Pymol (Seeliger and De Groot, 2010).

3. Results

3.1. Genetic variability of NS3 genes from HCV circulating in uruguayan patients

To gain insight into the genetic variability of NS3 region of HCV strains circulating in Uruguayan patients, sequences of this region were aligned with corresponding sequences from 59 HCV strains isolated elsewhere, representing all genotypes and main sub-types. For strains included in these analyses, see Supplementary material Table S1. Once aligned, maximum likelihood phylogenetic trees were generated. The results of these studies are shown in Fig. 1.

All strains in the tree are assigned according with their genotype and each cluster is supported by very high Bootstrap values (see Fig. 1). All the strains isolated from Uruguayan patients (n = 20) were assigned to genotype 1 (15 are subtype 1a and 5 are subtype 1b, see Fig. 1).

3.2. NS3 substitution analysis

In order to study the amino acid substitutions in NS3 protein, NS3 sequences obtained from all patients enrolled in this study were aligned using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994) and amino acid substitutions at positions previously found to be potentially associated with resistance to both first and second

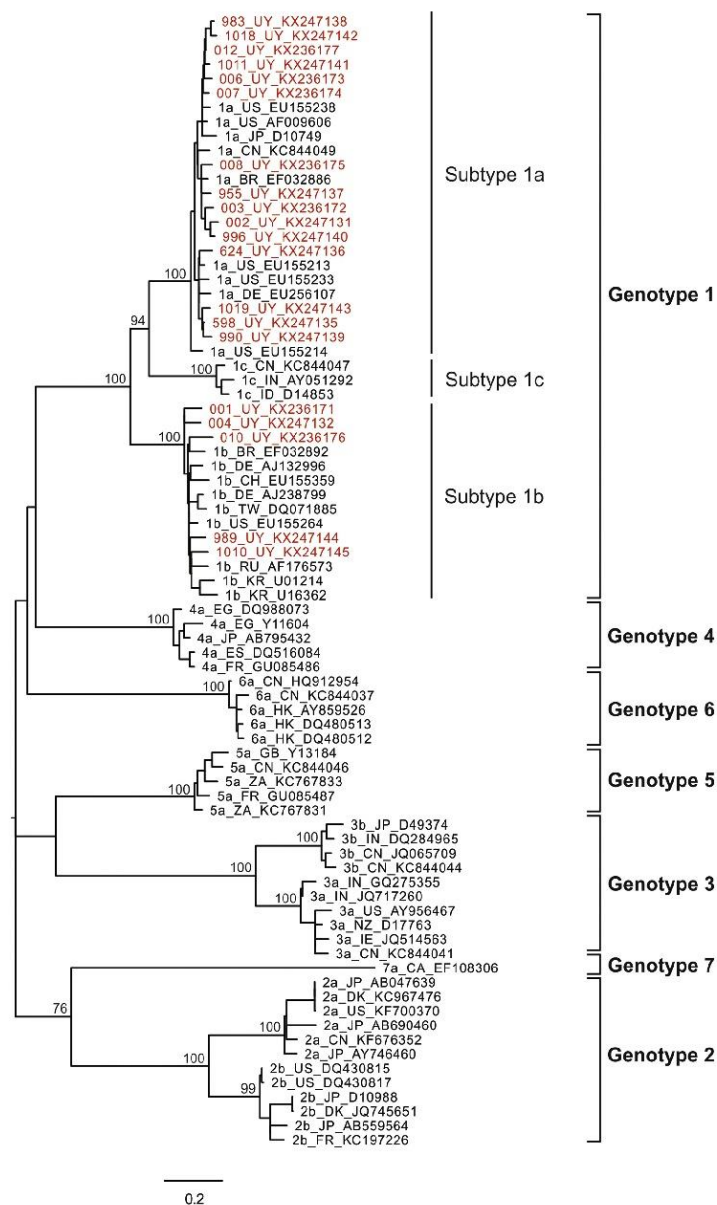


Fig. 1. Maximum-likelihood phylogenetic tree analysis of the NS3 genes of HCV strains circulating in Uruguay. Reference strains in the tree are shown by genotype.country.accession number. Uruguayan strains are shown in red by isolate number.UY.accession number. Numbers at the branches indicate bootstrap values. The bar at the bottom of the tree denotes distance (for interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Table 1
Amino acids substitutions in HCV NS3 protein from DAA treatment-naïve patients.

Isolate	Subtype	Residue	Wild type	Variant	Resistance to DAA
002	1a	80	Q	K	Simeprevir
		122	S	G	Simeprevir
		334'	P	S	Paritaprevir
003	1a	334'	P	S	Paritaprevir
955	1a	55	V	A	Boceprevir/Telaprevir
996	1a	80	Q	K	Simeprevir
		122	S	G	Simeprevir
		334'	P	S	Paritaprevir
1018	1a	80	Q	L	Simeprevir/Paritaprevir
1019	1a	334'	P	S	Paritaprevir
4	1b	342'	S	P	Paritaprevir
10	1b	122	S	R	Simeprevir

* Emergent substitutions in some relapsers and non-responders to OBV, PTV and DSV with or without RBV.

generation protease inhibitors were identified. The results of these studies are shown in Table 1.

In general there was a notable conservation of the catalytic triad, which consists of histidine, aspartic acid and serine residues at positions 57, 81 and 139, respectively, as well as a high conservation in residues that make up the zinc binding site (residues 97, 99, 145 and 149). However, substitutions that confer resistance to both first and second generation protease inhibitors were observed (see Table 1).

RAVs to protease inhibitors were identified in HCV isolates from 5 patients (25% of the patients enrolled in these studies). Of these, 3 patients showed only one mutation associated to DAAs resistance, while the other two showed two different mutations (Q80 K and S122G) (see Table 1). The mutation Q80 K, conferring resistance to simeprevir (SMV), asunaprevir (ASV) and paritaprevir (PTV), as well as to grazoprevir (GZV), and faldaprevir (FDV) was found in two patients, and an additional one has the mutation Q80 L which is associated to PTV and FDV intermediate resistance. Three patients had substitutions at position 122 (S122G/R), RAVs associated to SMV resistance, and only one showed the V55A substitution which confers resistance to both boceprevir (BOC) and telaprevir (TVR). Three patients also exhibited the substitutions P334 S or S342P, which were reported to emerge in some relapsers and non-responder patients to therapy including PTV (Halfon and Locarnini, 2011; Wyles, 2013; Zhang, 2016) (see Table 1).

We also found several polymorphisms not associated, *a priori*, with resistance to DAAs (See Supplementary material Table S2). We found 49 amino acid substitutions in strains of subtype 1a and 42 substitutions in those of subtype 1b. To our knowledge, none of these changes have been previously associated with a resistant phenotype.

3.3. Viral epidemiology signature pattern analysis

In order to test if NS3 sequences from HCV strains isolated in South America have a particular sequence signature that could indicate the result of the local variation observed, a signature pattern analysis was performed to assess viral sequence relatedness.

We analysed a dataset of NS3 sequences from HCV strains circulating in South America (query dataset), and compared them to NS3 sequences from strains isolated elsewhere (background dataset). This study allowed us to identify particular sites in amino acid alignments that are distinctly represented between our query and background datasets. The results of these studies are shown in Fig. 2.

This analysis revealed four sites with significant different amino acid (AA) frequencies (positions 386, 418, 557 and 615), from which only AA position 418 showed a significant variation between HCV NS3 sequences from strains isolated in South America and strains isolated in the rest of the world ($p=1.863 \times 10^{-6}$, Fisher's exact

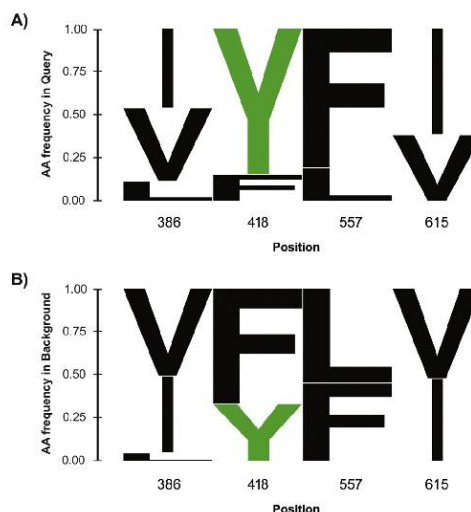


Fig. 2. Weblogo representation of the Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis (VESPA). The height of each amino acid in each position indicates its frequency. The four positions shown represent those NS3 amino acid positions for which a difference in frequencies was observed between the query (A) and the background datasets (B). The tyrosine in position 418 is shown in green. This schematic representation was generated using WebLogo 3 application (Crooks et al., 2004).

test) (see Fig. 2). In this position, 84% of the South American strain sequences have a tyrosine (Y), which is in contrast to the observed pattern within the background dataset, where only 32% exhibit a Y and the majority (66%) of the sequences included exhibits a phenylalanine (F) (Fig. 2).

3.4. Mapping amino acid substitutions found in NS3 HCV strains isolated in Uruguay

As an initial approach to identify if other AA substitutions with no known resistance activity found in HCV NS3 protease from Uruguayan strains could lead to possible structural changes in NS3 protein, we mapped those substitutions in the 3D structure model of the NS3 protein of HCV. The results of these studies are shown in Fig. 3.

Most of the substitutions found are located on the surface of the protein (Fig. 3A) and do not seem to interfere with the active site of the NS3 protein (H57/D81/S139 in NS3 numbering). Importantly, these substitutions do not appear to be close enough to affect the drug binding pocket (i.e. residues within 3 Å of the drug molecule that bind to the active site). Substitutions V58 G and H79D might represent an exception to this finding since both map in the vicinity of the catalytic triad (Fig. 3B).

Additionally, substitutions T98S, A150V and V151A map near residues involved in zinc-binding interactions (Supplementary material Fig. S1), so it could be possible that these mutations may affect this union.

Interestingly, substitution T550A, found in one Uruguayan strain, was recently related to APOBEC3G union. It would be interesting to evaluate in further studies, if changes in residues involved in APOBEC3G interaction could protect HCV from the replication inhibition exerted by this enzyme (Zhu et al., 2015).

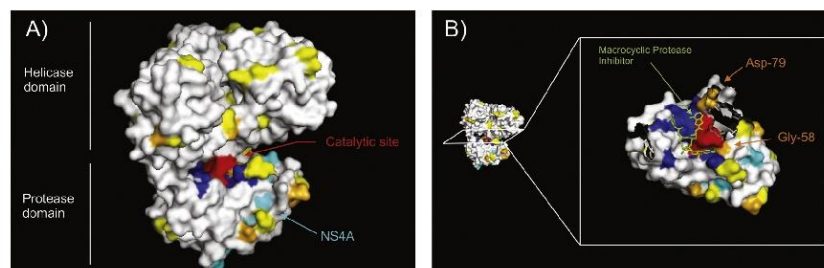


Fig. 3. Mapping of naturally occurring amino acid substitutions in NS3 protein from HCV strains isolated in Uruguay. The 3D structure model of the HCV NS3 protein shown in the figure was obtained by Schiering et al. (2011). Amino acids involved in the NS3 active site are shown in red and residues known to affect resistance to PI are shown in blue (including those found in this work). All other substitutions found in this study are shown in yellow for subtype 1a and in orange for subtype 1b strains. In A) the surface of the complete protein complexed with NS4A (in cyan) is shown indicating the catalytic site. In B) a cross-section of the protease domain complexed with a macrocyclic protease inhibitor (in line) is shown. Sites that might interfere with the drug-binding properties given their proximity to the catalytic site are highlighted in orange (for interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

4. Discussion

The introduction of protease inhibitors constitutes one of the major breakthroughs in HCV treatment. However, the emergence of resistance variants to those inhibitors constitutes an important challenge to the development of suitable anti-HCV therapies.

In this study, we established for the first time the genetic heterogeneity and the frequency of naturally occurring resistant mutations in full-length HCV NS3 protease sequences isolated from 20 Uruguayan patients, chronically infected with HCV, naïve to DAAs treatment (Fig. 1).

AA substitutions such as Q80K, Q80L, S122G, S122R and V55A associated with HCV genotype 1 PI resistance *in vivo* and *in vitro* were observed in 25% of our patients (5/20) (Table 1). To our knowledge this is the first report of circulation of RAVs in Uruguay. Recent studies, both analysing sequences retrieved from the Los Alamos databank as well as from GenBank, revealed that the overall prevalence of RAVs to NS3 protease inhibitors is high (40%), with most of the mutations being associated mainly to SMV resistance through the substitution Q80K, present in around 35–37% of genotype 1a strains (Alves et al., 2013; Chen et al., 2016). Opposite to these findings, RAVs to PI seem to be less frequent in genotype 1b strains (Chen et al., 2016; Costantino et al., 2015; Paolucci et al., 2012). Nevertheless, little is known about DAA RAVs circulation in the South American region. In Brazil, different studies have found that between 3.2% and 18.9% of DAA treatment-naïve patients harboured HCV isolates with baseline RAVs (de Carvalho et al., 2014; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013). Studies carried out in Argentina revealed that only one RAV (Q80K/L/R) was predominant in two out of 18 patients (Sede et al., 2015). The results of this study indicate the presence of DAA RAVs in 25% of the DAA treatment-naïve patients analysed, which suggests that the frequency of such mutations seems to be high in our country (Table 1). In reference to Q80K, a mutation associated with resistance to SMV, it has been found at a high prevalence among treatment-naïve HCV carriers in the United States (46%) and in Europe (4–16%) (Nishiya et al., 2014; Vidal et al., 2016). In contrast, the frequency of Q80K seems to be a rare event in Brazil (Hoffmann et al., 2015; Lisboa-Neto et al., 2015; Nishiya et al., 2014; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013). On the contrary, the results of the present work suggest that the presence of Q80K is high when compared to Brazil or Argentina (de Carvalho et al., 2014; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres-da-Silva et al., 2012; Sede et al., 2015; Zeminian et al., 2013). More studies will be needed in order to address this important issue.

To date, the only drugs currently approved for triple therapy (in combination with IFN and RBV) in Uruguay are TVR and BOC, and even though their production has been worldwide discontinued, they are still available for Uruguayan patients. Although SMV and other macrocyclic drugs have not yet been approved in Uruguay, the data obtained here might prove useful if these drugs are eventually approved in this country. Recently, Uruguay approved a new therapy that involves three DAAs (with or without RBV): Ombitasvir (OBV), PTV and Dasabuvir (DSV), which target the NSSA, NS3 and NSSB, respectively. In the Uruguayan isolates analysed, the only RAV found conferring resistance to PTV was Q80L. However two emerging substitutions (P334S and S342P) were also detected (see Table 1). Considering these data, it is of uttermost importance to address the identification of RAVs in NSSA and NSSB regions in these patients, in order to provide comprehensive information to physicians and help in therapeutic decisions.

Moreover, several other polymorphisms not associated, *a priori*, with resistance to DAAs were observed (Supplementary material Table S2). Mapping these positions in the three-dimensional structure of NS3 showed that the vast majority of these substitutions would apparently affect neither the catalytic triad nor residues involved in the zinc-binding domain (Fig. 3). More studies will be needed to confirm the possible effects of these substitutions, in particular for substitutions V58G and H79D (Fig. 3B), which indeed map close to the catalytic triad, and since they involve changes in the physicochemical properties of the AA, they might affect the 3D structure of the binding pocket (Fig. 3).

The results of the Signature Pattern Analysis showed the presence of an AA signature in NS3 region of HCV subtype 1a strains circulating in the South American region. These substitutions may be characteristic of this geographic region, which in turn might indicate a local diversification of HCV (Fig. 2). A tyrosine (Y) was found in most of the South American isolates in position 418, whereas a leucine (L) was present in the majority of the background dataset sequences. These two amino acids have different physicochemical properties (Y is hydrophilic and L hydrophobic). More studies will be needed in order to address the possible effects of this substitution in the NS3 structure of these HCV genotype 1a strains.

In conclusion, the results of these studies revealed the presence of RAVs in the NS3 region of HCV patients who have not been treated with PI. It is worth mentioning that these results, concerning drug-resistant mutants pre-existing in HCV populations, follow the same pattern previously described for HIV-1 (Domingo et al., 2012), another RNA virus, for which it has long been recognized the

existence of baseline mutations conferring decreased susceptibility to antivirals (Nájera et al., 1994), and even its association with reduced treatment efficacy (Johnson et al., 2008).

Thus, the incidence and persistence of protease resistance mutations occurring in HCV from chronically infected patients in Uruguay should be considered when using PI to treat HCV infection. Due to the fact that the use of DAAs is expensive for Latin American countries, and that they have only become recently available as therapeutic options, we believe that it is vital for our region to be aware of the baseline resistance levels found in each country's isolates. It is important to note that the results obtained in this study highlight the relevance of evaluating the situation in every country of the world in relation to RAVs to DAAs prior to treatment, since each country could have its own pattern of substitutions and frequencies, which might differ from other regions of the world and even from neighbouring countries.

Acknowledgments

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) [project FMV.1.2014.1.104171], PEDECIBA, Comisión Académica de Posgrados, Universidad de la República (UdelaR) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelaR, Uruguay.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.07.008>.

References

- Alves, R., Queiroz, A.T.L., Pessoa, M.G., Da Silva, E.F., Mazo, D.F.C., Carrilho, F.J., Carvalho-Filho, R.J., De Carvalho, I.M.V.G., 2013. The presence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in Hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. *J. Viral Hepat.* 20, 414–421, <http://dx.doi.org/10.1111/jvh.12051>.
- Applegate, T.L., Gaudieri, S., Plauzoll, A., Chopra, A., Grebely, J., Lucas, M., Hellard, M., Luciani, F., Dore, G.J., Matthews, G.V., 2015. Naturally occurring dominant drug resistance mutations occur infrequently in the setting of recently acquired hepatitis C. *Antivir. Ther.* 20, 199–208, <http://dx.doi.org/10.3851/IMP2821>.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., 2000. Replication of the hepatitis C virus. *Baillière's Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 14, 241–254, <http://dx.doi.org/10.1053/bega.1999.0073>.
- Chen, Z., Li, H., Ren, H., Hu, P., 2016. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Sci. Rep.* 6, 20310, <http://dx.doi.org/10.1038/srep20310>.
- Chusri, P., Kumthip, K., Pantip, C., Thongsawat, S., O'Brien, A., Maneekarn, N., 2015. Influence of amino acid variations in the NS3 NS4A and NS4B of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b and 6 on the response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy. *Virus Res.* 196, 37–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.003>.
- Costantino, A., Spada, E., Equestre, M., Bruni, R., Tritarelli, E., Coppola, N., Sagnelli, C., Sagnelli, E., Cicaglione, A.R., 2015. Naturally occurring mutations associated with resistance to HCV NS5B polymerase and NS3 protease inhibitors in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Viral J.* 12, 186, <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0414-1>.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190, <http://dx.doi.org/10.1101/jgr.849004>.
- Domingo, E., Sheldon, J., Perales, C., 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 159–216, <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>.
- Fonseca-Coronado, S., Escobar-Gutiérrez, A., Ruiz-Tovar, K., Cruz-Rivera, M.Y., Rivera-Osorio, P., Vazquez-Pichardo, M., Carpio-Pedroza, J.C., Ruiz-Pacheco, J.A., Cazares, F., Vaughan, G., 2012. Specific detection of naturally occurring hepatitis C virus mutants with resistance to telaprevir and boceprevir (protease inhibitors) among treatment-naïve infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* 50, 281–287, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05842-11>.
- Halfon, P., Locamini, S., 2011. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J. Hepatol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.011>.
- Hoffmann, L., Faffe, D.S., Lima, J.F.C., Capitão, T.A., Cabral, B.C.A., Úrményi, T.P., Coelho, H.S.M., Rondinelli, E., Villela-Nogueira, C.A., Silva, R., 2015. No correspondence between resistance mutations in the HCV-NS3 protease at baseline and early telaprevir-based triple therapy. *BBA Clin.* 3, 146–151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.01.004>.
- Hoofnagle, J.H., 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2002.36227>.
- Johnson, J.A., Li, J.F., Wei, X., Lipscomb, J., Irlbeck, D., Craig, C., Smith, A., Bennett, D.E., Monsour, M., Sandstrom, P., Lanier, E.R., Heneine, W., 2008. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med.* 5, 1112–1122, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0050158>.
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McInerney, J.O., 2006. Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6, 29.
- Korber, B., Myers, G., 1992. Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8, 1549–1560, <http://dx.doi.org/10.1089/Aid.1992.8.1549>.
- Kuiken, C., Yusim, K., Boykin, L., Richardson, R., 2005. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 21, 379–384, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bth485>.
- Lisboa-Neto, G., Noble, C.F., Rebello Pinho, J.R., Malta, F.M., Gomes-Gouveia, M.S., Alvarado-Mora, M.V., Da Silva, M.H., Leite, A.G.B., Piccoli, L.Z., Rodrigues, F.K., Carrilho, F.J., Mendes-Correa, M.C., 2015. Resistance mutations are rare among protease inhibitor treatment-naïve hepatitis C genotype-1 patients with or without HIV coinfection. *Antivir. Ther.* 20, 281–287, <http://dx.doi.org/10.3851/IMP2873>.
- Martin, P., DiMartini, A., Feng, S., Brown, R.J., Fallon, M., 2013. Evaluation for liver transplantation in adults: 2013 practice guideline by the AASLD and the American society of transplantation. *Am. Assoc. Study Liver Dis.*, 1–98, <http://dx.doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7-2>.
- Nájera, I., Richman, D.D., Olivares, I., Rojas, J.M., Peinado, M.A., Peruchio, M., Nájera, R., López-Galíndez, C., 1994. Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1479–1488.
- Nishiya, A.S., de Almeida-Neto, C., Ferreira, S.C., Alencar, C.S., Di-Lorenzo-Oliveira, C., Levi, J.E., Salles, N.A., Mendrone, A., Sabino, E.C., 2014. HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 9, e86413, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086413>.
- Paolucci, S., Fiorina, L., Piralla, A., Gulminetti, R., Novati, S., Barbarini, G., Sacchi, P., Gatti, M., Dossena, L., Baldanti, F., 2012. Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Viral J.* 9, 245, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-245>.
- Pawlotsky, J.-M., 2003. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 587–592, <http://dx.doi.org/10.1097/01.qco.0000104300.87920.03>.
- Peres-da-Silva, A., de Almeida, A.J., Lampe, E., 2012. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 254–261.
- Scheel, T.K.H., Rice, C.M., 2013. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.* 19, 837–849, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3248>.
- Schiering, N., D'Arcy, A., Villard, F., Simic, O., Kamke, M., Monnet, G., Hassiepen, U., Svergun, D.J., Pulfer, R., Eder, J., Raman, P., Bodendorf, U., 2011. A macrocyclic HCV NS3/4A protease inhibitor interacts with protease and helicase residues in the complex with its full-length target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 21052–21056, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1110534108>.
- Sede, M.M., Laufer, N.L., Quarleri, J., 2015. Previous failure of interferon-based therapy does not alter the frequency of HCV NS3 protease or NS5B polymerase inhibitor resistance-associated variants: longitudinal analysis in HCV/HIV co-infected patients. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 219–224, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.011>.
- Seeliger, D., De Groot, B.L., 2010. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock Vina. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 24, 417–422, <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>.
- Simmonds, P., 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol.* <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80401-0>.
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., Simmonds, P., 2014. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59, 318–327, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26744>.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Vicenti, I., Rosi, A., Saladini, F., Meini, G., Pippi, F., Rossetti, B., Sidella, L., Di Giambenedetto, S., Almi, P., De Luca, A., Caudai, C., Zazzi, M., 2012. Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 984–987, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr581>.
- Vidal, L.L., Soares, M.A., Santos, A.F., 2016. NS3 protease polymorphisms and genetic barrier to drug resistance of distinct hepatitis C virus genotypes from worldwide treatment-naïve subjects. *J. Viral Hepat.*, n/a–n/a, <http://dx.doi.org/10.1111/jvh.12503>.

- World Health Organization, 2015. Hepatitis C, fact sheet n°164 [WWW document]. Hepat. C., [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62401-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62401-6).
- Wyles, D.L., 2013. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J. Infect. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis761>.
- Zeminian, L.B., Padovani, J.L., Corvino, S.M., Silva, G.F., Pardini, M.I.D.M.C., Grotto, R.M.T., 2013. Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 13–17.
- Zhang, X., 2016. Direct anti-HCV agents. *Acta Pharm. Sin. B* 6, 26–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.09.008>.
- Zhu, Y.P., Peng, Z.G., Wu, Z.Y., Li, J.R., Huang, M.H., Si, S.Y., Jiang, J.D., 2015. Host APOBEC3 G protein inhibits HCV replication through direct binding at NS3. *PLoS One* 10, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121608>.
- de Carvalho, I.M.V.G., Alves, R., de Souza, P.A.V.M., da Silva, E.F., Mazo, D., Carrilho, F.J., Queiroz, A.T.L., Pessoa, M.G., 2014. Protease inhibitor resistance mutations in untreated Brazilian patients infected with HCV: novel insights about targeted genotyping approaches. *J. Med. Virol.* 86, 1714–1721, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24015>.