



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
Sub-Área Biología Celular y Molecular  
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

# **Aproximación al estudio de la replicación *in vitro* del Virus de la Hepatitis E (HEV) a través de análisis proteómicos y transcriptómicos.**

**Lic. Florencia Cancela**

Orientador: Dr. Juan Arbiza

Sección Virología

Co-Orientador: Dr. Santiago Mirazo

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo

2018

## AGRADECIMIENTOS

*A mi Mamá, Papá y Abuela por el infinito cariño, comprensión, apoyo e impulso a lo largo de mi vida.*

*A mi tutor Dr. Juan Arbiza por haberme permitido desarrollar mi posgrado en virología y por todo el apoyo en el proceso.*

*A mi co-tutor Dr. Santiago Mirazo por sus enseñanzas, buena disposición y apoyo en la realización de este proyecto.*

*Al Tribunal por aceptar evaluar esta tesis.*

*Al Dr. Mario Señorale por abrirme las puertas de su laboratorio con enorme dedicación, transmitiéndome conocimientos valiosos que contribuyeron a mi formación.*

*Al Dr. Francesco Rossi por su muy amable disposición y generosidad en todo momento.*

*Al Dr. Víctor Olavarría por recibirme muy amablemente en su laboratorio de la Universidad Austral de Chile, brindándome herramientas cruciales que aportaron un gran valor a esta tesis.*

*A los integrantes del Laboratorio de Virología de la Universidad Austral de Chile por su cálido recibimiento y muy lindas experiencias compartidas.*

*A la Dra. Andrea Silva de AUSTRAL-omics (UACH) por sus aportes.*

*A todos los integrantes del laboratorio de viro con quienes compartí el día a día con un grupo unido.*

*A mis amigos por acompañarme en este proceso.*

*ANII por la beca de maestría otorgada.*

*CSIC por la financiación del proyecto.*

**INDICE**

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Orígenes del Virus de la Hepatitis E .....	9
1.2 Virología molecular de HEV .....	9
1.2.1 Morfología.....	9
1.2.2 Genoma.....	10
1.2.3 Proteínas virales .....	11
1.2.3.1 ORF1.....	11
1.2.3.2 ORF2.....	14
1.2.3.3 ORF3.....	15
1.2.3.4 ORF4.....	16
1.2.4 Ciclo replicativo de HEV .....	16
1.3 Taxonomía de HEV y distribución geográfica de genotipos .....	19
1.4 Variabilidad genética .....	21
1.5 Transmisión de HEV .....	23
1.5.1 Transmisión fecal-oral.....	24
1.5.2 Transmisión zoonótica .....	25
1.5.3. Transmisión parenteral .....	26
1.5.4 Transmisión vertical .....	27
1.5.5 Transmisión persona-persona .....	27
1.6 Epidemiología.....	28
1.6.1 HEV en regiones en desarrollo .....	28
1.6.2. HEV en regiones desarrolladas .....	30
1.6.3 Grupos de riesgo.....	30
1.6.4 Situación epidemiológica en Latino América.....	32
1.7 Patogénesis.....	33
1.7.1 Presentación clínica en Humanos .....	33
1.7.2 Infección de HEV en animales.....	35
1.8 Diagnóstico.....	36
1.9 Modelos de cultivo celular.....	37
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	38
3. OBJETIVOS.....	39

3.1. Objetivo general.....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL-MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
4.1 Aislamiento viral .....	40
4.1.1 Células A549.....	40
4.1.1.1 Reinfeción de HEV .....	40
4.1.2 Células HepG2.....	41
4.1.2.1 Reinfeción de HEV .....	41
4.1.3 Obtención de cultivo primario de hepatocitos de rata.....	42
4.1.3.1 Tinción Ácido Periódico-Schiff (PAS) .....	42
4.1.3.2. Aislamiento viral.....	43
4.2. Análisis de <i>Mycoplasma sp.</i> en cultivos celulares.....	43
4.3. Detección de HEV en cultivos celulares .....	44
4.3.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) .....	44
4.3.2. Extracción de ARN total celular .....	45
4.3.3. RT-PCR tiempo final .....	46
4.3.4. Electroforesis en gel de agarosa .....	47
4.3.5. Purificación y secuenciación de productos de PCR.....	47
4.3.6. Diseño de curva estándar para cuantificación absoluta por Real Time-RT-PCR.....	48
4.3.6.1. Extracción de ADN plasmídico de pJET-ORF2 .....	48
4.3.6.2. Linealización del vector .....	49
4.3.6.3. Transcripción in vitro.....	50
4.3.6.4. Purificación de los transcritos.....	50
4.3.6.5. Cálculo del número de copias de ARN/ $\mu$ l .....	50
4.3.6.6. RT-PCR tiempo final de transcritos.....	51
4.3.6.7. Amplificación por Real Time RT-PCR .....	51
4.3.6.8. Curva estándar de cuantificación absoluta .....	52
4.4. Análisis transcriptómicos.....	53
4.4.1 Verificación de la integridad del ARN total celular .....	53
4.4.2. Estabilización de muestras para transporte .....	53
4.4.3. Construcción de Librerías .....	53
4.4.4. Secuenciación masiva .....	56
4.4.5. Análisis bioinformático .....	57
4.5. Análisis proteómicos .....	58

4.5.1. Lisis celular.....	59
4.5.2 Cuantificación por método de Bradford.....	60
4.5.3. SDS-PAGE.....	60
4.5.4. Isoelectroenfoque.....	61
4.5.5. Equilibración.....	62
4.5.6. Electroforesis bidimensional.....	63
4.5.7. Identificación de proteínas por espectrometría de masa.....	63
5. RESULTADOS.....	64
5.1. Aislamiento viral.....	64
5.2 Análisis de <i>Mycoplasma sp.</i> en cultivos celulares.....	67
5.3. Detección de HEV en los aislamientos virales.....	67
5.3.1. Inmunofluorescencia indirecta.....	67
5.3.2. RT-nested PCR.....	69
5.3.3. Obtención de curva estándar para Real time-PCR.....	71
5.3.3.1. Linealización del vector pJET-ORF2 HEV.....	71
5.3.3.2. RT-PCR CAP de transcritos.....	71
5.3.3.3. Curva estándar.....	72
5.3.4. Amplificación por Real Time RT- PCR.....	74
5.4. Análisis transcriptómicos.....	77
5.4.1. Análisis de integridad del ARN celular.....	77
5.4.2. Generación de librerías.....	79
5.4.3. Análisis bioinformático.....	79
5.4.3.1. Ontología de genes (GO).....	81
5.5. Análisis proteómicos.....	87
5.5.1. Cuantificación de proteínas por Bradford.....	87
5.5.2. SDS-PAGE.....	88
5.5.3. Electroforesis bidimensional.....	90
5.5.4 Espectrometría de masa.....	92
6. DISCUSIÓN.....	94
7. CONCLUSIONES.....	99
8. PERSPECTIVAS.....	100
9. REFERENCIAS.....	101
10. ANEXOS.....	125
10.1. ANEXO I: Gráfico de escalamiento multidimensional de las réplicas....	125
10.2. ANEXO II: Gráficos de ontología de genes.....	126
10.3. ANEXO III: Lista de DGE-UP y DGE-DOWN.....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramo	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
µl	Microlitro	eHEV	HEV envuelto
µm	Micrómetro	EIF4EBP1	factor eucariota de iniciación de la traducción 4E-BP1
aa	Aminoácidos	ER	Retículo endoplasmático
ADNc	ADN copia	ERK	Quinasa regulada extracelularmente
ADNcdh	ADN copia doble hebra	ESCRT	Complejo de clasificación endosomal para el transporte
AHEV	HEV de aves	FDR	Tasa de descubrimiento falso
ADN	Ácido desoxirribonucleico	FHF	Falla hepática fulminante
APS	Persulfato de amonio	FPKM	Fragmentos por kilobase millón
Arg	Arginina	g/L	Gramos por litro
ARN	Ácido ribonucleico	HEV1-8	Genotipos de HEV 1 al 8.
ARNm	ARN mensajero	GO	Ontología de genes
ARNr	ARN ribosomal	GOA	Base de datos de anotación de ontología de genes
Asn	Asparagina	Hel	Helicasa
Asp	Aspartato	HEV	Virus de la Hepatitis E
ATP	Adenosina trifosfato	His	Histidina
BSA	Seroalbúmina bovina	Hrs	Horas
Cap	Caperuza	HVR	Región hipervariable
CAP	Cápside	IAA	Iodoacetamida
CC	Control de células	ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	IDR	Región intrínsecamente desordenada
CPE	Efecto citopático	IEF	Isoelectroenfoque
CREs	Elementos reactivos <i>cis</i>	IgG	Inmunoglobulina G
Ct	Ciclo umbral	IgM	Inmunoglobulina M
CTV	HEV de trucha	INF	Interferón
DAG	Grafo acíclico dirigido	IPG strips	Tiras de pH inmovilizado
dAMP	Desoxiadenosina monofosfato	IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol	IRF	Factor de regulación de interferón
DGE	Genes diferencialmente expresados	ISG15	Gen 15 interferón-estimulado
DGE-DOWN	Genes diferencialmente sub-expresados	kb	Kilobase
DGE-UP	Genes diferencialmente sobre-expresados	KDa	kilodaltons
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato		
DTT	Ditiotreitol		
E	Eficiencia		

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes		
M	Molar	qPCR	PCR en Tiempo Real
m/z	Relación masa y carga	R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinación
MAPK	Proteína-quinasa activada por mitógeno	RAB	GTPasas proteínas-Ras-relacionadas
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad	RdRp	ARN polimerasa-ARN-dependiente
MDS	Escalado multidimensional	REP	Replicasa
Met o MT	Metiltransferasa	RFU	Unidades relativas de fluorescencia
min	Minutos	RHEV	HEV de ratas
ml	Mililitro	RPM	Revoluciones por minuto
mM	Milimolar	RT-PCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
MS	Espectro de masas		
NCBI	National Center for Biotechnology Information	S	Suero humano infectado con HEV
NCR	Región no codificante	SBS	Secuenciación por síntesis
NF-κB	Factor de transcripción	SDS	Dodecilsulfato sódico
NGS	Secuenciación masiva	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante
nm	nanómetros	seg	Segundos
nm	Nanómetros	SFB	Suero fetal bovino
NSPs	Proteínas no estructurales	SH3	Dominios SRC de homología 3
nt	Nucleótidos	SOCS	Supresor de señalización por citoquinas
NTPasa	Nucleósido trifosfatasa	JAK/STAT	Quinasa Janus/Transductor de señales, activador de la transcripción
°C	Grados Celsius	T	Número de triangulación
ORF	Marco abierto de lectura	TAE	Tris acetato EDTA
Pb	Pares de bases	TCEP	tris (2-carboxyethyl) phosphine
PBS	Fosfato buffer salino	TSG101	Gen 101 susceptible de tumores
PCP o PLP	Cisteína proteasa tipo papaína	Tyr	Tirosina
PEG	Poli(etil)englicol	V	Volts
pI	Punto isoeléctrico	Vhr	Volt horas
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasas	VLPs	Partículas pseudo virales
PM	Marcador de peso molecular	VP13	Fosfoproteína multifuncional
PM	Peso molecular	X	Dominio X
Poli-A	Poli adenilado		
Ppi	Pasajes post-infección		
Pro	Prolina		

## RESUMEN

El Virus de la Hepatitis E (HEV), perteneciente a la familia *Hepeviridae*, género *Orthohepevirus A*, es un virus no envuelto con simetría icosaédrica, pequeño de entre 32-34 nm, con un genoma ARN simple hebra de polaridad positiva y aproximadamente 7,5 Kb de longitud.

En función de análisis filogenéticos, el HEV se clasifica en al menos 8 genotipos (HEV1-8), de los cuales cuatro infectan a humanos, subdividiéndose a su vez en distintos subtipos. La presentación clínica de la enfermedad varía en gravedad, desde subclínica a una hepatitis fulminante.

Adicionalmente, en las zonas de moderada y alta endemicidad, la infección por HEV es la causa más común de hepatitis viral aguda, donde la mayoría de los casos tienen un curso clínico silencioso y los pacientes eliminan el virus rápidamente. Por otro lado, en países no endémicos la infección por HEV presenta una tasa de mortalidad menor al 4%, siendo sin embargo, potencialmente grave en mujeres embarazadas infectadas con cepas de HEV1, ascendiendo el valor de esta tasa a un 20%, debido a que la enfermedad puede progresar a una falla hepática fulminante.

Las principales vías de transmisión del virus son por la ruta fecal-oral y zoonótica, a través del consumo de carnes o productos derivados de cerdo u otros animales infectados. A su vez, se ha demostrado evidencia de transmisión vertical de madre a hijo.

En un contexto nacional, se ha reportado hace pocos años en la Sección Virología los primeros casos de infección autóctona por HEV en humanos, siendo principalmente identificados como HEV3, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, habiéndose detectado además, cepas en cerdos nacionales, el principal reservorio para HEV. Paralelamente, también se halló evidencia de un caso perteneciente al HEV1, asociado a casos esporádicos en nuestro país. Asimismo, recientemente fue detectada la presencia de HEV en una muestra de agua correspondiente al HEV1.

Particularmente, la escasa información disponible referente a aspectos de biología viral de HEV junto con el creciente número de casos clínicos reportados en nuestro país, hace necesario profundizar en el estudio de este virus emergente.

Precisamente, el presente proyecto pretende realizar una primera aproximación a análisis transcriptómicos y proteómicos de la respuesta celular frente a la replicación *in vitro* por HEV, analizando los cambios moleculares inducidos por la replicación viral en células A549. Son extremadamente escasos los antecedentes de análisis proteómicos y transcriptómicos con HEV a nivel mundial, por lo que se trata de un estudio pionero para Uruguay y América Latina.

Primeramente, a partir de suero de pacientes infectados con HEV3, se aisló el virus exitosamente en las líneas celulares A549 (células epiteliales de adenocarcinoma pulmonar humano) y HepG2 (células de hepatocarcinoma humano). No obstante, HepG2 no demostró ser un sistema de propagación eficiente para HEV. Conjuntamente, se obtuvieron cultivos primarios estables de hepatocitos de rata neonata, comprobando no ser susceptibles a la infección por HEV.

Notablemente, se identificaron 2274 genes con expresión diferencial en las células A549, correspondiéndose 1300 a genes sobre-expresados y 1174 a genes sub-expresados.

Análisis de ontología de genes, revelaron que los principales procesos biológicos alterados están asociados a la respuesta al estrés del retículo endoplasmático, regulación de autofagia, catabolismo aminoacídico, metabolismo lipídico, muerte celular necrótica y proliferación celular. Destacadamente, se identificó la desregulación de las vías de señalización de wnt, p38 MAPK, p53 y JAK/STAT.

Respecto al estudio de proteómica, se detectó una proteína sub-expresada para la condición de infección, identificándose como queratina tipo II citoesqueleto 8 isoforma 2.

En conclusión, ambos análisis sugieren que la replicación de HEV en células A549 produce una disminución de la proliferación celular, incrementando la apoptosis, provocando además, un aumento en la respuesta inflamatoria, alterando procesos y vías metabólicas celulares.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Orígenes del Virus de la Hepatitis E (HEV).

El primer reporte asociado a esta enfermedad ocurrió en Nueva Delhi, India entre 1955 y 1956 proveniente de agua contaminada, atribuyéndose inicialmente a hepatitis A (Vishwanathan et al., 1957).

Posteriormente, durante 1978 y 1979 surgió otro brote causando miles de casos de ictericia y fallecidos en Cachemira, India, por lo que se procedió a realizar estudios serológicos utilizando tests (encontrándose disponibles recién para ese momento) a los sueros almacenados para ambas epidemias, no obteniéndose marcadores serológicos específicos para hepatitis A ni para hepatitis B. Por lo tanto, se había identificado un nuevo agente de hepatitis viral entérica no-A no-B, al cual nombraron ET-NANBH (Khuroo et al., 1980; Wong et al., 1980).

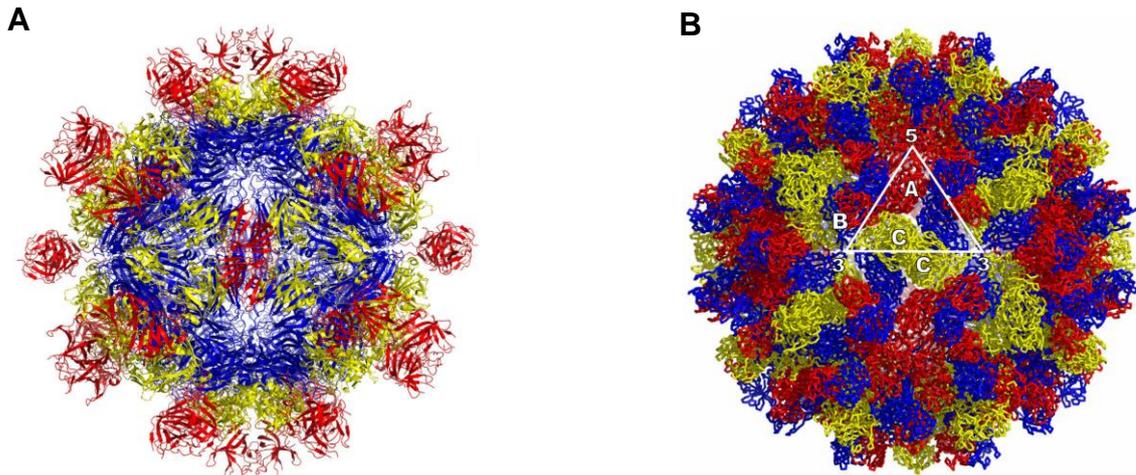
En 1983, un virólogo Ruso visualizó partículas pseudo virales esféricas (VLPs) de aproximadamente 27-30 nm mediante microscopía inmuno-electrónica (IEM) en su propia materia fecal tras auto-administración de heces infectadas provenientes de los brotes, comprobando así su transmisión por vía fecal-oral, observándose además que la misma produjo hepatitis cuando fue inoculada en monos *Cynomolgus* (Balayan et al., 1983).

En 1990, se clonó y se secuenció por primera vez el ADNc (ADN copia) parcial de ET-NANBH, renombrándose a hepatitis E (Reyes et al., 1990). Al año siguiente, se publicó el genoma completo de HEV (Tam et al., 1991).

## 1.2. Virología molecular de HEV.

### 1.2.1. Morfología.

La partícula viral de HEV posee una forma icosaédrica y mide 27- 32 nm de diámetro. Estudios de cristalografía para HEV-VLP permitieron identificar que cada proteína de cápside contiene 3 dominios lineales que forman distintos elementos estructurales. Además, los métodos de modelados estructurales indican que la cápside nativa de HEV T=3 (Figura 1A) contiene dímeros más planos con menos curvatura que los de HEV-VLP T=1 (Figura 1B), sugiriendo que secuencias N-terminal adicionales se requieren para la regulación del tamaño de la partícula (Guu et al., 2009). En 2016, HEV fue declarado como un virus “casi-envuelto” ya que existe de ambas formas, envuelto (eHEV) y desnudo (Yin et al., 2016), al igual que HAV (Feng et al., 2013). Precisamente, HEV se puede encontrar en materia fecal como un virus desnudo, sin embargo, al ser producido en cultivo celular éste presenta una envoltura lipídica (Takahashi et al., 2008), de igual manera se observa para los viriones circulantes en sangre que están recubiertos por membrana celular del hospedero. Esta característica le brinda protección contra los anticuerpos neutralizantes para la forma eHEV (Chapuy Regaud et al., 2017).



**Figura 1 Morfología de HEV.**

(A). Estructura cristalográfica para HEV-VLP T=1, los 3 dominios S (*Shell*), M (*Medio*) y P (*Protruding*) se muestran de azul, amarillo y rojo, respectivamente. (B). Modelo de cápside nativa T=3, se observan las 3 moléculas casi equivalentes A-C en azul, rojo y amarillo, respectivamente. Se encuentra destacada una unidad asimétrica junto con los ejes de simetría icosaédrica. Extraído de Guu et al., 2009.

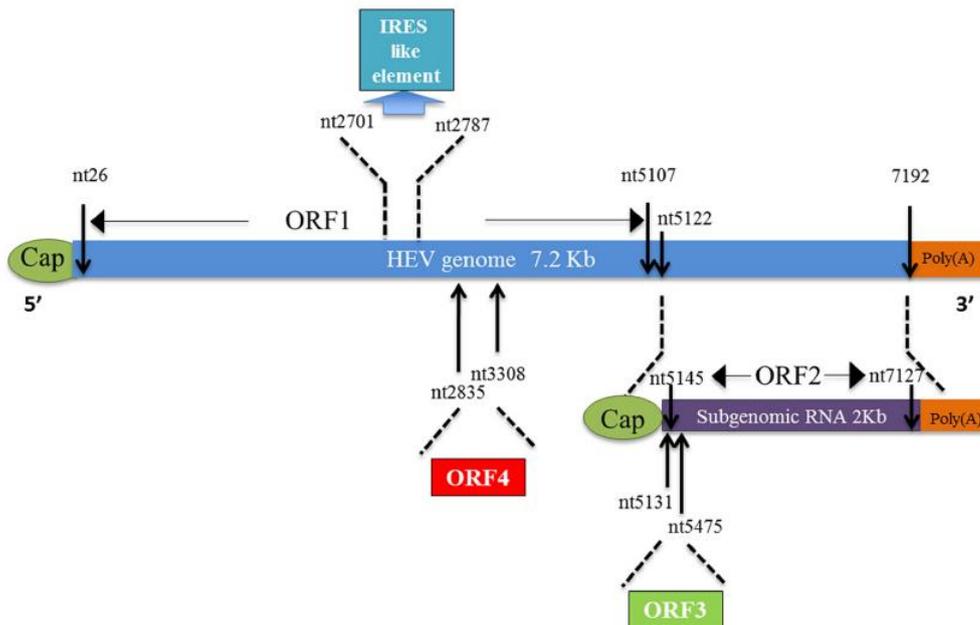
### 1.2.2. Genoma.

HEV contiene un genoma de ARN simple hebra de polaridad positiva de aproximadamente 7,2 Kb, consiste en una corta región no codificante (NCR) en 5' conteniendo una caperuza de 7-metil guanosina (Cap) y una corta 3' NCR terminando en una cola poli-A (Tam et al., 1991). Posee tres marcos abiertos de lectura (ORFs) parcialmente solapados, que codifican las proteínas no estructurales (NSPs), seguidas de una proteína estructural (Tam et al., 1991; Tsarev et al., 1992).

El ORF1, codifica una poliproteína no estructural que consiste principalmente en una replicasa necesaria para la replicación viral. El ORF2 codifica la proteína estructural de cápside y el ORF3 codifica para una pequeña proteína multifuncional (posiblemente una viropirona clase I requerida para la secreción de la partícula viral) (Mori y Matsuura., 2011). Recientemente, se describió un ORF4 solapado dentro de ORF1 solo para el genotipo 1 de HEV y se observó que la expresión de ORF4 es cap-independiente e impulsada por un elemento putativo de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), solamente bajo estrés del retículo endoplasmático, y promueve la actividad de la ARN polimerasa viral para la replicación (Nair et al., 2016). Además del ARN genómico a partir del cual el ORF1 es directamente transcrito, durante la replicación de HEV se genera un ARNm sub-genómico bicistrónico de 2,2 Kb, permitiendo la expresión de ORF2 y ORF3, solapándose entre sí parcialmente o totalmente dependiendo de la especie (Graff et al., 2006).

Asimismo, en el genoma se encuentran dos elementos *cis* reactivos (CREs). El primer CRE se solapa sobre el 3' final de ORF2 y el 3'NCR, siendo esencial para la replicación viral (Cao et al., 2010; Parvez., 2015). Mientras que el segundo CRE se localiza en la

región intergénica del genoma formando una horquilla como estructura secundaria que podría promover la síntesis del ARN sub-genómico (Cao et al., 2010).



**Figura 2. Representación esquemática del genoma de HEV, del ARN subgenómico y de los ORFs.**

Se muestra el ORF1 (26-5107 nt) codificado por el ARN genómico. El ORF2 (5145-7127 nt) y el ORF3 (5131-5475 nt) son codificados por el mismo ARN subgenómico. También se observan los recientemente identificados IRES (2701-2787 nt) y el ORF4 (2835-3308 nt) solapados en el ORF1. Extraído de Nan y Zhang., 2016.

### 1.2.3. Proteínas virales.

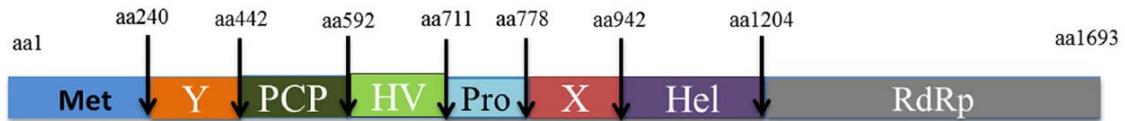
#### 1.2.3.1. ORF1

El ORF1 es el marco abierto de lectura de mayor longitud en el genoma de HEV y posee 5082 nucleótidos (nt) (Tsarev et al., 1992; Emerson et al., 2001). Se extiende desde el extremo 5' del genoma, luego de una región de 25 nt de la NCR. Codifica para una poliproteína de 1693 aminoácidos (aa) necesaria para la replicación. A partir de análisis bioinformáticos, se identificaron 8 dominios funcionales putativos, el dominio de metiltransferasa (Met), dominio Y (Y), cisteína proteasa tipo papaína (PCP o PLP), región hipervariable (HVR), región rica en prolina (Pro), dominio X (X), dominio helicasa (Hel) y ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) (Figura 3) (Koonin et al., 1992).

Hasta el momento, no se conoce con certeza si el producto del ORF1 funciona como una sola poliproteína o si necesita ser posteriormente procesado en unidades más pequeñas por proteasas celulares o virales (Ansari et al., 2000; Ropp et al., 2000; Sehgal et al., 2006; Suppiah et al., 2011; Perttila et al., 2013). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados al respecto indican proteólisis de la poliproteína, actuando por lo tanto, los dominios como unidades independientes (Panda et al., 2000; Ropp et al., 2000; Magden et al., 2001; Parvez, 2013; Paliwal et al., 2014).

Posiblemente, PRO y HVR pueden estar involucradas en la determinación del tropismo

del hospedero, ya que los otros dominios son más conservados entre los genotipos de HEV (Nan y Zhang., 2016).



**Figura 3. Esquema de los dominios putativos en la poliproteína del ORF1.**

Met: metiltransferasa, Y: dominio Y, PCP: cisteína proteasa tipo papaína, HV: región hipervariable, PRO: región rica en prolina, X: dominio X, Hel: dominio helicasa y RdRp: ARN polimerasa ARN dependiente. Los números indican los residuos aminoacídicos aproximados. Extraído de Nan y Zhang., 2016.

#### ✿ Dominio Met.

Es la primer proteína en el extremo N-terminal. Contiene 4 motivos distintos conservados, donde los motivos I, II y IV contienen un residuo de histidina (His) invariante, AspXXArg y una tirosina (Tyr) invariante, respectivamente (Rozanov et al., 1992). Esta proteína cataliza la síntesis de la caperuza de 7-metil guanosina del ARN viral, dicha estructura de caperuza es necesaria para la unión eficiente del ARNm al ribosoma y para que los ARNs virales evadan la activación de la inmunidad innata mediada por interferón (Holla et al., 2013).

#### ✿ Dominio Y

Es el segundo dominio luego de Met, es muy similar al virus de la Rubéola (Koonin et al., 1992). Hasta el momento, no hay información sobre la función de este dominio.

#### ✿ Dominio PCP

Este dominio exhibe moderada similitud al del virus de la Rubéola (Koonin et al., 1992), sin embargo, su función en HEV no es del todo conocida. Ensayos sobre inhibición de proteasa demostraron que PCP es similar a una quimotripsina (Paliwal et al., 2014), lo cual sugiere que es una proteasa real en el procesamiento proteolítico de la poliproteína (Nan y Zhang., 2016).

Asimismo, se ha demostrado que PCP actúa como antagonista de la función del gen 15 interferón-estimulado (ISG15) para inhibir la inmunidad innata del hospedero cuando se expresa junto con Met (Karpe y Lole, 2011).

### ✿ Dominio HVR

Inicialmente, se creía que la región hipervariable servía como una “bisagra” entre el dominio Pro y el macrodominio X, debido a que muchos residuos de prolina en HVR forman estructuras terciarias inestables (Koonin et al., 1992; Tsai et al., 2001; Dosztanyi et al., 2006; Dunker et al., 2008). No obstante, HVR aparenta ser una región intrínsecamente desordenada (IDR), caracterizada por una sostenida inserción o delección de segmentos de genes (Purdy, 2012a; b). Asimismo, desempeña un rol importante en la eficiencia de la replicación de HEV *in vitro* (Pudupakam et al., 2009, 2011).

Por otro lado, si bien esta región es intercambiable entre genotipos, sus diferencias genotipo específicas implican que HVR está involucrada en el tropismo de especies y la adaptación al hospedero (Pudupakam et al., 2011).

### ✿ Dominio Pro

Este dominio es considerado una IDR permitiendo inserciones y deleciones (Purdy, 2012a;b). Está demostrado que es importante para la eficiencia de la replicación *in vitro* (Pudupakam et al., 2009; 2011) así como también es intercambiable entre genotipos con diferencias genotipo específicas (Pudupakam et al., 2011).

A través de estudios bioinformáticos, se descubrió que la IDR contiene motivos lineales, incluidos dos sitios de corte de proteasa, tres sitios de unión a ligando y dos quinasas a lo largo de los genotipos (Purdy et al., 2012b).

### ✿ Dominio X

A pesar de que su función no está descrita aún, se tiene conocimiento que este dominio se asemeja al del virus de la Rubéola, Alfavirus y Coronavirus (Gorbalenya et al., 1991; Koonin et al., 1992). Se lo conoce como macrodominio debido a su semejanza al dominio no-histónico de la histona macroH2A (Pehrson y Fried, 1992; Pehrson y Fuji, 1998).

En un reporte reciente, se sugiere que la heterogeneidad de cuasiespecies del macrodominio podría facilitar la persistencia de HEV en los pacientes con trasplante de órganos (Lhomme et al., 2014).

### ✿ Dominio Helicasa

Las helicasas son proteínas motoras capaces de desenrollar las hebras de ácido nucleico utilizando la energía de la hidrólisis de ATP (Kadare y Haenni, 1997). La helicasa de HEV pertenece a la superfamilia SF-1 conteniendo 7 motivos y se sugiere que posee actividad NTPasa y de desenrollamiento del ARN (Koonin et al., 1992; Kadare y Haenni, 1997). Además, se ha propuesto que consta de actividad 5' trifosfatasa, pudiendo actuar junto con Met para catalizar la formación de la caperuza (Karpe y Lole, 2010). Se observó que los motivos I y III son cruciales y únicos para el funcionamiento de la helicasa (Mhaindarkar et al., 2014).

## ✿ Dominio RdRp

Los virus ARN de polaridad positiva codifican para una ARN polimerasa necesaria para la replicación viral (O'Reilly y Kao, 1998). La RdRp de HEV pertenece al supergrupo III y una muestra amplia similitud al del virus de la Rubéola y al virus de la rizomanía de la remolacha (Koonin et al., 1992). Además, se encuentra localizada en el retículo endoplasmático, el cual puede ser un potencial sitio de replicación para HEV (Rehman et al., 2008).

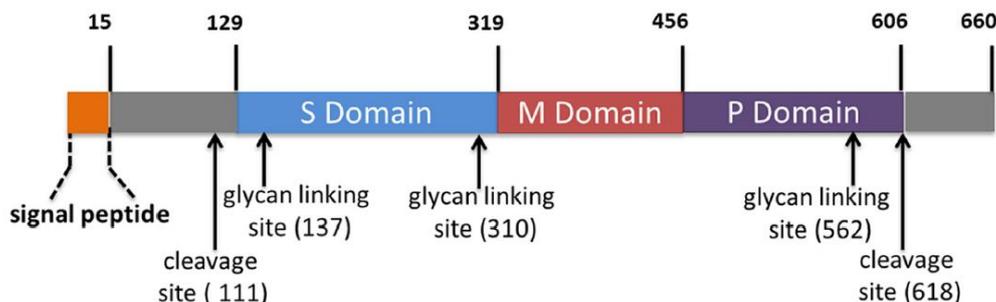
### 1.2.3.2. ORF2

Este marco abierto de lectura tiene 1983 nt de largo (Reyes et al., 1993) y su producto completo posee 660 aa, con una masa molecular aproximada de 72 KDa (Robinson et al., 1998). Además, contiene glicanos unidos amino terminalmente a tres sitios de glicosilación (Asn 137, 310 y 562) y un potencial péptido señal de 15 aa dentro de la región N-terminal que promueve su translocación al retículo endoplasmático (ER) (Jameel et al., 1996) (Figura 4), el cual es requerido para la expresión en la superficie celular vía ER (Zafrullah et al., 1999).

La proteína de cápside se divide en 3 dominios, dominio *shell* (cáscara), dominio medio y dominio *protruding* (prominente), conteniendo éste último, un dominio putativo de unión a receptor, cumpliendo un rol importante con respecto a la determinación de la antigenicidad y en la neutralización viral (Guu et al., 2009; Yamashita et al., 2009).

Asimismo, los monómeros de cápside se auto-ensamblan para formar decámeros, consistiendo en 180 copias organizadas para formar un icosaedro (Xing et al., 2010). La proteína madura se observó que necesita procesamiento proteolítico para remover los primeros 111 aa y los últimos 52 aa (Li et al., 1997; 2005a). A partir de análisis genéticos del ORF2, se reveló que presenta más de 85% de homología entre los genotipos de HEV, encontrándose la mayor divergencia en los primeros 111 aa (Mori and Matsuura, 2011).

Recientemente, se identificaron epítopes neutralizantes conformacionales y lineales en la proteína de la cápside, evidenciando que la cápside es el principal blanco para la neutralización de HEV (Gu et al., 2015; Tang et al., 2015). Por lo tanto, se generó una vacuna de subunidades recombinante con la proteína de cápside truncada para el genotipo 1 de HEV, comercializada en China bajo el nombre de Hecolin® (Nan y Zhang, 2016).



**Figura 4. Ilustración de los dominios de la proteína de la cápside codificada por el ORF2.**

Los números entre paréntesis y sobre el cuadro indican el residuo aminoacídico. Se observan el péptido señal, los sitios de clivaje y los 3 sitios de unión de glicanos. S: Dominio Shell (cáscara), M: Dominio Medio, P: Dominio Protruding (prominente). Extraído de Nan y Zhang., 2016.

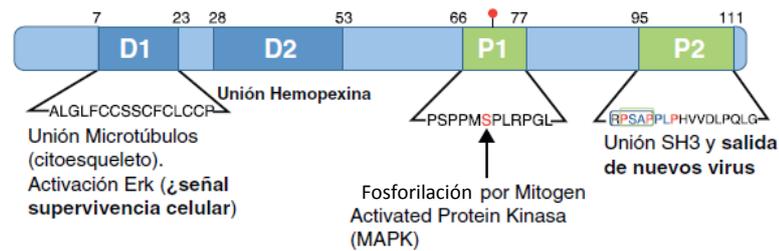
### 1.2.3.3. ORF3

Es el ORF más pequeño y se solapa al ORF2 por 300 nt en un diferente marco de lectura (Graff et al., 2006), codifica para la fosfoproteína multifuncional VP13 de 113-114 aa con un peso molecular de 13 KDa (Huang et al., 2007). VP13 contiene 2 dominios hidrofóbicos en su mitad N-terminal (D1 y D2) y 2 dominios ricos en prolina en su porción C-terminal (P1 y P2) (Figura 5) (Kannan et al., 2009; Holla et al., 2013). El dominio D1 se localiza en el citoesqueleto (Zafrullah et al., 1997) y se une a una proteína-quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Kar-Roy et al., 2004), activando la quinasa regulada extracelularmente (ERK), produciendo una posible señal de supervivencia celular y proliferación celular prolongada (Rodríguez-Frías et al., 2012). El dominio D2 interactúa con hemopexina, proteína de fase aguda, la cual se ha registrado que desciende a nivel plasmático en pacientes infectados con HEV (Taneja et al., 2009; Rodríguez-Frías et al., 2012). Por lo tanto, se infirió que ORF3 inhibe la respuesta innata del hospedero atenuando la respuesta inflamatoria de fase aguda, observándose además, un aumento en la secreción de  $\alpha$ 1-microglobulina con capacidad inmunosupresora, posiblemente protegiendo a las células infectadas con HEV (Chandra et al., 2008). Precisamente, en un proyecto realizado recientemente en la Sección Virología, mediante una transfección estable a través de un vector de expresión conteniendo la región ORF3 en células A549 (células de adenocarcinoma pulmonar humano), se observó que la expresión de la proteína codificada por ORF3 protege a las células del proceso de apoptosis (García, Tesina de Grado 2016).

La región P1 contiene el residuo de serina (Ser71) fosforilado, conservado entre todas las cepas de HEV. Mientras que la región P2, contiene un motivo que se une a varias proteínas que contienen dominios SRC de homología 3 (SH3) (Korkaya et al., 2001), estos dominios comúnmente participan en vías de señalización involucradas en el crecimiento celular, diferenciación y otras funciones regulatorias (Zarrinpar et al., 2003). Paralelamente, también se ha demostrado que VP13 es capaz de inhibir la vía de apoptosis de mitocondrias, por medio de sobre-expresión de los genes de canales aniónicos voltaje-dependiente (Moin et al., 2007).

En otro estudio, se reportó que VP13 inhibe la traslocación nuclear del factor de transcripción STAT3 y sub-regula la expresión de los genes mediados por STAT3, como las proteínas de respuesta de fase aguda (Chandra et al., 2008). Por otro lado, VP13 no se requiere para la replicación *in vitro* (Emerson et al., 2006) pero sí para la infección *in vivo* y para la liberación del virión de las células infectadas (Graff et al., 2005; Huang et al., 2007; Yamada et al., 2009).

Actualmente, se identificó a la proteína de ORF3 como una viroporina clase I que funciona como un canal iónico, siendo esencial para la liberación de la partícula viral durante la infección (Ding et al., 2017). También, se observó una región putativa transmembrana, la cual puede estar involucrada en la localización de la proteína en el ER (Ding et al., 2017).



**Figura 5. Esquema de los dominios de la fosfoproteína reguladora multifuncional ORF3.** Se observan los dominios hidrofóbicos D1 y D2 y los dominios ricos en prolina P1 y P2, los números indican la posición aminoacídica. El punto rojo muestra la serina 71 que es fosforilada. Extraído de Rodríguez-Frías et al., 2012.

#### 1.2.3.4. ORF4

Recientemente, se identificó un ORF4 (2235-3308 nt) exclusivo del genotipo 1 de HEV. A diferencia de los otros ORFs, su traducción se encuentra impulsada por un elemento IRES (2701-2787 nt), su producto interactúa con múltiples proteínas virales para formar un complejo proteico compuesto por RdRp, helicasa y X (Nair et al., 2016).

#### 1.2.4. Ciclo replicativo de HEV.

HEV se multiplica en el hígado y alcanza el tracto digestivo a través de la bilis (Bouwknegt et al., 2009), no obstante, la replicación también puede ocurrir en el tejido del tracto gastrointestinal (Izopet et al., 2012), riñones (Geng et al., 2016), sistema nervioso central (Drave et al., 2016), placenta (Bose et al., 2014) y ganglios linfáticos (Kamar et al., 2014).

En cuanto a HEV en forma envuelto y desnudo, ambos presentan distintos mecanismos de entrada, sin embargo, no se cuenta con mucha información sobre el ingreso de HEV desnudo (Yin et al., 2016).

En primer lugar, ocurre la unión al receptor, la fijación de los viriones por medio de proteoglicanos de heparan sulfato a sus células blanco y se internaliza eHEV (partícula envuelta) por medio de endocitosis mediada por clatrina receptor dependiente y dinamina, dónde también participan las GTPasas proteínas-Ras-relacionadas RAB5A y RAB7A (Figura 6-paso 1) (Kalia et al., 2009; Kapur et al., 2012; Holla et al., 2015; Yin et al., 2016).

Luego del ingreso de eHEV, su cuasi envoltura es sometida a una degradación lipídica lisosomal para exponer la proteína de la cápside (Yin et al., 2016).

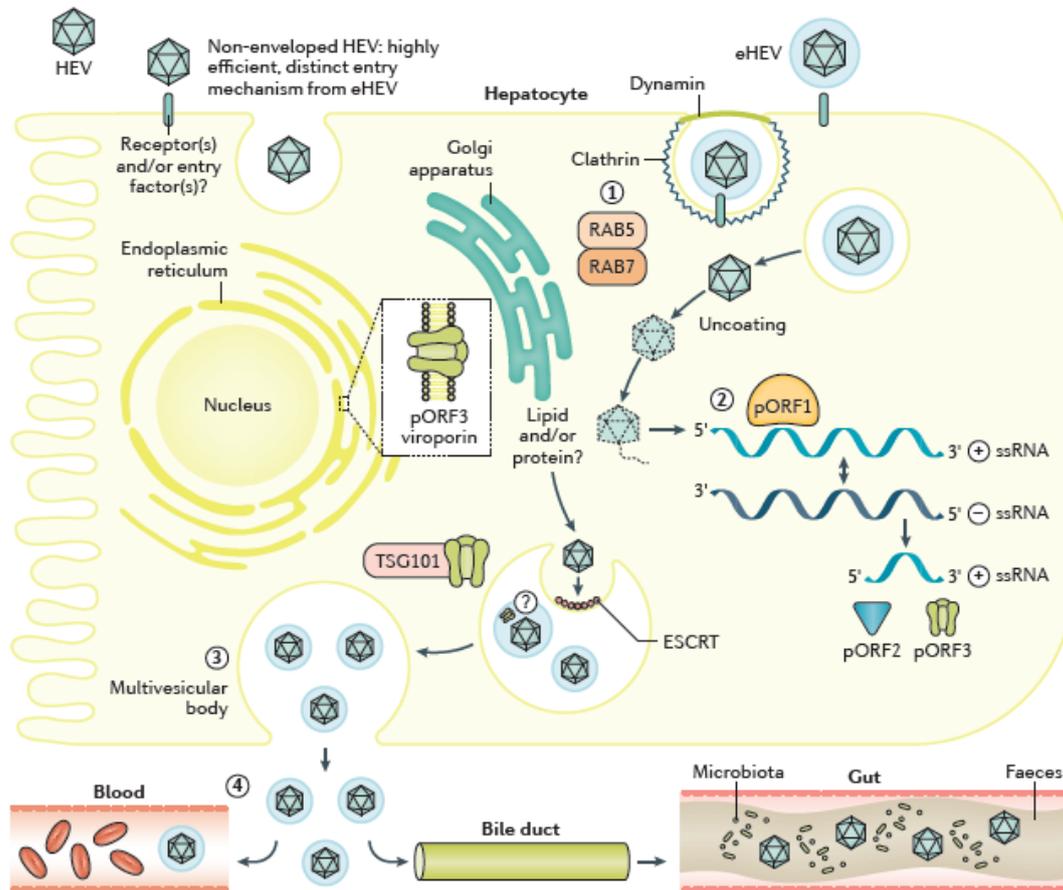
Posteriormente, el virión pierde todo el recubrimiento en un proceso escasamente comprendido, con el objetivo de liberar y traducir el ARN de sentido positivo por factores del hospedero para producir la poliproteína ORF1 que contiene la RdRp.

Subsiguientemente, la RdRp transcribe ARN viral completo complementario de sentido negativo, el cual es utilizado como molde para la transcripción de ARN sentido positivo a ser empacado en los viriones de la progenie y también es utilizado para la transcripción del fragmento subgenómico de 2,2 Kb codificante para el ORF2 y el ORF3 (Figura 6-paso 2) (Graff et al., 2006; Varma et al., 2011).

A continuación, los ribosomas del hospedero traducen ORF2 y ORF3 en el retículo endoplasmático (Mahilkar et al., 2016).

Inmediatamente, la fosfoproteína coficada en el ORF3 que exhibe una actividad de canal iónico, interacciona con una amplia variedad de genes del hospedero, entre ellas, con el gen 101 susceptible de tumores (TSG101), miembro del complejo de clasificación endosomal para el transporte (ESCRT) involucrado en la formación de cuerpos multivesiculares en el citoplasma donde HEV adquiere su envoltura lipídica intracelularmente del trans-Golgi para luego egresar de la membrana plasmática celular asociado a VP13 (Figura 6-paso 3) (Dalton et al., 2009; Yamada et al., 2009; Emerson et al., 2010; Nagashima et al., 2014a; 2014b; Holla et al., 2015; Kenney et al., 2015a; Qi et al., 2015; Surjit et al., 2016).

Finalmente, los eHEV liberados por la membrana apical, ingresan al ducto biliar, donde se ha sugerido que la envoltura lipídica es degradada (Figura 6-paso 4), explicando por qué HEV se encuentra en forma desnudo en la materia fecal. Mientras que, si eHEV es liberado por la membrana basal de los hepatocitos ingresa al suero en su forma cuasi-envuelta, encontrándose protegido de los anticuerpos neutralizantes (Takahashi et al., 2008; Chapuy-Regaud et al., 2017).



**Figura 6. Ciclo replicativo de eHEV.**

Se muestran los 4 pasos desde la unión e ingreso del virión, la replicación, su egreso de la célula que infecta, indicando las proteínas y moléculas involucradas y finalmente su distribución en el organismo del hospedador.

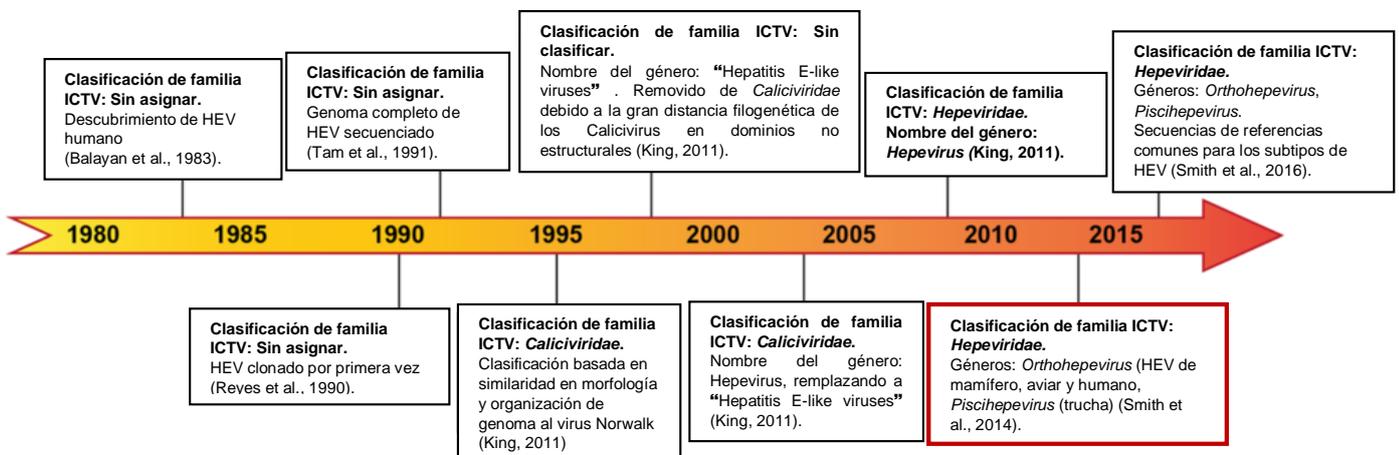
Extraído de Nimgaonkar et al., 2018.

### 1.3. Taxonomía de HEV y distribución geográfica de genotipos.

En 2014, se clasificó a HEV en la familia *Hepeviridae*, compuesto por 2 géneros, *Orthohepevirus* (incluye a cepas de mamíferos y aves) y *Piscihepevirus* (incluye solamente a HEV de trucha, CTV) (Smith et al., 2014) (Figura 7).

El género *Orthohepevirus* se subdivide en 4 especies de A-D. A su vez, dentro de *Orthohepevirus A* se reconocen 8 genotipos G 1-8 (Figura 8 y Figura 9), de los cuales los primeros 4 infectan a humanos (Smith et al., 2014). Los genotipos 1 (Aye et al., 1992; Tsarev et al., 1992; Bi et al., 1993) y 2 (Chatterjee et al., 1997) son antroponóticos, es decir, se encuentran limitados a hospederos humanos, mientras que los genotipos 3 (Kwo et al., 1997; Schlauder et al., 1998) y 4 (Takahashi et al., 2002; 2003) poseen múltiples hospederos como cerdos, jabalíes, ciervos, conejos, delfines y son zoonóticos por lo que pueden transmitirse a humanos (Smith et al., 2014). Conjuntamente, estos 4 genotipos capaces de infectar a humanos han sido clasificados en 24 subgenotipos, donde se destacan 5 subgenotipos HEV1 (1a-1e), 2 HEV2 (2a, 2b), 10 HEV3 (3a-3j) y 7 HEV4 (4a-4g) (Lu et al., 2006). Sin embargo, la clasificación en subgenotipos resulta ser controversial, debido a la información faltante y a la nomenclatura inadecuada de las cepas de referencia disponibles para varios subgenotipos (Oliveira et al., 2013; Smith et al., 2014).

En cambio, en los genotipos 5 y 6 se clasificaron cepas de jabalíes japonesas diferentes entre sí con una secuencia nucleotídica única, sin embargo, se desconoce si corresponden a cepas zoonóticas (Takahashi et al., 2011; 2014; Smith et al., 2014). Asimismo, se aislaron cepas de camellos en el Medio Oriente con una divergencia nucleotídica mayor al 20% de los otros genotipos, por lo cual se lo clasificó en el genotipo 7 (Smith et al., 2014; Woo et al., 2014). Recientemente, se identificó HEV de camélido en un paciente con trasplante de hígado, por lo que podría sugerir que es una cepa zoonótica (Lee et al., 2016).



**Figura 7. Línea de tiempo de la clasificación de *Hepeviridae*.**

Se exhibe la cambiante clasificación a lo largo del tiempo según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV).

Extraído y modificado de Kelly et al., 2016.

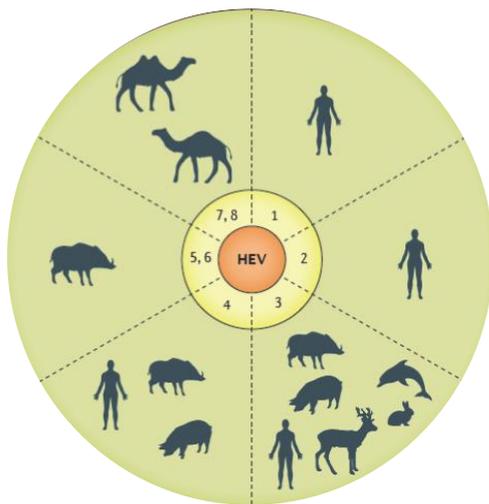
Por último, se obtuvieron cepas de HEV de camellos bactrianos chinos, exhibiendo cierta heterogeneidad genética de las cepas de los genotipos anteriores, por lo tanto, se lo clasificó en el genotipo 8 (Woo et al., 2016; Sridhar et al., 2017).

Con respecto a *Orthohepevirus B*, le fueron asignadas cepas de aves (AHEV) (Smith et al., 2014). Paralelamente, cepas de ratas (RHEV) y hurones se clasifican en *Orthohepevirus C*. Finalmente, en la especie *Orthohepevirus D* se encuentran cepas de murciélagos (Lorenzo et al., 2007; Johne et al., 2010a; Drexler et al., 2012; Raj et al., 2012; Krog et al., 2013; Lin et al., 2014; Smith et al., 2014; Woo et al., 2014).

En cuanto a la distribución geográfica (Figura 10), el genotipo 1 (HEV1) se encuentra frecuentemente distribuido en Asia (particularmente en India), África y Cuba, circulando también en América del Sur, como Venezuela (Gutiérrez et al., 2012) y Uruguay (Mirazo et al., 2014a). Paralelamente, se ha detectado HEV2 en África y México (Kamar et al., 2012a).

Ambos genotipos, HEV1 y HEV2 se han asociado con casos epidémicos y esporádicos para países desarrollados y autóctonos/endémicos para países en desarrollo (Purcell et al., 2008).

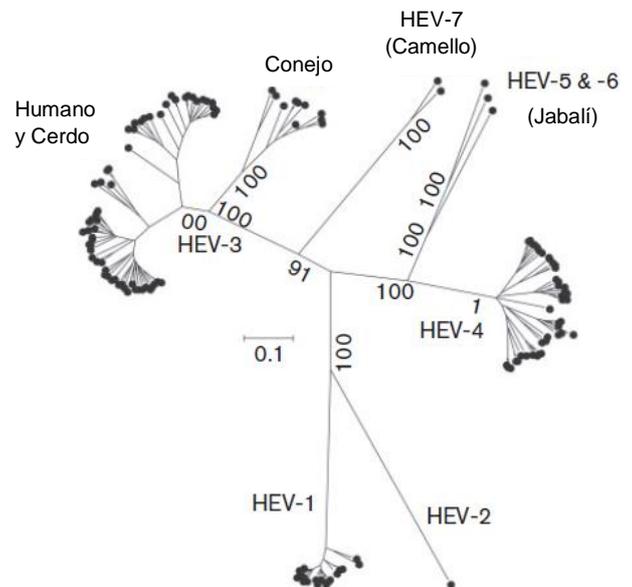
Por otro lado, HEV3 está distribuido mundialmente (Lu et al., 2006), detectándose también en Uruguay (Mirazo et al., 2011), asociándose a casos esporádicos y endémicos en países desarrollados (Purcell et al., 2008). HEV4 se ha reportado mayormente en el sudeste asiático, habiéndose detectado algunos casos autóctonos en Europa (Kamar et al., 2014), considerado responsable de casos esporádicos y HEV7 ha sido identificado en el Medio Oriente (Hakze van der Honing et al., 2011).



**Figura 8. Rango de hospedador de HEV.**

Se observa la distribución de hospedadores (círculo exterior) que infecta HEV para los 8 genotipos de la especie *Orthohepevirus A* (círculo interior).

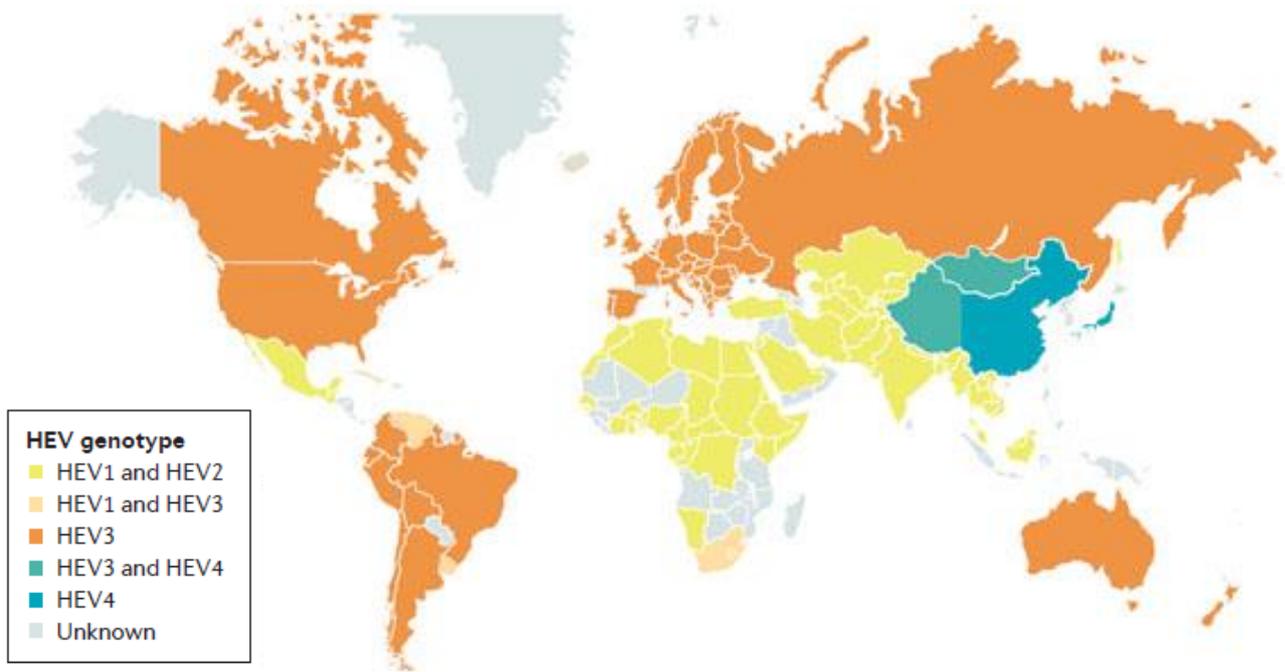
Extraído y modificado de Nimgaonkar et al., 2018.



**Figura 9. Árbol filogenético para los miembros de la especie *Orthohepevirus A*.**

Construido con el método de máxima verosimilitud, modelo GTR con distribución gamma y sitios invariantes, utilizando 137 regiones ORF1 y ORF2 concatenadas, excluyendo la HVR y la inserción específica de conejo.

Extraído y modificado de Smith et al., 2014.



**Figura 10. Distribución mundial de los genotipos de HEV.**

Se observa en el mapa la localización geográfica de los genotipos, particularmente en América del Sur, se encuentra principalmente HEV3 y HEV1/HEV3 en simultáneo para Uruguay y Venezuela.

Obtenido y adaptado de Kamar et al., 2017.

#### 1.4. Variabilidad genética.

Análisis filogenéticos y matrices de identidad con los genomas completos de los 4 genotipos llevados a cabo por Okamoto et al., 2007, revelaron que, HEV1 posee hasta 11,8 % de diversidad intra-genotipo, mientras que HEV3 y HEV4 muestran un amplio rango de divergencia intra-genotípica (0-19,3% y 0,1-17%, respectivamente).

En cuanto a HEV2, la variabilidad intra-genotipo entre el único genoma completo disponible (cepa mexicana) y 16 secuencias parciales africanas es de 12,13-16,8% (Okamoto et al., 2007).

Con respecto a la divergencia inter-genotipos, HEV7 presenta una heterogeneidad mayor al 20% entre los demás 6 genotipos (Smith et al., 2014; Woo et al., 2014).

A nivel aminoacídico, se observó una diferencia inter-genotípica para ORF2 de 6,5-11,7%, indicando una gran conservación aminoacídica para la proteína de cápside entre los genotipos, correspondiéndose con la baja diversidad antigénica, ya que existe un solo serotipo de HEV (Okamoto et al., 2007).

Además, en un estudio se reportó la identidad nucleotídica y aminoacídica comparativa entre HEV humano y RHEV para las distintas regiones del genoma (Batts et al., 2011).

Presentando una similitud nucleotídica del 60% y del 55% para las regiones no traducidas 5'NCR y 3'NCR, respectivamente; exhibiendo un 53%, 57% y 46% de identidad para las regiones codificantes ORF1, ORF2 y ORF3, respectivamente.

Paralelamente, se registró una identidad aminoacídica entre HEV y RHEV, del 49%, 55% y 29% para las regiones codificantes ORF1, ORF2 y ORF3, respectivamente, con varios motivos altamente conservados en genes virales claves. Por otro lado, se observó que secuencias de genoma completo de conejo presentaban menos del 80% de similitud nucleotídica con los demás genotipos del género *Orthohepevirus A* (Zhao et al., 2009).

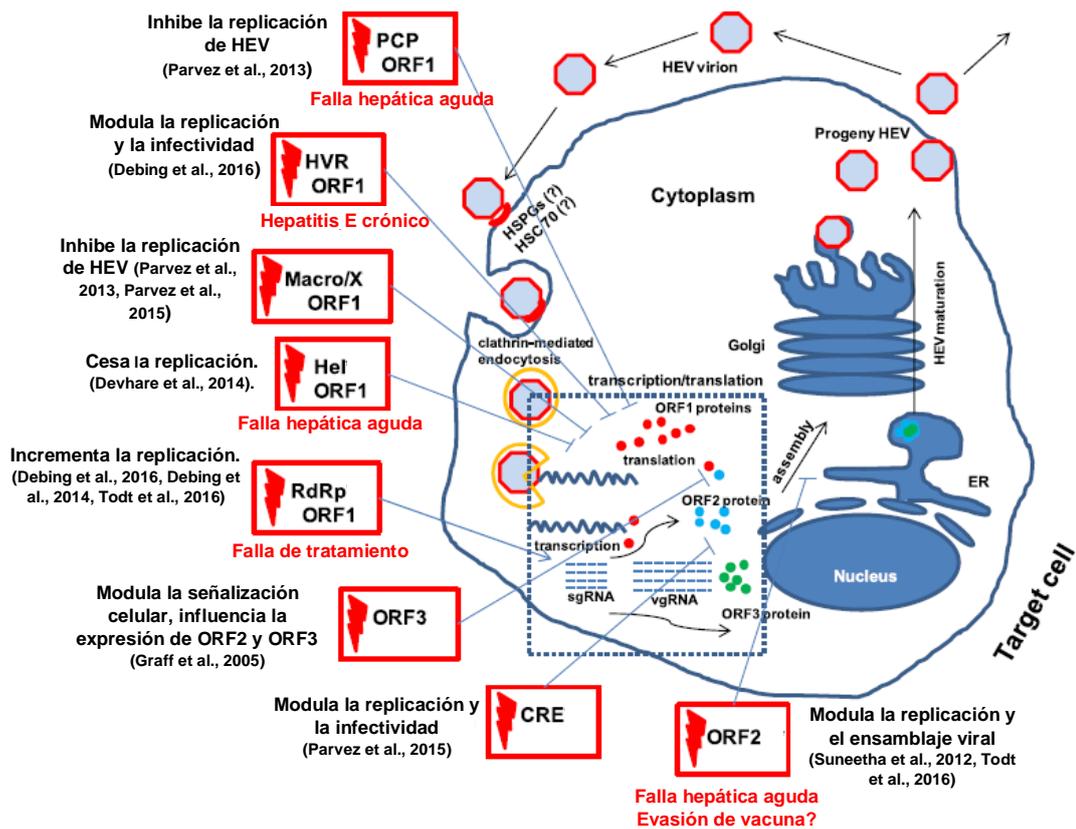
Asimismo, pueden ocurrir eventos de recombinación entre los 7 genotipos (Smith et al., 2014), habiéndose reportado recombinación en los dominios X y helicasa de ORF1 (Wang et al., 2010).

Notablemente, han sido observados inserciones y deleciones en la región hipervariable, incluyendo inserciones de genes humanos (Shukla et al., 2011), asociándose con un aumento en la replicación de HEV en células hepáticas (Shukla et al., 2011; Kenney y Meng, 2015b).

La tasa de mutación de HEV se estimó indirectamente de aislados clínicos, como  $1,5 \times 10^{-3}$  sustitución de base por sitio por año, siendo similar al del virus de la hepatitis C (Takahashi et al., 2004a). Frecuentemente, pueden ocurrir mutaciones a lo largo de todo el genoma durante la propagación y los pasajes sucesivos para su adaptación al cultivo celular (Lorenzo et al., 2008). Su alta variabilidad se debe a su proceso de transcripción como con otro virus ARN, al utilizar una RdRp viral que no posee corrección de lectura (Proof-reading). Por otra parte, la presión selectiva impuesta por las drogas antivirales y la respuesta inmune del hospedador podrían contribuir adicionalmente a aumentar la tasa de variabilidad (Lhomme et al., 2014).

Las inserciones/deleciones, recombinaciones y sustituciones en el genoma de HEV, pueden influir en su replicación y en la interacción de virus-hospedador y ser subsecuentemente asociado a patogénesis.

Bajo la presión inmune, las mutaciones silenciosas y no-sinónimas clínicamente relevantes, pueden relacionarse a formas severas de la enfermedad y a una potencial resistencia antiviral. Precisamente, se observó que la ineficacia en el tratamiento con Ribavirina está asociado a ciertas mutaciones en el dominio de RdRp, modificando el *fitness* replicativo de HEV (Figura 11) (Debing et al., 2014; Debing et al., 2016; Todt et al., 2016).



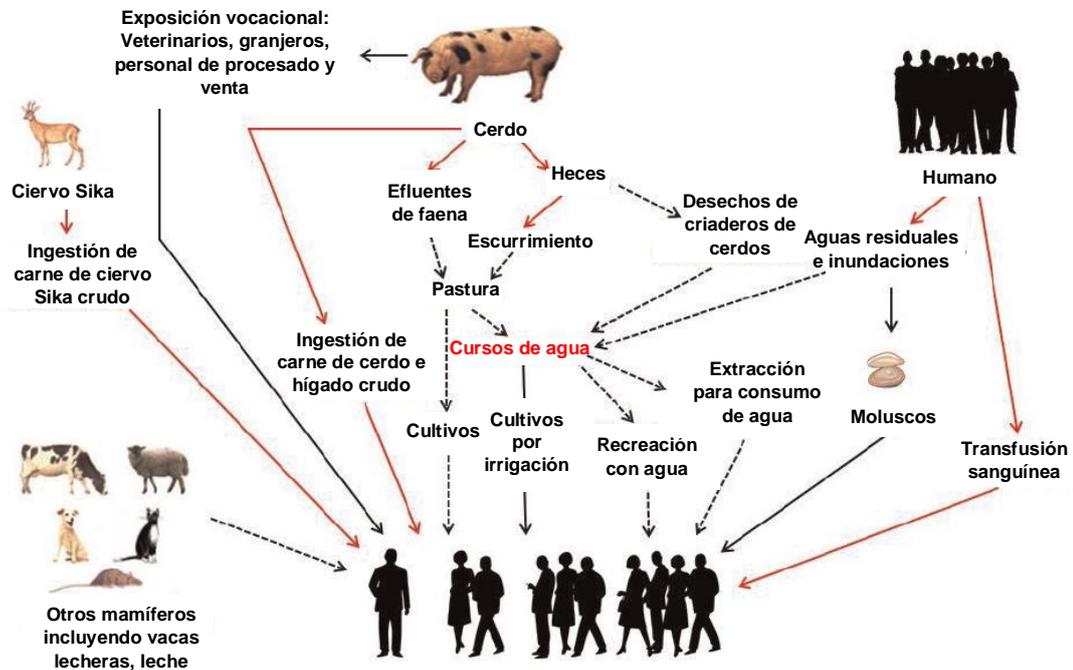
**Figura 11. Efectos de mutaciones en el ciclo replicativo de HEV y su implicancia clínica.** Los cuadros rojos indican el dominio y región del genoma mutado en la maquinaria transcripcional/traduccional (cuadro azul punteado). Los posibles efectos de la mutación se indican al costado de los cuadros rojos y su potencial resultado clínico se muestra por debajo del cuadro. Extraído y adaptado de Tong et al., 2016.

### 1.5. Transmisión de HEV.

Se reconocen cuatro principales rutas de transmisión asociadas a los distintos genotipos de HEV, presentando una distribución geográfica característica según los contextos endémicos o no-endémicos: transmisión por fuente de agua contaminada vía fecal-oral, transmisión zoonótica a través de alimentos o por exposición a fluidos corporales de animales infectados, vía parenteral y vertical (Figura 12). Sin embargo, aunque permanece en debate, también se ha reportado evidencia de una ruta adicional, por transmisión persona a persona.

Algunas de estas rutas son aún tema de controversia, siendo la vía más común por medio del consumo de agua contaminada en países en desarrollo (Kemar et al., 1997; Khuroo et al., 2016). Durante muchos años, se consideró que la hepatitis E era un problema para la salud pública sólo en países en vías de desarrollo. Sin embargo, actualmente debido a su potencial zoonótico es frecuentemente reconocida en países industrializados donde no se creía endémico previamente (Kwo et al., 1997; Erker et

al., 1999; Schlauder et al., 1999; Worm et al., 2000; Kabrane-Lazizi et al., 2001; Mizuo et al., 2002; Sadler et al., 2006).



**Figura 12. HEV zoonótico, rutas y fuentes de infección.**

Las líneas rojas son rutas comprobadas de infección, las líneas negras son probables vías de infección y las líneas negras punteadas son posibles rutas. El cerdo es considerado el reservorio principal y está comúnmente infectado asintómicamente con HEV a nivel mundial. Extraído y adaptado de Mclean et al., 2017.

### 1.5.1. Transmisión fecal-oral.

En regiones altamente endémicas, los brotes epidémicos se asocian a infecciones con los genotipos HEV1 y HEV2, asociados a fuentes de agua contaminada para consumo, usualmente posterior a una inundación o fuertes lluvias, favoreciendo las condiciones de contaminación del agua (Viswanathan et al., 1957; Khuroo et al., 1980). También, se han reportado varios brotes durante el verano, debido a la reducción en el caudal de agua en ríos, provocando un aumento en la concentración de contaminantes fecales (Naik et al., 1992). Asimismo, en África han ocurrido varios casos en campos de refugiados con recursos limitados de higiene (Teshale et al., 2010a; Thompson et al., 2012).

En el sudeste asiático, se ha demostrado que las epidemias recurrentes corresponden

a deposiciones de heces humanas en cursos de ríos y la utilización del agua del mismo río sin tratar para consumir, cocinar e higiene personal (Corwin et al., 1999).

Además, se han reportado brotes de hepatitis E en áreas urbanas sub-desarrolladas, debido a goteras en las cañerías de agua que atraviesan el suelo contaminado con aguas residuales, ya que el suministro intermitente de agua conduce a que se produzca presión negativa en la cañería durante períodos sin flujo, permitiendo la succión de estos contaminantes (Sailaja et al., 2009).

En países en desarrollo como en países industrializados, se demostró que las aguas residuales sin tratamiento contienen partículas infecciosas de HEV, que resultan estar cercanamente relacionadas a cepas humanas (HEV1 y HEV2) y de otros animales (HEV3 y HEV4) (Jothikumar et al., 1993; Pina et al., 2000; Clemente-Casares et al., 2003; Vaidya et al., 2003; Ipagunta et al., 2007).

Precisamente, en los Países Bajos se detectó HEV3 en agua de río originada posiblemente del saneamiento (Rutjes et al., 2009).

Ciertamente, efluentes de criaderos de animales, particularmente cerdos, han estado asociado a infecciones humanas, habiéndose detectado HEV3 en aguas residuales (Borges et al., 2004; Rutjes et al., 2009), ya que notablemente, el ARN de HEV es también detectable en la orina de porcinos infectados, planteando una ruta de exposición adicional para los humanos (Kasorndorkbua et al., 2005) .

Las prácticas de riego e irrigación permiten que HEV y otros virus hepáticos y entéricos impacten en cursos de agua (Tyrrel et al., 2003; Ziemer et al., 2010).

El curso temporal de estas infecciones varían de brotes unimodales que duran unas pocas semanas, a epidemias múltiples que duran alrededor de un año, caracterizadas por la continua contaminación del agua y probablemente por la transmisión persona-persona (Viswanathan et al., 1957; Naik et al., 1992).

### **1.5.2. Transmisión zoonótica.**

En regiones no-endémicas, donde no se han reportado brotes, los casos identificados corresponden a hepatitis viral aguda, asociados hasta ahora la infección con HEV3 y HEV4 a través del consumo de alimentos. Especialmente, por consumo de carne de cerdo, chacinados, productos porcinos como hígado de cerdo, salchichas, vísceras, jamón, ya sea en estado crudo o insuficientemente cocido (Mansuy et al., 2011, Servant-Delmas et al., 2016). Ciertamente, en un estudio realizado en Francia en embutidos hechos con hígado de cerdo, se identificó una relación genética entre secuencias de HEV obtenidas de los productos derivados de hígado y secuencias virales recuperadas de pacientes que los habían ingerido, proporcionando firme evidencia de que la infección de HEV humano está asociada al consumo de algunos tipos de salchicha (Colson et al., 2010).

Estudios han planteado que los profesionales y trabajadores en estrecho contacto con porcinos o agua de saneamiento se encuentran más expuestos a la infección por HEV (El-Esnawy et al., 2000; Bouwknecht et al., 2008a; Galianan et al., 2008; Rutjes et al., 2009) siendo más frecuentemente seropositivos para HEV en comparación a la población general (Colson et al., 2007; Perez-García et al., 2007; Renou et al., 2007; Lange et al., 2017), ya que el contacto directo con fluidos de animales puede ser una ruta de transmisión al haberse detectado HEV en hisopados rectales y nasales (Meng et al., 1998).

Con respecto a RHEV, el potencial zoonótico de ratas no es claro hasta el momento (Li and Wakita, 2018).

Por otro lado, se ha reportado la infección por consumo de moluscos bivalvos como mejillones, ostras, que son consumidos crudos o escasamente cocidos (Crossan et al., 2012), habiéndose observado además que HEV es estable en condiciones ambientales tanto alcalinas como ácidas y en congelados por hasta más de 10 años (Emerson et al., 2005; Namsai et al., 2011). Precisamente, se describió un brote de HEV por consumo de moluscos a bordo de un crucero europeo (Said et al., 2009; Crossan et al., 2012; Díez-Valcarce et al., 2012). Conjuntamente, se realizó un relevamiento en moluscos en varios países de Europa (Said et al., 2009; Crossan et al., 2012; Díez-Valcarce et al., 2012), Korea y Japón, detectándose cepas de HEV, identificadas como HEV3 suino para el caso de Korea y Japón (Li et al., 2007; Song et al., 2010; Kamar et al., 2012a). Igualmente, un screening realizado en vegetales verdes y frutillas derivó en la detección de cepas de HEV3, posiblemente debido a la exposición al agua contaminada por irrigación de los cultivos (Brassard et al., 2012; Maunula et al., 2013; Kokkinos et al., 2017).

Asimismo, se informó sobre un caso de infección por HEV de camélido en un paciente con trasplante de hígado que ingería regularmente carne de camello y su leche (Lee et al., 2016), planteando una posible nueva ruta de transmisión zoonótica. A su vez, se identificó una alta prevalencia de infección activa en vacas, demostrándose la excreción de HEV genotipo 4 por leche vacuna (Huang et al., 2016). Paralelamente, otra fuente de infección constituye el consumo de carne de ciervo (Tei et al., 2003) y jabalí crudo o no suficientemente cocido (Matsuda et al., 2003).

Cabe destacar, que se detectaron cepas circulantes en Francia de HEV de conejo destinados al consumo, las cuales se encontraban cercanas desde el punto de vista filogenético a cepas aisladas de pacientes, por lo que se puede inferir que HEV de conejo tiene gran potencial zoonótico (Izopet et al., 2012; Abravanel et al., 2017).

Las infecciones transmitidas por alimento pueden ser prevenidas por medio de una preparación cuidadosa, ya que HEV es resistente en carne cocinada a baja temperatura (~56°C) (Feagins et al., 2008a), por lo que es necesaria una cocción de aproximadamente 20 minutos a alta temperatura (~70°C) para inactivar HEV (Barnaud et al., 2012).

### **1.5.3. Transmisión parenteral.**

Aunque se trata de una vía no demasiado frecuente, infecciones por HEV asociadas a la transfusión sanguínea han sido documentadas, pertenecientes a HEV3 en Europa (Hewitt et al., 2014), HEV1 y HEV4 en China (Zhang et al., 2017), HEV1 en India (Khuroo et al., 2004, Arankalle et al., 2000) y HEV3-HEV4 en Japón (Satake et al., 2017).

Solo una minoría de los receptores de productos sanguíneos infectados desarrolla hepatitis E sintomática, la mayoría de las transmisiones iatrogénicas permanecen asintomáticas, excepto para el caso de los pacientes inmunocomprometidos, donde existe el riesgo considerable de desarrollo de hepatitis E crónica (Hewitt et al., 2014). Es por estas razones, que la transmisión iatrogénica se considera desatendida, ya que en general carecen de síntomas y desarrollan solo unas menores anomalías en los

niveles de enzimas hepáticas, que puede ocurrir meses luego de la infección (Satake et al., 2017).

No obstante, cabe resaltar la alta tasa de donantes de sangre virémicos HEV ARN positivos detectada en muchos países, desde un rango de 1 cada 611 donantes para los Países Bajos (Shrestha et al., 2016), hasta 1 cada 14.799 para Australia (Zaaijer et al., 2015).

Paralelamente, en un estudio se llevó a cabo un relevamiento de HEV ARN en los pools de plasma utilizados para manufacturar productos medicinales (por ejemplo albumina, factores de coagulación, inmunoglobulinas, etc) en Norteamérica, Europa, el Medio Oriente y Asia, detectándose la presencia de HEV en todas las regiones excepto para el Medio Oriente, observándose una mayor frecuencia de positivos en Asia (Baylis et al., 2016).

Asimismo, se reportaron brotes de una transmisión nosocomial de HEV en pacientes hospitalizados y entre trabajadores de la salud (Robson et al., 1992; Siddiqui et al., 2005).

Por otro lado, también se confirmó la transmisión por trasplante de hígado (Schlosser et al., 2012) y trasplantes de injertos renales (Pourbaix et al., 2017).

#### **1.5.4. Transmisión vertical.**

Se encuentra reportado en países endémicos como India la transmisión de HEV1 y HEV2 de la madre al feto durante el embarazo, observándose una alta morbilidad y mortalidad perinatal (Khuroo et al., 1995; Khuroo et al., 2009). Asimismo, en India se analizaron muestras de sangre de cordón umbilical para IgM anti-HEV y HEV ARN, identificándose transmisión en el 33% de los casos (Kumar et al., 2004). Con respecto a las mujeres embarazadas con HEV, se ha demostrado que los casos de muerte fetal intrauterina, parto prematuro y mortalidad perinatal son mayores (Khuroo et al., 1981; Mirghani et al., 1992).

Además, se detectaron ARN de HEV y anticuerpos anti-HEV en el calostro de madres infectadas, sin embargo, se cree que amamantar no provocaría transmisión al infante, ya que el título viral en el calostro es demasiado bajo como para causar una infección (Chibber et al., 2004).

#### **1.5.5. Transmisión persona-persona.**

El rol de la transmisión persona a persona permanece controversial hasta el momento (Aggarwal et al., 1994; Mast et al., 1994; Skidmore et al., 1999; Nicand et al., 2005).

Algunos estudios han propuesto que a diferencia de otras infecciones transmitidas entéricamente, la transmisión de HEV persona a persona, ya sea en casos epidémicos unimodales o esporádicos, es infrecuente y poco común (Aggarwal et al., 1992; Somani et al., 2003).

Particularmente, en brotes ocurridos en un campo de refugiados al norte de Uganda, la aparición de varios casos en una misma familia, sugirió que podía deberse a la transmisión persona a persona. Esta hipótesis se vio reforzada ya que no se halló ARN viral en los pozos utilizados para el consumo de agua, ni en cerdos analizados de la

zona, descartando la transmisión zoonótica, siendo además un brote de varios meses de duración (Teshale et al., 2010b).

Sin embargo, si bien la razón exacta no es conocida, otros estudios descartaron dicha teoría y sugirieron que este caso también podría ser explicado por la alta tasa de ataque (proporción entre el número de personas afectadas y el número total de personas residentes en el área) resultando de los altos niveles de contaminación ambiental (Aggarwal, 2010; Nishiura, 2010).

Incluso en situaciones con múltiples casos de infección en una sola familia, el intervalo de tiempo entre casos es corto, insinuando una infección primaria compartida proveniente posiblemente de agua contaminada, en lugar de persona-persona (Aggarwal et al., 1992).

Ciertamente, algunas investigaciones han demostrado que la transmisión por esta vía es posible (Krawczynski et al., 2000, Vрати et al., 1992), en México se reportó una alta tasa de ataque secundario entre miembros de una familia (Velazquez et al., 1990) y en Francia se demostró la transmisión intrafamiliar de HEV3 (Ducancelle et al., 2007).

## **1.6. Epidemiología.**

Estudios serológicos y moleculares demostraron que HEV se encuentra distribuido mundialmente y es la principal causa de hepatitis viral transmitida entéricamente. Anualmente, grandes epidemias son atribuidas a HEV en áreas endémicas, mientras que en los países desarrollados se han incrementado los reportes de casos esporádicos (Pérez-García et al., 2013).

La Organización Mundial de la Salud estima que hay unas 20 millones de infecciones de HEV a nivel mundial, dando lugar a aproximadamente 3,3 millones de casos sintomáticos (Rein et al., 2005) y 56.600 muertes vinculadas a HEV (Lozano et al., 2012). No obstante, este estimado se basa en información de 9 de las 21 áreas de Carga Global de Enfermedades (GBD), por lo que la verdadera GBD sería superior (Hughes et al., 2010).

La mayoría de estas infecciones son por HEV1 y HEV2, afectando a los individuos en los países en desarrollo (Hughes et al., 2010).

Las tasas de letalidad para las epidemias se encuentran en el rango de 0,2%-4% (Hughes et al., 2010). Sin embargo, las tasas de mortalidad son considerablemente más altas en mujeres embarazadas llegando hasta el 20% en países endémicos con HEV1 y HEV2 (Khuroo et al., 1981). En la Tabla 1 se resumen los aspectos epidemiológicos y clínicos principales para los cuatro genotipos.

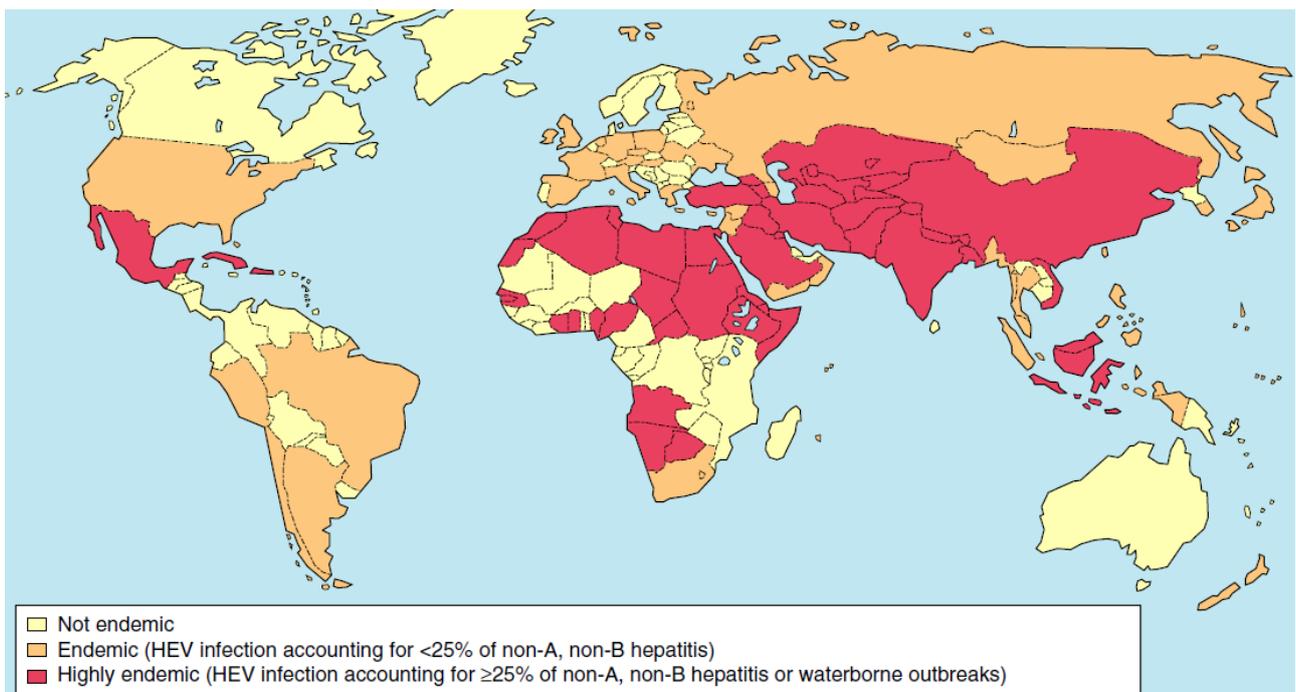
### **1.6.1. HEV en las regiones en desarrollo.**

En estas regiones las epidemias ocurren frecuentemente, usualmente separadas por algunos años. HEV es hiperendémico en países en desarrollo como India, Bangladesh, Egipto y China, con una tasa de prevalencia del 25% de todos los casos de hepatitis agudas no-A no-B o brotes por agua contaminada (Teo et al., 2009). En el caso de México, su usual calificación en la literatura como hiperendémico permanece controversial, debido a que no se han registrado brotes de HEV en las últimas dos

décadas (Fierro et al., 2016).

Por otro lado, HEV es considerado endémico cuando es agente etiológico de más del 25% de todos los casos de hepatitis virales no-A no-B reportadas, comprendiendo la mayoría de Europa occidental, Estados Unidos, Nueva Zelanda, varios países en Sudamérica, la mayoría de Asia y el Medio Oriente (Zuckerman, 2003; Teo et al., 2009; Teo, 2010) (Figura 13).

En países en desarrollo, el rango de seroprevalencia se encuentra entre 4,6% (Balayan et al., 1994) y 50% (Arankalle et al., 1995; Aggarwal et al., 1997; Gambel et al., 1998; Das et al., 2000; Vivek et al., 2010) donde las infecciones sintomáticas son más comunes para individuos de entre 15 y 40 años, mientras que los casos asintomáticos o anictéricos son más frecuentes en niños (Krush et al., 2013).



**Figura 13.** Endemismo mundial para la infección por hepatitis E. Extraído de Donnelly et al., 2010

Se realizó un análisis de modelado basado en estudios epidemiológicos, proyectando tasas de incidencia anuales de 0,5%-1,0% para las edades de 0 a 15 años, 1,0%-1,4% para 15 a 20 años y un descenso de 0,2% para mayores de 30 años (Rein et al., 2005). Estos patrones de seroprevalencia coinciden con reportes sobre el genotipo 1 en regiones endémicas, en las cuales los anticuerpos de HEV comienzan a incrementarse en la adolescencia y alcanzan el pico entre las segunda y tercera década de la vida (Krush et al., 2013). Precisamente, la prevalencia de anticuerpos IgG anti-HEV tiende a aumentar con la edad, especialmente en los hombres (Arankalle et al 2001; Fukuda et al., 2007, Takahashi et al., 2004b, Li et al., 2006, Wong et al., 2004). Asimismo, esta seroprevalencia difiere entre áreas urbanas y rurales, siendo la tasa de positivos mayor en estas últimas (Tucker et al., 1996; Echevarría et al, 2014; Alvarado-Esquivel et al., 2015).

Los brotes de hepatitis E han sido característicamente asociados a una alta tasa de ataque y mortalidad entre las mujeres embarazadas, registrándose en India un porcentaje significativamente mayor de infección para gestantes en comparación a la población general (Khuroo et al., 1981).

Notablemente, la presencia de anticuerpos para HEV no protege de una futura reinfección (Servant-Delmas et al., 2016).

Además, los humanos y animales excretan una considerable carga viral durante las primeras etapas de la fase aguda de la infección por HEV, posiblemente contribuyendo a mantener este ciclo endémico (Teo et al., 2010).

### **1.6.2. HEV en regiones desarrolladas.**

Si bien los grandes brotes de hepatitis E están limitados a regiones en desarrollo, en los países industrializados se ha registrado un aumento drástico en el número de casos autóctonos, donde las cepas predominantes son HEV3 y HEV4, siendo por lo tanto principalmente transmitido zoonóticamente, por transfusión sanguínea y trasplante de órganos (Li et al., 2005b; Colson et al., 2010; Lewis et al., 2010; Miyamura et al., 2011). Se estima que HEV presenta un 6% de seroprevalencia en Estados Unidos, mientras que en Francia el rango de seroprevalencia en donantes de sangre varía entre 21,9% a 71,3% dependiendo del área geográfica (Ditah et al., 2014; Clemente-Casares et al., 2016). Justamente, en Francia ocurren 545 hospitalizaciones y 18 muertes por año debido a la infección por HEV, considerándose posiblemente, hiperendémica la zona del suroeste recientemente (Van Cauteren et al., 2017). En el Reino Unido, Luxemburgo, Holanda y Alemania entre un 10%-30% de individuos presentan evidencia serológica de previa exposición a HEV (Kamar et al., 2012a).

Por lo tanto, actualmente muchos países desarrollados son considerados ahora endémicos (Dalton et al., 2016a).

Asimismo, se ha detectado HEV en Japón, Corea, China, Rusia, Australia, Italia y España, entre otros (WHO, 2010).

Sin embargo, la incidencia de HEV en general se cree subestimada, ya que no se testea rutinariamente para HEV en presencia de síntomas de hepatitis aguda (Avellon et al., 2015; Murrison et al., 2017).

### **1.6.3. Grupos de Riesgo.**

Como se mencionó anteriormente, el consumo de agua no tratada, de carne o moluscos crudos o insuficientemente cocidos y la exposición directa a animales como cerdos, jabalíes y ciervos, son considerados factores de riesgo para la infección por HEV.

Las mujeres embarazadas son consideradas un importante grupo de riesgo, debido al aumento en la severidad de la enfermedad para las infectadas con HEV.

Por otro lado, la subpoblación inmunocomprometida con un bajo conteo de linfocitos T CD4 está asociado a un mayor riesgo de infección por HEV, principalmente por la posibilidad de desarrollar una infección crónica (Kenfak-Foguena et al., 2011; Pineda et

al., 2014), reportándose en Europa una seroprevalencia de HEV para pacientes con HIV de entre 1%-26% (Renou et al., 2010; Kaba al., 2011; Kenfak-Foguena et al., 2011; Jardi et al., 2012; Rapicetta et al., 2013; Pineda et al., 2014; Riviero-Barcelona et al., 2014; Scotto et al., 2014; Bradley-Stewart et al., 2015). Además, los individuos con cirrosis presentan una seroprevalencia de anti-IgG del 23% (Kamar et al., 2008; Jardi et al., 2012; Pineda et al., 2014).

Asimismo, los pacientes con trasplante de órganos que usualmente se encuentran inmunocomprometidos, poseen un riesgo elevado de desarrollar cronicidad para HEV (Jardi et al., 2012). También, los pacientes con enfermedades hepáticas preexistente (posiblemente por otros virus hepatotrópicos) pueden presentar una mayor prevalencia que la población general (Lopez-Fabal y Gomez-Garces, 2015).

**Tabla 1.** Características epidemiológicas y clínicas para los 4 genotipos de HEV.

Parámetro	HEV1- HEV2	HEV3 – HEV4
Distribución geográfica	Regiones en desarrollo	Regiones desarrolladas
Reservorios	Humanos	Animales (suinos principalmente)
Transmisión	<ul style="list-style-type: none"> <li>✱ Agua contaminada con heces</li> <li>✱ Iatrogénico</li> <li>✱ Vertical</li> <li>✱ Persona-Persona</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✱ Zoonótico</li> <li>✱ Iatrogénico</li> </ul>
Patrones epidemiológicos	Grandes o pequeñas epidemias y casos esporádicos	Sólo casos esporádicos
Grupo etario	Hombres jóvenes más comúnmente	Usualmente mayores
Manifestaciones hepáticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>✱ Asintomático</li> <li>✱ Hepatitis aguda auto-limitada</li> <li>✱ Falla hepática fulminante para embarazadas (HEV1) o con enfermedad hepática crónica pre existente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✱ Asintomático</li> <li>✱ Hepatitis aguda auto-limitada</li> <li>✱ Hepatitis crónica reportada en pacientes trasplantados recibiendo drogas inmunosupresoras</li> </ul>
Manifestaciones Extrahepáticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>✱ Neurológicas</li> <li>✱ Renales</li> <li>✱ Pancreatitis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✱ Neurológicas</li> <li>✱ Renales</li> <li>✱ Pancreatitis</li> <li>✱ Hematológicas</li> </ul>

#### 1.6.4. Situación epidemiológica en Latino América.

En América del Sur, HEV ha sido detectado en Brasil (Parana et al., 1997; Vitral et al., 2014), Chile (Ibarra et al., 1994; Brahm et al., 1996; Ibarra et al., 1997), Argentina (Rey et al., 1997; Schlauder et al., 2000; Munne et al., 2006; Martínez et al., 2014), Bolivia (León et al., 1999), Venezuela (Pujol et al., 1994; García et al., 2012), Perú (Hyams et al., 1996) y Uruguay (Mirazo et al., 2011) (Tabla 2).

Existe una gran variabilidad genética para HEV en América del Sur y el Caribe, donde las cepas pertenecientes a Uruguay, Argentina y Brazil, aunque con baja homología entre sí, están más relacionadas a cepas de países industrializados, mientras que aislados de HEV del Caribe y México presentan una mayor similitud a cepas de origen africano y asiático (Panduro et al., 2011; Mirazo et al., 2013).

Particularmente, en el caso de Uruguay se detectó por primera vez en 2011 la presencia de cepas de HEV pertenecientes al genotipo 3, correspondientes a casos esporádicos de infección aguda, analizadas mediante métodos moleculares y serológicos (Mirazo et al., 2011).

Por medio de análisis de secuencia exhaustivos, se identificó la co-circulación de los subtipos 3h (nunca antes reportado en Sudamérica) y 3i (identificándose este último también en Argentina), y se observó que estas cepas se encontraban filogenéticamente más relacionadas a cepas Europeas, particularmente, de origen alemán (cepas suinas) y francés (cepas humanas) (Mirazo et al., 2013). Por lo tanto, se infirió que la adquisición de la infección se pudo haber dado por el consumo de chacinados o carne porcina insuficientemente cocida de origen Europeo (Mirazo et al., 2013).

Posteriormente en 2014, se identificó un caso de una cepa autóctona asociado al genotipo 1 (Mirazo et al., 2014b).

Recientemente, se realizó un relevamiento en reservorios animales (cerdos y jabalíes) en Uruguay por los métodos de ELISA y PCR. Para el caso de los criaderos suinos de San José, Montevideo y Canelones analizados, se obtuvo una tasa de seropositivos total de 46,8% y se detectó un 16,6% de ARN viral en los hígados de cerdo faenados.

Por otro lado, 22,1% de los jabalíes presentaron anticuerpos anti-HEV. Los análisis filogenéticos entre estas cepas de cerdo y los aislados humanos Uruguayos revelaron una alta identidad nucleotídica, lo cual sugiere un gran riesgo zoonótico de transmisión de suinos a humanos en el país (Mirazo et al., 2018).

**Tabla 2.** Genotipos de HEV reportados en América Latina.  
Extraído y adaptado de Fierro et al., 2016.

Genotype	Region	Species <sup>1</sup>			Detection method/input specimen <sup>2</sup>	
		Humans	Swine	Other <sup>3</sup>	RT-PCR	Serum
Genotype 1	Uruguay	X			X	X
	Venezuela	X			X	
	Cuba	X				X
	Mexico	X			X	X
Genotype 2	Mexico	X	X		X	X
Genotype 3	Argentina	X	X	X	X	X
	Brazil	X	X	X	X	X
	Bolivia	X				X
	Cuba	X			X	
	Venezuela	X			X	
	México		X	X	X	
	Uruguay	X	X		X	X
	Chile	X			X	X
	Costa Rica		X		X	

<sup>1</sup> Según información recogida en PubMed, se indica la infección independiente de la condición del hospedero (con o sin síntomas clínicos). <sup>2</sup> Metodologías usadas: RT-PCR fue utilizada para detectar el ARN genómico de HEV y ELISA para detectar los anticuerpos anti-HEV en suero. <sup>3</sup> Aves, ciervos, roedores y otros mamíferos.

## 1.7. Patogénesis.

### 1.7.1. Presentación clínica en humanos.

El curso y las manifestaciones clínicas de HEV son altamente variables y actualmente se encuentran parcialmente conocidos (WHO, 2010; Wedemeyer et al., 2013; Ahmed et al., 2015) (Figura 14). Se ha reportado que los factores virales (genotipo y dosis del inóculo) y los factores del hospedero (presencia de enfermedad hepática previa, embarazo y distintos polimorfismos genéticos) determinan el curso de la infección (Wedemeyer et al., 2013).

En la mayoría de los casos, HEV causa una infección auto-limitada (Ie Coutre et al., 2009), presentando un espectro desde ausencia total de síntomas a enfermedad subclínica y en un 15%-25%, falla hepática fulminante (FHF), en los casos de embarazadas infectadas con el genotipo 1 (Naidu et al., 1957). Asimismo, puede causar una hepatitis crónica con un rápido progreso a cirrosis, especialmente en pacientes trasplantados, sometidos a tratamiento de quimioterapia o inmunocomprometidos

(Kamar et al., 2014), estos casos se asocian mayormente al genotipo 3 (Panda et al., 2007; Gérolami et al., 2008).

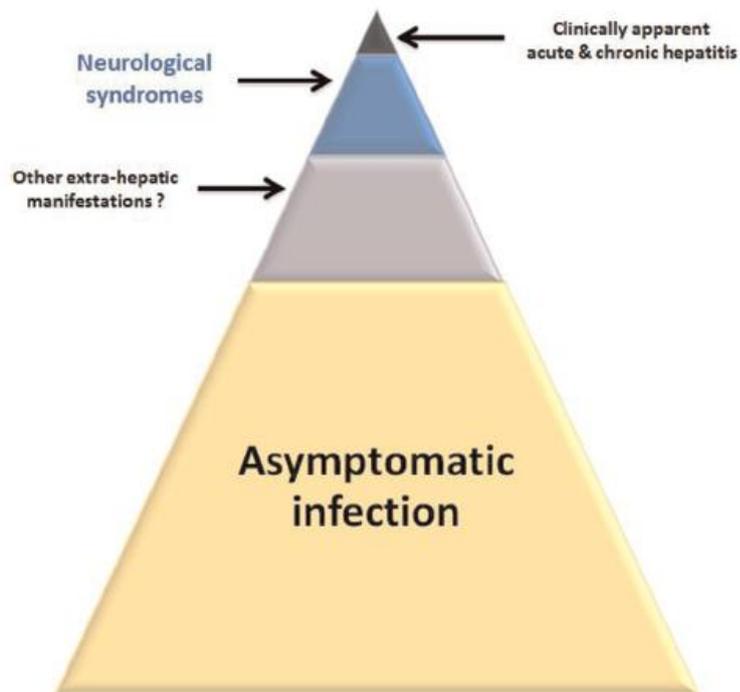
Luego del período de incubación de 2-6 semanas, se pueden observar para los casos sintomáticos, los síntomas propios de una hepatitis y síntomas no-específicos, como fiebre, náuseas, dolor abdominal, vómitos, anorexia, hepatomegalia (Kamar et al., 2014; Ahmed et al., 2015), mialgias, artralgias, orina oscura, heces claras (Sayed et al., 2015) y niveles aumentados de transaminasas hepáticas (Hoofnagle et al., 2012; Wedemeyer et al., 2012). Además, en los países en desarrollo se ha observado ictericia en un 40% de los casos y en un 75% para los países desarrollados (Kamar et al., 2014).

Con respecto a las mujeres embarazadas, la mayoría de la información clínica ha sido obtenida de Asia (particularmente India) y África. Hasta el momento, se han reportado 15 casos en países industrializados y 2 casos autóctonos en Europa (Lachish et al., 2015).

Inicialmente, los síntomas no difieren entre una mujer embarazada y no embarazada, sin embargo, en un corto período de tiempo, estas manifestaciones clínicas pueden progresar a una falla hepática aguda y como consecuencia, producen una coagulación intravascular diseminada, encefalopatía y edema cerebral en un 70% de los casos (Khuroo et al., 2003). El coma hepático es la complicación más común, llegando al 100% de mortalidad (Kaskheli et al., 2015). Dependiendo de la severidad de los síntomas y la carga viral, puede ocurrir la mortalidad fetal o materna, especialmente en el tercer trimestre, pudiendo observarse parto prematuro, bajo peso al nacer, mortinato o la muerte del recién nacido en un 25% al 56% de los casos (Chaundhry et al., 2015; Sayed et al., 2015).

La explicación de estos casos fatales se debe a que durante el embarazo, el sistema inmune es alterado para proteger al feto de ataques proviniendo del sistema inmune propio de la madre, aunque estos cambios también afectan la forma en que el sistema inmune responde a los agentes infecciosos (Pal et al., 2005, Jilani et al., 2007; Patra et al., 2007; Prusty et al., 2007, Bose et al., 2011; Prabhu et al., 2011; Salam et al., 2013; Arya et al., 2014, Kumar et al., 2014; Ramdasi et al., 2014; Sehgal et al., 2015; Bhatmagar et al., 2016; Kmush et al., 2016). Precisamente, uno de los principales cambios es el descenso de CD4 e incremento de CD8, por lo tanto, una disminución en la relación CD4/CD8, debido a una variación significativa en los niveles hormonales (aumento de progesterona, estrógeno y gonadotropina coriónica humana) (Navaneethan et al., 2008). Se ha demostrado que el aumento de estas hormonas posee un fuerte efecto supresivo en la inmunidad celular e intervienen en la apoptosis linfocítica vía el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual participa en el desarrollo hepático y regeneración (Prusty et al., 2005). En las mujeres con FHF, se ha observado una completa supresión del componente principal de NF- $\kappa$ B, manifestándose como apoptosis hepática. Además, estas hormonas esteroideas juegan un rol importante en la replicación viral, aumentando la predisposición a la infección viral (Jilani et al., 2007; Kar et al., 2008).

Paralelamente, se han reportado varias manifestaciones clínicas extra-hepáticas. Entre ellas, neurológicas (síndrome de Guillain-Barré, amiotrofia neurálgica, encefalitis y mielitis (Geurtsvankessel et al., 2013; Van den berg et al., 2014; Dalton et al., 2016b; Fukae et al., 2016; Stevens et al., 2017) y renales (glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa) (Kamar et al., 2012b; Taton et al., 2013; Guinault et al., 2016).



**Figura 14. Representación esquemática del HEV3 en países desarrollados.**

La mayoría de los casos causa una infección asintomática, solo una minoría produce hepatitis clínica aparente. Las zonas azul y gris representan pacientes sintomáticos pero actualmente sin ser reconocidos, esto incluye a los pacientes con distintos síndromes neurológicos asociados a HEV. Extraído de Brendan et al., 2017.

### 1.7.2. Infección de HEV en animales.

Las infecciones naturales y experimentales en suinos resultan en un curso de infección subclínico, con solamente lesiones microscópicas medias en el hígado y nodos linfáticos asociados (Meng et al., 1997a; Halbur et al., 2001). La viremia dura 1-2 semanas y durante 3-7 semanas ocurre la expulsión de HEV en materia fecal (Meng et al., 1997a; Halbur et al., 2001; Meng et al., 2011). La infección por HEV en cerdos es dependiente de la edad, para los 18 meses de edad se pueden encontrar hasta un 86% de cerdos infectados (Leblanc et al., 2007). La transmisión entre cerdos ocurre por la vía fecal-oral, en contacto directo con otros animales y su excreta y por agua contaminada (Kasorndorkbua et al., 2004; Albinana-Gimenez et al., 2006; Bouwknecht et al., 2008b; Feagins et al., 2008b., Meng et al., 2011).

Por otro lado, HEV de ratas se ha propuesto que posee una prevalencia mundial (Kamar et al., 2010b; Purcell et al., 2011; Mulyanto et al., 2014), donde las ratas adquieren el virus a una edad temprana y la infección generalmente prosigue sin síntomas visibles (Purcell et al., 2011).

HEV aviar presenta un distinto curso de infección, con un alto nivel de infección subclínica y con tasas de mortalidad de 0,3-1,0% (Huang et al., 2002; Sun et al., 2004; Peralta et al., 2009). Los signos clínicos pueden incluir una gran disminución en la producción de huevos hasta el 20%, aumento de tamaño del hígado y bazo y muerte aguda de las aves afectadas (Meng et al., 2008).

## 1.8. Diagnóstico.

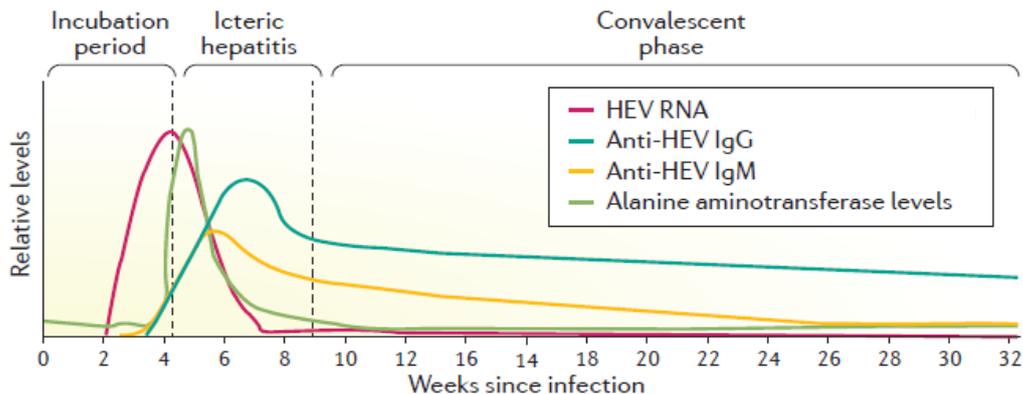
La infección por HEV puede ser diagnosticada indirectamente, detectando anticuerpos anti-HEV en el suero o directamente, detectando el ARN viral en las heces, sangre u otros fluidos corporales (Aggarwal et al., 2000; Aggarwal et al., 2013; Kamar et al., 2014) El ARN viral es detectable en sangre y materia fecal durante el período de incubación, persistiendo por 4 y 6 semanas, respectivamente.

Se puede detectar una corta respuesta de IgM a las 2-6 semanas, cerca del momento donde las enzimas hepáticas incrementan su nivel (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa) y persiste de 6 a 9 meses, mientras que la tardía respuesta de IgG puede perdurar durante varios años (Huang et al., 2010; Kamar et al., 2017).

Actualmente, existen tests comerciales para la detección indirecta de HEV, mayormente utilizando el enzimoimmunoensayo indirecto para detectar anticuerpos contra la proteína de la cápside viral (ORF2) y ocasionalmente contra el ORF3, para detectar ya sea la respuesta IgM, indicando una infección aguda, o IgG, implicando una infección pasada (Aggarwal et al., 2013).

Sin embargo, esta técnica es considerada sub-óptima, ya que demuestra alta variabilidad inter-ensayo (Aggarwal et al., 2016).

Por otro lado, la detección molecular del ARN viral es considerada la metodología *gold-standard*, amplificando regiones en el genoma conservadas entre los genotipos, permitiendo, a su vez, genotipificar al secuenciar distintas regiones genómicas (Abravanel et al., 2012; Abravanel et al., 2013).



**Figura 15. Curso de infección de HEV.**

Etapas de detección del ARN viral y de los anticuerpos IgM, IgG durante la infección de hepatitis E.

Extraído y adaptado de Kamar et al., 2017.

### 1.9. Modelos de cultivo celular.

Históricamente, HEV ha sido extremadamente difícil de aislar *in vitro*, obstaculizando profundizar el estudio de su ciclo de replicación al no existir un sistema eficiente de cultivo celular (Nimgaonkar et al., 2018).

HEV fue aislado por primera vez en células 2BS (línea finita de pulmón embrionario humano) (Huang et al., 1992a; b), no obstante, luego se realizaron intentos de propagar el virus en otras líneas más adecuadas y más sencillas de cultivar (Huang et al., 1992a; b).

Subsiguientemente, se reportaron otras líneas celulares como A549 (adenocarcinoma pulmonar humano), PLC/PRF/5 (hepatocarcinoma humano) y HepG2 (hepatocarcinoma humano) en donde se obtuvo el aislamiento, incluyendo a su vez hepatocitos primarios de primates no-humanos (chimpancés, macacos cynomolgus, tamarinos y mono verde africano) (Kane et al., 1984; Arankalle et al., 1988; Huang et al., 1992; 1995; 1999; Kazachkov et al., 1992; Tsarev et al., 1994; Li et al., 1996; Meng et al., 1996; 1997b; Tam et al., 1996a; b; 1997; Wei et al., 2000).

Posteriormente, en un estudio se analizaron 21 líneas continuas potenciales para propagar HEV, incluyendo las 3 mencionadas anteriormente, sin embargo, sólo fue posible aislarlo en A549 y PLC/PRF/5 (Tanaka et al., 2007).

Precisamente, otro estudio demostró que varias cepas de los genotipos 1, 3 o 4 de muestras de suero pudieron infectar y replicar HEV en A549 (Okamoto, 2013).

Paralelamente, estudios iniciales no lograron aislar RHEV en líneas celulares derivadas de ratas, sin embargo, si fue posible propagar RHEV en líneas de hepatoma humano (HepG2, HuH-7, PLC/PRF/5) (Jirintai et al. 2014). Asimismo, la susceptibilidad de las ratas a genotipos de HEV humanos permanece controversial, un estudio no registró la infección de cepas humanas en ratas por medio de una inyección intravenosa (Li et al., 2013a).

A pesar de estos avances, actualmente no existe un único sistema eficiente ni de sencilla implementación y reproducibilidad para el aislamiento de HEV.

**Tabla 3.** Modelos *in vitro* para estudiar HEV *Orthohepevirus A*.  
Extraído de Nimgaonkar et al., 2018.

Type	Cell line	Tissue	Species	HEV genotype	Strains tested
Immortalized	LLC-PK1	Kidney epithelial	Swine	3	Kernow-C1/p6
	FRhK-4	Kidney epithelial	Rhesus macaque	1	Sar55
	HepG2, HepG2/C3A	Liver hepatoma	Human	3	Kernow-C1/p6
	HepaRG	Liver hepatoma	Human	3	Kernow-C1/p6
	PLC/PRF/5	Liver hepatoma	Human	3,4	JE03-1760F, HE-JF5/15F
	Huh7, Huh7.5, S10-3*	Liver hepatoma	Human	1,3	Sar55, Kernow-C1/p6
	A549	Lung adenocarcinoma	Human	3,4	JE03-1760F, HE-JF5/15F
	Caco-2	Colon adenocarcinoma	Human	1	Sar55
Primary cells	Primary tissue	Liver	Hepatocyte-like	1	Hepatocyte-like
	iPSC-derived hepatocyte-like cells	Hepatocyte-like	Human	3	Kernow-C1/p6
	Porcine embryonic stem cells	Embryonic	Porcine	3	Swine HEV genotype 3f

iPSC: Células madre pluripotentes inducidas. \*S10-3 es un sub-clon de Huh7 seleccionado por su habilidad para producir la cepa infecciosa Sar55.

## 2. Hipótesis de trabajo.

El impacto producido por enfermedades emergentes constituye un problema de creciente preocupación desde el punto de vista sanitario y clínico. Indudablemente, este es el caso de HEV, ya que desde hace algunos años la Sección Virología ha detectado y reportado en varias publicaciones científicas, los primeros casos autóctonos de infección por el virus en humanos, siendo principalmente asociados a HEV3, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el mundo. Por otro lado, también se halló evidencia de un caso perteneciente al HEV1, asociado a casos esporádicos nunca antes identificados en el Cono Sur. Paralelamente, mediante análisis moleculares se comprobó que dichas cepas están filogenéticamente emparentadas con aislados suinos europeos, sugiriendo un origen zoonótico de la infección, la cual es, además de la vía fecal-oral, una de las principales vías de transmisión. Asimismo, se detectaron cepas en cerdos nacionales, el principal reservorio para HEV, sugiriendo que la transmisión zoonótica a partir de reservorios animales mamíferos juega un rol preponderante en la diseminación del HEV en las regiones no endémicas como América del Sur.

Particularmente, la escasa información disponible referente a aspectos de biología viral de HEV junto con el creciente número de casos clínicos reportados en nuestro país, hace necesario profundizar en el estudio de este virus emergente.

Son extremadamente escasos los antecedentes de análisis proteómicos y transcriptómicos con HEV a nivel mundial, por lo que se trata de un estudio pionero para Uruguay y América Latina sobre un virus que se encuentra creciendo en incidencia e importancia tanto en países desarrollados como en países en desarrollo no endémicos. Hasta el momento, el entendimiento de la biología viral de HEV es muy limitado y las opciones terapéuticas son pocas, esto se debe parcialmente a la falta de modelos animales robustos y convenientes (Debing et al., 2016). Al presente no se han reportado estudios que evalúen la capacidad de HEV humano de infectar cultivos primarios de hepatocitos de ratas, por lo que el siguiente proyecto plantea analizar dicha posibilidad. Actualmente, no existe un sistema sencillo de aislamiento viral para HEV *in vitro*, lo cual es esencial para el mejor entendimiento de la biología del virus, incluyendo la interacción entre el mismo y las células hospedero.

A nivel mundial, solamente existen dos estudios sobre proteómica, ambos en suinos (Lee et al., 2011), uno de ellos para HEV4 de muestra fecal porcina (Shen et al., 2014), por lo que este proyecto resulta ser pionero para HEV3 en muestras de suero humanas. Además, cabe destacar que sólo se han reportado dos análisis transcriptómicos para HEV en cultivos celulares, el primero involucrando la transfección de un clon de genoma completo HEV1 en células Huh-7 (Jagya et al., 2014) y el segundo consistiendo en la transfección de un vector recombinante con ORF3 porcino en células HepG2 (Xu et al., 2016a). Por lo tanto este proyecto también resulta ser novedoso al realizarse por primera vez en un cultivo celular infectado con HEV3 humano.

Es notable la falta de información respecto al ciclo viral, por lo cual el presente proyecto propone brindar herramientas para ayudar a comprender los cambios en los genes y las proteínas celulares para los cultivos infectados con HEV en comparación con células control y así eventualmente elucidar mecanismos moleculares asociados con la alteración de la función debido a la replicación viral.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

El presente trabajo pretende realizar una primera aproximación a análisis transcriptómicos y proteómicos de la respuesta celular frente a la infección por HEV, analizando los cambios moleculares inducidos por la replicación viral en células A549 y evaluar la posibilidad de aislar HEV en líneas celulares específicamente hepáticas.

#### 3.2. Objetivos específicos.

✿ **Aislamiento de HEV *in vitro*.**

Aislar HEV *in vitro* en una línea celular continua hepática HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) y en A549 (células epiteliales de adenocarcinoma pulmonar humano) a partir de sueros de pacientes infectados con HEV. Asimismo, se evaluará la posibilidad de aislar HEV en cultivo primario de hepatocitos de rata neonata.

✿ **Optimización de metodologías bioquímicas y moleculares.**

Optimizar e implementar las metodologías para llevar a cabo los protocolos de proteómica y transcriptómica para el estudio del impacto de la replicación viral sobre la expresión génica de la línea celular infectada.

✿ **Análisis transcriptómicos.**

Efectuar análisis de transcriptómica con el fin de determinar de forma cuali-cuantitativa los genes diferencialmente expresados en las células A549 infectadas con el virus.

✿ **Análisis proteómicos.**

Realizar estudios proteómicos comparativos para analizar la expresión diferencial de las proteínas en las células A549 infectadas y sin infectar.

## 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL - MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. Aislamiento viral.

#### 4.1.1 Células A549.

Las células A549 (Células adenocarcinómicas humanas de epitelio basal alveolar ATCC® CCL-185™) se propagaron en medio de crecimiento DMEM/F-12 GlutaMAX™, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Invitrogen, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Life Technologies), 100 µg/ml de estreptomina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies), 2,5 µg/ml de anfotericina B (Gibco, Invitrogen, Life Technologies) 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies) y 3,0 g/L de caldo sulfato de triptosa estéril (TPB, Sigma Aldrich, Merck) en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

El aislamiento de HEV fue llevado a cabo según el protocolo detallado por Zhang et al., 2011 con modificaciones. A partir de tres sueros humanos S1, FA3 (S2) y HEUY8 (S3) infectados con HEV pertenecientes al HEV3 (Mirazo et al., 2011), se prepararon los inóculos virales. En primer lugar, se diluyeron al medio los sueros en DMEM/F-12 (sin SFB) /PBS-BSA 0,2% (buffer fosfato salino-seroalbúmina bovina) y se filtraron a través de un microfiltro estéril de 0,22 µm de tamaño de poro (Millex-GV; Millipore). Se incluyó además el suero S2 en una dilución al quinto (S4).

Posteriormente, en una placa de 24 *wells*, las monocapas de células con una confluencia de 60-70% se lavaron repetidamente con PBS 1X y se procedió a la infección viral por duplicado con un volumen de 100 µl (500 µl para S4), incubándose por 3 horas a 37°C, incluyéndose dos controles de células sin infectar.

Subsiguientemente a la incubación, el inóculo fue retirado, lavándose la monocapa celular con PBS 1X y luego se agregó medio de mantenimiento (DMEM/F-12, 5% de SFB, 100 µg/ml de estreptomina, 100 unidades/ml de penicilina, 2,5 µg/ml de anfotericina B, 2 mM de glutamina y 3,0 g/L de caldo sulfato de triptosa estéril).

A continuación, cada 72 horas las monocapas celulares se lavaron repetidamente con PBS 1X, se tripsinizaron en 0,25% de tripsina (PAN-Biotech) y las células fueron replicadas con una dilución al cuarto en medio de crecimiento fresco (conteniendo 10% de SFB).

Las células infectadas fueron sometidas a pasajes seriados mientras se mantuvieron viables, examinándolas periódicamente en microscopio óptico invertido.

#### 4.1.1.1. Reinfeción de HEV.

Consecutivamente al aislamiento viral, se evaluó la reinfeción de HEV a las 48, 72 y 96 horas post infección, utilizando como inóculo el pasaje celular que presentó mayor número de copias de ARN (se detalla más adelante), el cual fue congelado y descongelado en nitrógeno líquido repetidamente. Por lo tanto, se infectó con el inóculo viral del pasaje celular seleccionado diluido al cuarto en medio DMEM/F-12 0% FSB con un volumen final de 250 µl (por duplicado para cada condición e incluyendo controles de células) en una placa de 12 wells con una confluencia de 60-70%, previamente lavada con PBS 1X.

La infección fue incubada por 1 hora a 37°C, luego se retiró el inóculo, lavándose la monocapa y agregándose medio de mantenimiento.

Finalmente, las células fueron cosechadas a las 48, 72 y 96 horas, respectivamente.

#### 4.1.2. Células HepG2.

Las células HepG2 (Células humanas de carcinoma hepatocelular ATCC® HB-8065™) fueron propagadas en medio de crecimiento DMEM High Glucose (Invitrogen, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Life Technologies), 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma-Aldrich), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies), 2.5 µg/ml de anfotericina B (Gibco, Invitrogen, Life Technologies) y 2mM de glutamina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies) en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

Para realizar el aislamiento de HEV, primeramente se preparó el inóculo viral, consistiendo en una dilución al medio en medio DMEM libre de SFB del último pasaje de aislamiento obtenido por A549 del suero S2 (congelado y descongelado en nitrógeno líquido) seleccionado en un volumen final de 500 µl, el mismo fue utilizado para infectar botellas de cultivo F25 con una confluencia de monocapa de 60-70%, las cuáles fueron previamente lavadas con PBS 1X y se incluyeron además controles de células.

Una vez incubado por 1:30 horas a 37 °C, el inóculo viral fue retirado, lavándose la monocapa celular con PBS 1X y se agregó medio de mantenimiento (DMEM High Glucose, 5% de SFB, 100 µg/ml de estreptomycin, 100 unidades/ml de penicilina, 2,5 µg/ml de anfotericina B y 2 mM de glutamina).

Las células fueron posteriormente replicadas cada 72 horas, lavándose repetidamente con PBS 1X, se tripsinizaron en 0.25% de tripsina (PAN-Biotech) y las células fueron replicadas con una dilución al cuarto en medio de crecimiento fresco (conteniendo 10% de SFB) durante 10 pasajes seriados, controlando su evolución bajo el microscopio óptico invertido.

#### 4.1.2.1. Reinfeción de HEV.

Se analizó la reinfeción viral a las 48, 72 y 96 horas post infección con el pasaje seleccionado de HepG2 en las mismas condiciones que las descritas para A549.

### 4.1.3. Obtención de cultivo primario de hepatocitos de rata.

Primeramente, se preparó el medio de cultivo de hepatocitos, conteniendo DMEM/F-12 GlutaMAX™, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Invitrogen, Life Technologies), suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen®, Life Technologies), 100 µg/ml de estreptomina (Gibco, Invitrogen®, Life Technologies), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco, Invitrogen®, Life Technologies), 2,5 µg/ml de anfotericina B (Gibco, Invitrogen®, Life Technologies) 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen®, Life Technologies) y 10 mg/ml de insulina (Sigma-Aldrich).

Los cadáveres frescos de ratas neonatas (*Rattus rattus*) fueron cedidos por el departamento de Fisiología de Facultad de Medicina, UdelaR.

Inmediatamente, los animales fueron transportados a la Sección Virología, Facultad de Ciencias manteniéndose en frío hasta su procesado.

A continuación, se procedió a la disección y extracción de los hígados con instrumental quirúrgico estéril, separando el tejido conjuntivo. Se llevó a cabo la optimización del procedimiento, para lo cual, se realizó un pool de los hígados disgregándolos mecánicamente y enzimáticamente con bisturí y mortero en placa de Petri con una solución de 0,25% de tripsina (PAN-Biotech), luego, la suspensión fue centrifugada durante 10 minutos a 2000 RPM, recuperándose el sobrenadante, el cual se plaqueó sobre una placa de 6 wells en medio de cultivo de hepatocitos y se incubaron a 37 °C en un ambiente humidificado con 5% CO<sub>2</sub>.

El pellet resultante de la centrifugación fue resuspendido en solución de tripsina 0,25% nuevamente y se sometió a agitación por 1 hora a 100 RPM a 37 °C, una vez disgregado se plaqueó sobre una placa de 6 wells como se describe anteriormente.

El medio de hepatocitos fue sustituido por primera vez a las 96 horas post plaqueo, cambiándose sucesivamente cada 4 días y fueron replicadas por primera vez a los 11 días.

#### 4.1.3.1. Tinción Ácido Periódico-Schiff (PAS).

Con el objetivo de confirmar la presencia de hepatocitos diferenciados, se realizó la tinción PAS para identificar la producción de glucógeno. El fundamento de esta tinción consiste en que los carbohidratos que contienen grupos hidroxilos adyacentes (1, 2-glycol), encontrados en el glucógeno, son oxidados por el ácido periódico para producir grupos aldehídos adyacentes. Por lo tanto, estos grupos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff produciendo en consecuencia una coloración magenta en las áreas que poseen estos carbohidratos.

Según las especificaciones de Leyca, Microsystems con modificaciones, a los 8 días post plaqueo, la monocapa de hepatocitos fue lavada con PBS 1X y se fijaron las células

con una solución de formaldehído-PBS 4% por 20 minutos, luego de ese período se retiró la solución de fijación y las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X. Posteriormente, a temperatura ambiente se le agregó a la placa la solución de ácido periódico 0.5% (volumen necesario para cubrirla) dejándola reposar por 5 minutos, se lavó repetidamente con agua miliQ, inmediatamente, se colocó el reactivo de Schiff (Droguería Industrial Uruguay, Emilio Benzo S.A.) incubándose por 15 minutos y se lavó nuevamente con agua miliQ por 10 minutos. Subsiguientemente, se deshidrató mediante dos cambios de etanol 95% y etanol absoluto, incubándose 2 minutos cada uno. Por último, se removió el etanol y se observó en microscopio óptico invertido.

#### 4.1.3.2. Aislamiento viral en hepatocitos.

A los 11 días post plaqueo se realizó la primera infección de HEV, se utilizó 100 µl del pasaje de A549 de FA3 (previamente congelado y descongelado en nitrógeno líquido) que presentó mayor número de copias de ARN en 300 µl de medio de hepatocitos 0% FSB como inóculo viral, se incubó por 1:30 horas a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>, lavándose con PBS posteriormente y se le agregó medio de hepatocitos con 5% SFB, a los 7 días post infección se cosecharon las células.

Además, a los 11 días post plaqueo, se realizó el primer pasaje celular y se llevó a cabo la segunda infección en las células replicadas en las mismas condiciones descritas, realizándose un pasaje post infección a los 3 días, permitiéndoles crecer por 3 días más, cosechando finalmente las células. Incluyéndose controles de células.

#### 4.2. Análisis de *Mycoplasma sp.* en cultivos celulares.

Los *Mycoplasmas* son bacterias carentes de pared celular que pertenecen a la clase *Mollicutes*, los mismos pueden permanecer en los cultivos celulares por largos períodos de tiempo sin evidencia de afectar visiblemente al cultivo. Sin embargo, los *Mycoplasmas* pueden causar alteraciones extensas al cultivo (Drexler y Uphoff, 2000). La frecuencia de contaminación es alrededor del 10-30%. Los *Mycoplasmas sp.* infectivos están limitados a unas pocas especies dentro del género *Mycoplasma* y *Acholeplasma*, siendo los humanos, suinos y bovinos sus hospederos naturales.

Por lo tanto, se deben establecer métodos de detección de alta sensibilidad y especificidad como el ensayo de PCR con primers específicos que amplifican una región conservada del ARN ribosomal 16s de *Mycoplasmas* (Drexler y Uphoff, 2004) (Tabla 4). Se analizaron las células A549 y HepG2 según el protocolo de Drexler y Uphoff, 2004 con modificaciones. Las células y los sobrenadantes cosechados, correspondiéndose a 1 ml, fueron centrifugados 5 minutos a 2000 RPM, lavándose el pellet obtenido con PBS 1X y re-centrifugándose, (el procedimiento fue repetido 3 veces), el pellet fue finalmente resuspendido en 50 µl de PBS 1X. Posteriormente, la suspensión fue calentada a 85°C por 15 minutos para liberar el ADN y se centrifugó nuevamente. Se utilizó el sobrenadante como molde para la PCR.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, utilizándose 1X de Taq Buffer con KCl (Thermo Scientific®), 2 mM de  $MgCl_2$  (Thermo Scientific®), 0,2 mM de dNTPs mix, 1  $\mu$ M de cada primer, 1,5 U de la enzima Taq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, añadiéndose a la mezcla 2,5  $\mu$ L de ADN y agua UltraPure™ DNase/Rnase-Free Distilled Water-DEPC (Invitrogen®), hasta completar el volumen.

El protocolo de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, realizándose 35 ciclos a 95 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos y 72 °C por 45 segundos. Seguimiento de un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

**Tabla 4.** Primers utilizados para el análisis de micoplasmas en los cultivos celulares.

Nombre primer	Polaridad	Secuencia nucleotídica	Fragmento esperado
ADNr 16s <sup>a</sup>			
Myco5	Sentido	5'-YGCCTGRGTAGTAYGYWCGC-3'	600 pb
Myco3	Antisentido	5'-GCGGTGTGTACAARACCCGA-3'	(pares de bases)

<sup>a</sup>. Drexler y Uphoff, 2004.

### 4.3. Detección de HEV en cultivos celulares.

#### 4.3.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Se optimizó y se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia para evidenciar la presencia de antígenos virales pertenecientes a HEV en los aislamientos.

Fueron analizados los pasajes post-infección (ppi) 11, 15 y 20 correspondientes a A549. Con respecto al ppi 11, al momento de replicar las células, se retiró 150  $\mu$ l de células tripsinizadas para colocar sobre un portaobjetos, permitiéndole secar. Conjuntamente, con el propósito de analizar la efectividad de la reinfección, se realizó una reinfección con el ppi 15 como inóculo como se describió en 4.1.1.1 creciéndose por 72 horas, luego se realizó el mismo procedimiento que para el ppi 11.

Para el ppi 20, las células fueron crecidas directamente sobre cubreobjetos estériles en una placa de 6 wells incubándose por 3 días, posteriormente, los cubreobjetos fueron secados en cámara de flujo. Se incluyeron controles de células sin infectar en todos los ensayos.

En todos los casos, se fijaron las láminas sumergiéndolas en solución de fijación conteniendo formaldehído 4% por 20 minutos, lavándose dos veces con PBS 1X. A continuación, se llevó a cabo la permeabilización de las membranas celulares con el detergente no-iónico Tritón X-100 al 0,1% durante 10 minutos y se lavó con PBS 1X. Subsiguientemente, se realizó el bloqueo de las láminas para impedir interacciones inespecíficas por parte de los anticuerpos, para ello se cubrieron en solución PBS-BSA 1% incubándose *overnight* a 4 °C. Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo y se

añadió una dilución 1/200 en PBS-BSA 1% del anticuerpo primario monoclonal de ratón reconociendo la proteína de cápside de HEV (Abcam), durante 1 hora a temperatura ambiente.

Ulteriormente, las placas fueron lavadas con PBS-BSA 1% 3 veces cada 5 minutos, luego, para los ppi 11 y 20 se utilizó una dilución 1/500 en PBS-BSA 1% del anticuerpo secundario anti-ratón IgG H&L conjugado a isotiocianato de fluoresceína, FITC (Abcam), incubándose en oscuridad por 1 hora a temperatura ambiente. Sin embargo para el ppi 15, se utilizó una dilución 1/500 en PBS-BSA 1% del anticuerpo secundario anti-ratón IgG H&L conjugado al fluoróforo Alexa Fluor® 555 (Abcam) incubándose en oscuridad por 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, se lavaron las placas 2 veces con PBS-BSA 1% cada 5 minutos y se realizó un último lavado en PBS 1X.

Las láminas para los ppi 11 y 20 fueron incubadas posteriormente con una dilución 1/400 en PBS 1X del marcador DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) por 2 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, el cuál tiñe los núcleos al unirse a regiones AT en el ADN emitiendo fluorescencia azul, lavándose por último con PBS 1X. Los portaobjetos correspondientes al ppi 15 fueron incubados con la tinción nuclear azul de Evans en una dilución 1/30000 durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Las láminas se secaron y se montaron al cubreobjetos con glicerol estéril 70%.

Finalmente, fueron visualizadas en el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80 i.

#### 4.3.2. Extracción de ARN total celular.

Se realizó la extracción del ARN total por medio del método de Trizol™ (Invitrogen®, Thermo Scientific) según las especificaciones del fabricante. Las monocapas en botella F25 de los ppi 9, 10, 11, 15, 20 y 22 de A549 y las monocapas de los ppi 1 al 10 de HepG2 fueron lavadas con PBS 1X, se tripsinizaron y se les agregó medio de mantenimiento, utilizándose 1,5 ml para la extracción de ARN, 1 ml para continuar propagando el aislamiento y 1,5 ml se guardó como stock. Con respecto al aislamiento de los cultivos primarios de hepatocitos, luego de lavar las monocapas, se extrajo 1,5 ml de las 2 infecciones realizadas en placas de 6 wells.

Para llevar a cabo la extracción, los ppi seleccionados se centrifugaron a 1500 RPM por 5 minutos para recuperar las células, lavándose el pellet con PBS 1X, se añadió 1 ml del reactivo Trizol™ al pellet celular y se dejó 5 minutos en reposo a temperatura ambiente. Luego, se agregó 200 µl de cloroformo, vortexeando por 15 segundos y dejándose reposar por 3 minutos. A continuación, se centrifugó por 15 minutos a 14000 RPM 4 °C, recuperándose la fase acuosa y se añadió 500 µl de isopropanol, mezclándose por inversión unos segundos y se dejó reposar por 10 minutos en hielo.

Posteriormente, se centrifugó 10 minutos a 14000 RPM 4 °C, descartándose el sobrenadante, para añadirle 1 ml de etanol 75% al pellet. Seguidamente, se centrifugó por 2 minutos a 14000 RPM 4 °C, se retiró el sobrenadante, permitiéndole al pellet secar por unos minutos.

Finalmente, el pellet fue resuspendido en 30 µl de agua DEPC (Invitrogen®), calentándose ligeramente por 10 minutos a 60 °C para facilitar su disolución.

Por último, se midió su concentración y la relación de absorbancias 260/280 nm en

NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific®). El ARN obtenido fue alicuotado y almacenado a -80 °C hasta su análisis para preservar su integridad.

#### 4.3.3. Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa tiempo final (RT-PCR).

A partir del ARN total obtenido para A549, se llevaron a cabo tres RT-PCR para regiones distintas del genoma viral, que amplifican la cápside (CAP) codificada por ORF 2 y la metiltransferasa (MT) y replicasa (REP) correspondientes al ORF 1 (Tabla 5), con el propósito de detectar el ARN de HEV en los pasajes celulares. Incluyéndose en todas las reacciones un control negativo con agua estéril libre de nucleasas (UltraPure™ DNase/Rnase-Free Distilled Water-DEPC, Invitrogen®) en lugar de ARN.

**Tabla 5.** Sets de primers utilizados para la detección de HEV en los cultivos celulares.

Nombre primer	Round PCR	Polaridad	Posición nucleotídica	Secuencia nucleotídica	Fragmento esperado	T <sub>m</sub>
<b>MT (ORF 1)<sup>a</sup></b>						
HEA1	RT / 1 <sup>o</sup>	Antisentido	419-397	5'-CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC-3'	287 pb	50°C
HES1	1 <sup>o</sup>	Sentido	54-77	5'-CTGGCATYACTACTGCTGATTGAGC-3'		
HEA2	2 <sup>o</sup>	Antisentido	336-313	5'-GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC-3'		50°C
HES2	2 <sup>o</sup>	Sentido	50-70	5'-CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG-3'		
<b>CAP (ORF 2)<sup>b</sup></b>						
3157	RT / 1 <sup>o</sup>	Antisentido	6395-6417	5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3'	348 pb	58°C
3156	1 <sup>o</sup>	Sentido	5687-5708	5'-AAT(C)TATGCC(A)CAGTACCGGGTTG-3'		
3159	2 <sup>o</sup>	Antisentido	6298-6319	5'-AGCCGACGAAATC(T)AATTCTGTC-3'		58°C
3158	2 <sup>o</sup>	Sentido	5972-5993	5'-GTT(C)ATGC(T)TT(C)TGCATACATGGCT-3'		
<b>REP (ORF 1)<sup>c</sup></b>						
REAP	1 <sup>o</sup>	Antisentido	5276-5301	5'-GGGGTTGGTTGGATGAATATAGGGGA-3'	600 pb	56°C
RESP	1 <sup>o</sup>	Sentido	4535-4557	5'-TGGAAGAARCAITCYGGTGAGCC-3'		
RIAP	2 <sup>o</sup>	Antisentido	5257-5278	5'-GGAGTGCGAAGGGCTGAGAATC-3'		58°C
RISP	2 <sup>o</sup>	Sentido	4571-4593	5'-TGGAAYACYGTCTGGAAYATGGC-3'		

<sup>a</sup> Wang et al., 1999. Las posiciones nucleotídicas son de acuerdo a la cepa de referencia US AF060668.

<sup>b</sup> Meng et al., 1997a. Las posiciones de los primers son en relación a la secuencia publicada de una cepa HEV Birmana (Tam et al., 1991).

<sup>c</sup> Takahashi et al., 2002. Las posiciones nucleotídicas mencionadas son en referencia a la cepa HE-J14 (Takahashi et al., 2002).

#### ✿ Retrotranscripción (RT)

Para las regiones de MT y CAP se realizó la reacción en un volumen final de 20 µl. Se utilizó 5 µl de ARN, 1 µM de primer y se completó con agua DEPC, se incubó a 70 °C por 5 minutos y se colocó inmediatamente en hielo. Luego, fue adicionado el mix de reacción conteniendo 1X Reaction buffer, 1 mM dNTPs y 200 U de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific®) como concentraciones finales, incubándose

por 1 hora a 42 °C y posteriormente a 70 °C durante 15 minutos.

En el caso de REP, se optimizó el procedimiento, realizándose en las mismas condiciones antes descritas, excepto que se utilizó 0,2 µg de random hexámeros como primers (Thermo Scientific®) y por lo tanto se agregó un paso de incubación de 10 minutos a 25 °C previo a la etapa de 1 hora 42 °C.

#### ✿ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Para las tres amplificaciones se realizó una nested-PCR, aplicándose las mismas condiciones en ambos rounds. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, utilizándose 1X de Taq Buffer con KCl (Thermo Scientific®), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific®), 0,2 mM de dNTPs mix, 1 µM de cada primer, 1,5 U de la enzima Taq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, añadiéndose a la mezcla 5 µL de ADNc (ADN copia) y agua DEPC cantidad necesaria. El protocolo de ciclado para MT en ambos rounds consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, realizándose 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto. Seguido de un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

El ciclado para la amplificación de ambos *rounds* de CAP fue, 94°C - 5 min./ 35 ciclos de 94 °C - 1 min., 58°C - 45 seg., 72 °C – 1 min./ y 72°C – 10 min.

Finalmente, en el caso de REP para el primer round se utilizó el ciclado de 94 °C – 5 min/ 30 ciclos de 94 °C – 1 min., 56 °C – 1 min., 72 °C – 1 min./ 72 °C – 10 min. En el segundo round se modificó la temperatura de hibridación de los primers a 58 °C. Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador applied biosystems® AB-Veriti® 96-well.

#### **4.3.4. Electroforesis en gel de agarosa.**

Los productos de PCR obtenidos fueron examinados por medio de electroforesis en geles de agarosa, sembrándose 10 µL de producto de amplificación junto al buffer de carga 6X (Thermo Scientific®) en geles 1,5 % preparados en buffer TAE 1X (Tris, ácido acético, EDTA pH=8,4) y conteniendo 2,5 µl del agente intercalante SYBR® Safe 10000X (Invitrogen®), a un voltaje de 100 V.

En todos los casos se corrió un marcador de peso molecular 100 pb *GeneRuler™ Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific®).

Los productos corridos en la electroforesis fueron visualizados y fotografiados con un transiluminador bajo luz ultravioleta, sincronizado al programa bioinformático procesador de imágenes Carestream.

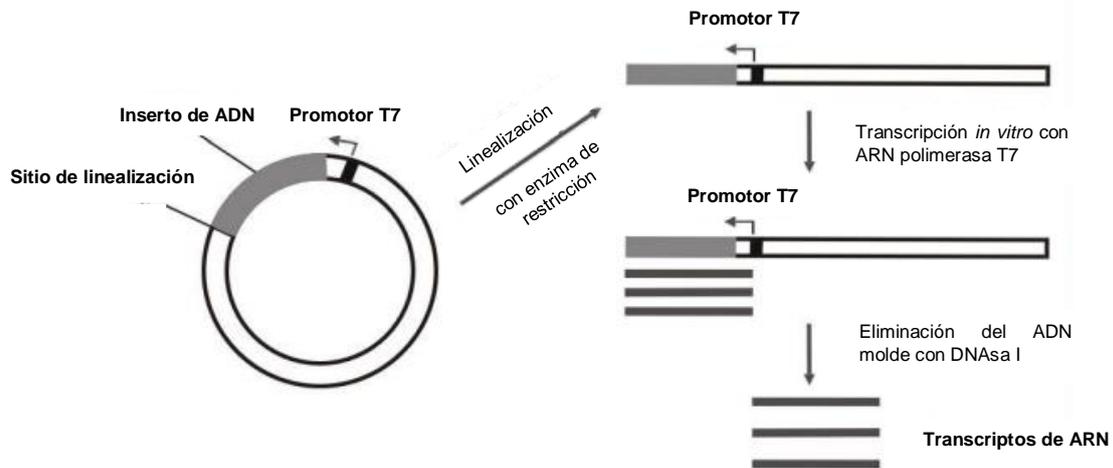
#### **4.3.5. Purificación y secuenciación de productos de PCR.**

Para confirmar la identidad de los fragmentos obtenidos, se procedió a la purificación de los amplicones de MT por banda de gel, con el Kit comercial Zymoclean™ gel DNA Recovery (Zymo Research). Se midió la concentración en ng/µL y la relación de absorbancias 260/280 nm en un NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific®).

Finalmente, los fragmentos purificados fueron secuenciados por el Servicio Secuenciador Automático ABI 3730xl de Macrogen, Corea. Posteriormente, la identidad de las secuencias fue confirmada a través de la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) perteneciente a NCBI (National Center for Biotechnology Information), empleándose el software BioEdit v. 7.0.5 para realizar el análisis y edición de las secuencias.

#### 4.3.6. Diseño de curva estándar para cuantificación absoluta por Real Time-RT PCR.

Primeramente, para el análisis de la cuantificación absoluta de ARN se debe realizar una transcripción *in vitro* del fragmento de interés, correspondiente en este caso a la región de solapamiento ORF2-3 de 137 pb, clonado en un vector plasmídico conteniendo el promotor T7 (Figura 16), como se detalla más adelante (Mirazo et al., 2018). A partir del transcripto obtenido de concentración conocida, se genera una curva estándar, basándose en diluciones seriadas de número de copias de ARN viral conocido, caracterizándose por una relación lineal inversamente proporcional entre el valor de Ct (número de ciclo en el cual la señal de fluorescencia supera el umbral) y el logaritmo del número de copias (Higuchi et al., 1993). Por último, se calcula el número de copias de la muestra de interés por medio de la regresión lineal de la curva estándar.



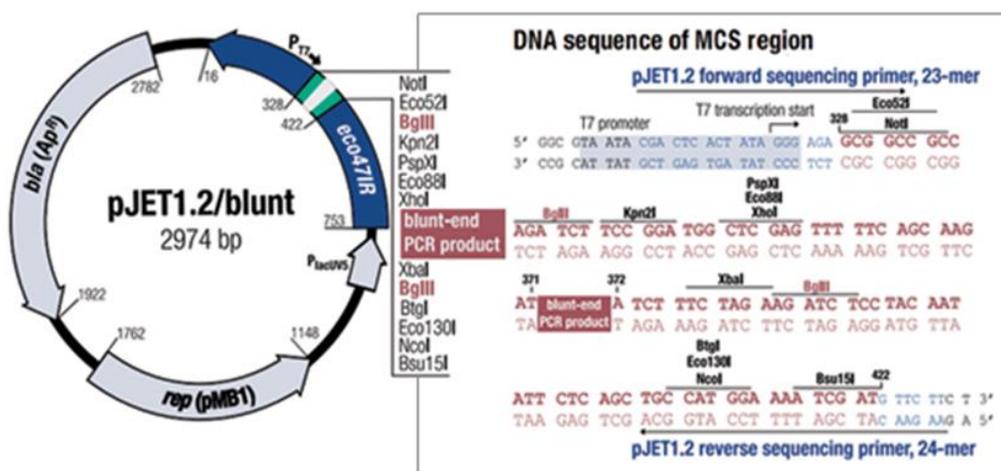
**Figura 16. Diagrama de la transcripción *in vitro*.** A partir del vector con el inserto de interés, se linealiza, se realiza la transcripción *in vitro* y luego se elimina el ADN molde. Extraído y adaptado del manual de TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit, Thermo Scientific®.

##### 4.3.6.1. Extracción de ADN plasmídico de pJET-ORF2.

A partir de un plásmido pJET 1.2 (Figura 17) conteniendo toda la región ORF2 de HEV (previamente clonado) (Mirazo, Tesis Doctoral 2014) conservado en glicerol, se creció un mini cultivo. Para ello, se utilizó 3 ml de LB líquido, 3  $\mu$ l de ampicilina 100 mg/ml y 5  $\mu$ l del vector a crecer, incubándose a 37 °C en agitación a 220 RPM overnight. Posteriormente, una vez crecidos los mini cultivos se procedió a la extracción del ADN plasmídico por medio del Kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo research), según las especificaciones del fabricante. A continuación, se midió la concentración en ng/ $\mu$ L y la relación de absorbancias 260/280 nm en NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific®.

#### 4.3.6.2. Linealización del vector.

Con el objetivo de obtener una síntesis eficiente de transcritos de tamaño definido, es necesario linealizar el vector, ya que de lo contrario, debido a la alta procesividad de la ARN polimerasa, los plásmidos circulares generan largos transcritos heterólogos en elevadas cantidades (TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit, Thermo Scientific®). Por lo tanto, se digirió el plásmido con la enzima de restricción NcoI que posee un sitio de reconocimiento para dicha enzima, en un volumen final de 10  $\mu$ l, se añadió 1 U de la enzima NcoI (Thermo Scientific®), 1 X de buffer Tango y 1  $\mu$ g del vector, luego se incubó a 37 °C durante 3 horas y se inactivó a 80 °C por 20 minutos. Subsiguientemente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8% para confirmar la efectiva restricción del vector. El plásmido conteniendo el inserto linealizado posee una longitud de 5000 pb.



**Figura 17. Vector de clonación pJET 1.2/blunt.** En la imagen se representan los distintos sitios presentes en el vector, la región *rep* (*pMB1*) perteneciente al replicón responsable de la replicación, un sitio de inicio de replicación, un promotor T7, el gen letal *eco47IR* y el gen  $\beta$ -lactamasa *bla* ( $Ap^R$ ). A la derecha del vector se indica la secuencia del mismo, destacándose el sitio de múltiple clonado, los sitios de reconocimientos de distintas enzimas de restricción (NcoI particularmente) y de hibridación para los cebadores forward y reverse incluidos en el Kit. (Extraído del manual CloneJET™ PCR Cloning Kit).

#### 4.3.6.3. Transcripción *in vitro*.

Es posible llevar a cabo la transcripción del inserto por medio de una ARN polimerasa T7 debido a que el plásmido pJET 1.2 contiene el promotor T7.

Se realizó la transcripción *in vitro* con el kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit, Thermo Scientific® según las especificaciones del proveedor (Figura 17). En un volumen final de 20 µl, se mezcló a temperatura ambiente 1X TranscriptAid Reaction buffer, 10 mM de cada NTP (ATP, CTP, GTP y UTP), 1 µg del plásmido lineal y 2µl de la enzima TranscriptAid enzyme mix (conteniendo la ARN polimerasa T7 e inhibidor de RNasa RiboLock™ recombinante).

A continuación, se incubó a 37 °C por 2 horas. Inmediatamente, se adicionó 2 U de DNasa I libre de RNasa (Thermo Scientific®) y se permitió incubar durante 15 minutos a 37 °C, luego se añadió 41.7 mM de EDTA pH 8 (Thermo Scientific®), incubándose 10 minutos a 65 °C.

Todas las concentraciones se encuentran expresadas como concentración final.

#### 4.3.6.4. Purificación de los transcritos.

A la reacción previamente obtenida se le adicionó 115 µl de agua DEPC y 292 mM de acetato de sodio pH 5,2 (Thermo Scientific®).

Posteriormente, se realizó la purificación de los transcritos por el método de Trizol™ (Invitrogen®, Thermo Scientific). Para ello, se añadió a la mezcla 150 µl del reactivo Trizol™, se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y se agregó 30 µl de cloroformo, vortexeando por 15 segundos y dejándose reposar durante 3 minutos.

Luego, se centrifugó a 14000 RPM por 15 minutos a 4 °C, recuperándose la fase acuosa, a la cual se le adicionó 75 µl de isopropanol, mezclando por inversión y permitiendo reposar por 10 minutos en hielo.

A continuación, se realizó otra centrifugación a 14000 RPM durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se le agregó 150 µl de etanol 75% al pellet. Subsiguientemente, se realizó una última centrifugación a 14000 RPM por 2 minutos a 4 °C.

Finalmente, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet obtenido, para luego resuspenderlo en 30 µl de agua DEPC, calentándose ligeramente por 10 minutos a 60 °C para facilitar su disolución.

#### 4.3.6.5. Cálculo del número de copias de ARN/µl.

En primer lugar, se midió la concentración de los transcritos obtenidos en ng/µL y la relación de absorbancias 260/280 nm en NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific®.

El cálculo del número de copias de ARN involucra: el peso molecular promedio de un nucleótido de ARN 340 Da, el número de Avogadro  $6,022 \times 10^{23}$  moléculas/mol, la concentración inicial del transcrito en g/µl y el largo del transcrito expresado en nucleótidos (IDT Integrated DNA Technologies-Scienceprimer.com).

$$\text{N}^{\circ} \text{ copias de ARN}/\mu\text{l} = \frac{[\text{transcripto ARN (g}/\mu\text{l)}] \times 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{\text{Largo transcripto (nt)} \times 340 \text{ g/mol.nt}}$$

#### 4.3.6.6. RT-PCR tiempo final de transcritos.

Para confirmar la efectiva transcripción del fragmento de interés, se realizó una RT-PCR a partir de los transcritos obtenidos. Asimismo, con el objetivo de corroborar la ausencia de ADN en las diluciones a utilizarse en la curva estándar, se incluyeron en la etapa de PCR los transcritos puros sin dilución y con dilución 1/10000, 1/100000. La RT-PCR se llevó a cabo como se describió anteriormente para la amplificación de la región CAP, utilizándose 1  $\mu\text{l}$  de molde para la PCR.

#### 4.3.6.7. Amplificación por Real Time RT-PCR.

Posteriormente, para realizar el estudio analítico de la qRT-PCR se llevó a cabo el ensayo amplificando el fragmento de la región de solapamiento de los ORF 2 y 3 (Tabla 6), verificando un buen desempeño de la curva estándar previo a incluir las muestras de interés en la reacción.

A partir del transcripto obtenido, se realizaron 5 diluciones seriadas en base 10 en el rango de  $3 \times 10^7 - 3 \times 10^3$  número de copias/  $\mu\text{l}$ .

Se utilizó el kit SuperScript<sup>®</sup> III Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green-One-Step qRT-PCR with ROX (Invitrogen, Life Technologies) según las especificaciones del fabricante, el cual se basa en el sistema de fluoróforo SYBR Green (uniéndose directamente a ADN doble hebra) y el fluorocromo ROX como referencia pasiva para normalizar la señal de fluorescencia. La reacción se llevó a cabo en 25  $\mu\text{l}$  de volumen final, utilizándose 12,5  $\mu\text{l}$  de 2X SYBR<sup>®</sup> Green Reaction Mix with ROX, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0,5  $\mu\text{l}$  de la enzima SuperScript<sup>™</sup> III RT/Platinum<sup>®</sup> Taq Mix y 3  $\mu\text{l}$  de ARN, por duplicado para cada muestra y estándar. El protocolo de ciclado utilizado se describe en la Tabla 7. Las amplificaciones de qPCR fueron llevadas a cabo en el equipo ABI 7500 (Applied Biosystems), empleando el software ABI 7500 versión 3.0.

Los aislamientos en A549, HepG2 y de hepatocitos primarios de rata fueron analizados por Real Time PCR para cada pasaje realizado, con el objetivo de estudiar la cinética de replicación viral, así como también las reinfecciones a las 48, 72 y 96 horas llevadas a cabo en A549 y HepG2, cuantificando en todos los casos el título viral.

**Tabla 6.** Primers utilizados para la amplificación por qRT-PCR.

Nombre primer	Polaridad	Secuencia nucleotídica	Fragmento esperado	Posición nucleotídica del amplicón
<b>ORF 2-3<sup>a</sup></b>				
366	Sentido	5'-GYTGATTCTCAGCCCTTCGC-3'	137 pb	5325–5461
363	Antisentido	5'-GMYTGGTCDGCCAAGHGGA-3'		

<sup>a</sup>. Inoue et al., 2006. La posición nucleotídica es de acuerdo con la cepa HE-JA10 (AB089824).

**Tabla 7.** Protocolo de ciclado para la amplificación de un fragmento de la región ORF 2-3 por Real Time RT-PCR.

	Temperatura	Tiempo
<b>Holding</b>	42° C	30 min
	95° C	10 min
<b>Ciclado (40 ciclos)</b>	95° C	45 seg
	58° C	45 seg
	72° C	45 seg
<b>Curva de disociación o melt</b>	95° C	15 seg
	60° C	15 seg
	95° C	15 seg

#### 4.3.6.8. Curva estándar de cuantificación absoluta.

Una vez obtenida la curva estándar (se promediaron los valores de Ct entre tres ensayos independientes con 2 réplicas cada uno) describiendo una adecuada relación lineal entre el logaritmo en base 10 de la concentración del estándar y el valor de Ct, se analizaron cuatro parámetros que evalúan el desempeño analítico del ensayo: la eficiencia, el rango dinámico, el coeficiente de determinación y el coeficiente de variación (CV) intra e inter ensayo.

La eficiencia de la qRT-PCR se define como la capacidad de la qRT-PCR de duplicar el ADNc molde disponible en cada ciclo, la misma fue calculada según la ecuación  $E = 10^{(1/K)} - 1$ , siendo K la pendiente de la recta.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) indica el ajuste de los datos a la recta de regresión. El rango dinámico es el rango de concentraciones donde la PCR se comporta de forma cuantitativa permitiendo cuantificar la muestra de interés.

Los coeficientes de variación permiten evaluar la reproducibilidad del ensayo, los CV intra ensayo determinan la variabilidad de los Ct dentro de un mismo experimento para tres reacciones de PCR y los CV inter ensayo establecen la variabilidad de los Ct entre

tres experimentos idénticos. Los CV se calcularon mediante la ecuación  $CV = (S_{n-1}/\bar{X}) * 100$ , siendo  $\bar{X}$  la media de los valores de Ct y  $S_{n-1}$  el desvío estándar.

#### 4.4. Análisis transcriptómicos.

La secuenciación de un transcriptoma entero provee un importante entendimiento del perfil transcripcional celular en un momento biológico dado, dando lugar a la identificación y la cuantificación de transcritos, lo que permite estudiar la expresión génica en un organismo (An introduction to Next-Generation Sequencing Technology Illumina).

##### 4.4.1. Verificación de la integridad del ARN total celular.

Primeramente, se seleccionaron los ppi 11 correspondientes a A549 para el análisis transcriptómico, para ello, es necesario corroborar la integridad del ARN total extraído anteriormente para las infecciones y controles de células. Por lo tanto, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 0,8% como se detalló previamente, utilizando 50 µg de bromuro de etidio como agente intercalante (Invitrogen®).

El ARN total íntegro se visualiza como 2 bandas correspondientes a las subunidades de los ARN ribosomales eucariotas (ARNr), encontrándose a 4,5 Kb para el 28s y a 1,9 Kb para el 18s.

##### 4.4.2. Estabilización de muestras para transporte.

Fue necesario utilizar un medio que permitiera preservar los ARN a temperatura ambiente a largo plazo ya que las muestras fueron analizadas en el laboratorio AUSTRAL-omics, Universidad Austral de Chile (UACH) Campus Isla Teja, Valdivia-Chile. Precisamente, se empleó el sistema de RNAstable® (Biomatrix), el cual se basa en una mezcla de compuestos termoestables que forman una cubierta protectora alrededor del ARN estabilizándolo y permitiendo su almacenaje a temperatura ambiente. Se añadió 10 µl de ARN a cada tubo RNAstable® (conteniendo la capa protectora) y se secó utilizando SpeedVac por 30 minutos sin calor. Posteriormente, cuando se desee, el ARN puede ser fácilmente recuperado por medio del agregado del mismo volumen de agua y permitiendo hidratar durante 15 minutos.

##### 4.4.3. Construcción de Librerías.

En primer lugar, las muestras (réplicas biológicas) fueron hidratadas y purificadas por el kit Nucleospin RNA Clean-up (Macherey-Nagel), en el laboratorio AUSTRAL-omics. Seguidamente, la integridad de los ARN se comprobó nuevamente por medio de un Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Inc.) empleando el kit RNA DNF 471, para lo cual, 2 µl de cada muestra fueron desnaturalizados a 70 °C por 2 minutos, cargándose con 22 µl de buffer *diluent marker* en una placa de 96 pocillos.

A continuación, se obtiene la concentración y el valor de integridad de ARN (RIN), el cual posee un rango de 0-10, considerándose apropiados para la secuenciación valores entre 7 y 10. Asimismo, se midió la concentración por fluorimetría utilizando el kit Qubit® RNA HS Assay en un Qubit® 3.0 (Invitrogen®).

El protocolo de generación de librerías se llevó a cabo con el kit KAPA Stranded mRNA-Seq Illumina® Platforms (Kapa Biosystems) (Figura 18).

El proceso implica capturar las moléculas de ARNm conteniendo poli-A utilizando perlas magnéticas unidas a oligo-dT. A continuación de la captura, el ARNm es fragmentado bajo elevada temperatura en presencia de magnesio, inmediatamente, estos pequeños fragmentos de ARNm clivados son copiados en una primera hebra de ADNc utilizando transcriptasa reversa y random primers. La síntesis de la segunda hebra de ADNc convierte el híbrido ADNc:ARN a ADNcdh (ADN copia doble hebra) e incorpora dUTP a la segunda hebra de ADNc (la cual no será amplificada). Subsiguientemente, los fragmentos de ADNc atraviesan un proceso de reparación de extremos, de adición de una base A y luego la ligación de los adaptadores (oligos que son complementarios a los primers unidos a la celda de flujo). Finalmente, los productos son luego enriquecidos y purificados por medio de una PCR para crear la librería de ADNc final.

#### ✿ Captura de los ARNm.

Primeramente, las perlas de captura fueron resuspendidas e incubadas en una placa magnética para remover el sobrenadante, reemplazándolo con igual volumen de *binding buffer* y repitiendo este paso 2 veces. Luego, se añadieron 50 µl de perlas en *binding buffer* a 50 µl del ARN total (100 ng finales), realizándose la captura en un termociclador a 65 °C por 2 minutos. A continuación, la solución se incubó en una placa magnética, descartándose el sobrenadante. Las perlas magnéticas fueron luego resuspendidas en 200 µl de buffer de lavado y sometidas nuevamente a la placa magnética, descartándose el buffer. Posteriormente, las perlas se resuspendieron en agua DEPC libre de RNasas y se realizó una segunda captura de ARNm a 70 °C durante 2 minutos.

#### ✿ Fragmentación de ARNm, priming y elución.

Las perlas conteniendo los ARNm se resuspendieron en el buffer 1X de fragmentación, priming y elución y fueron incubadas en un termociclador a 94 °C por 7 minutos, obteniéndose un tamaño de ARNm de 300 pb aproximadamente. Luego, se incubaron las muestras en la placa magnética, conservándose el sobrenadante (20 µl).

#### ✿ Síntesis de primera y segunda hebra por transcripción reversa.

A continuación, se incubó en termociclador los ARNm fragmentados con el master mix de síntesis de primera hebra. Inmediatamente, se añadió el master mix de síntesis de segunda hebra al producto obtenido y se incubó durante 1 hora a 16 °C.

Luego, el sobrenadante del producto de reacción fue removido utilizando las perlas magnéticas AMPure XP, realizándose posteriormente, 2 lavados sucesivos con etanol 80%.

#### ✿ A-tailing y ligación de adaptadores.

Subsiguientemente, las perlas magnéticas conteniendo el ADNcdh se incubaron con el mix de A-tailing por 30 min. a 30 °C y 30 min. a 60 °C, añadiéndose de esta forma dAMP a los extremos 3'. Seguidamente, se agregaron a las perlas, 35 µl del mix de ligación de adaptadores y 5 µl de los adaptadores TruSeq RNA (Illumina®), incubándose por 15 minutos a 20 °C. Las perlas con el ADNcdh ligado con adaptadores fueron lavadas en primer lugar con una solución de PEG/NaCl y luego, se realizaron 2 lavados con etanol 80%, repitiéndose el procedimiento 2 veces.

El ADNcdh fue resuspendido en 22 µl de Tris-HCl pH 8,0 10 mM.

#### ✿ Amplificación de las librerías.

Se realizó la amplificación empleando 20 µl de ADNcdh y 30 µl de master mix de amplificación de librerías. El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 98 °C por 45 seg., seguido de 16 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 15 seg., hibridación 60 °C - 30 seg. y extensión 72 °C – 30 seg., con una extensión final de 5 min. a 72 °C.

Posteriormente, las librerías fueron purificadas mediante 2 lavados con etanol 80% en placa magnética utilizando las perlas magnéticas AMPure XP.

Por último, las librerías se resuspendieron en 22 µl Tris-HCl pH 8,0 10 mM, verificándose por medio de un Fragment Analyzer, utilizando el kit de alta sensibilidad para NGS, DNF 474 HS-NGS.

#### ✿ Cuantificación de las librerías.

Las librerías se cuantificaron utilizando el kit dsDNA HS Qubit Assay y se calcularon en nM con la siguiente fórmula:

$$\left[ \frac{\text{Concentración en ng/}\mu\text{l}}{660 \text{ g/mol} \times \text{tamaño promedio de librería}} \right] \times 10^6 = \text{Concentración en nM}$$

Finalmente, las librerías se cargaron en el equipo NextSeq 550 a una concentración de 12 pM.

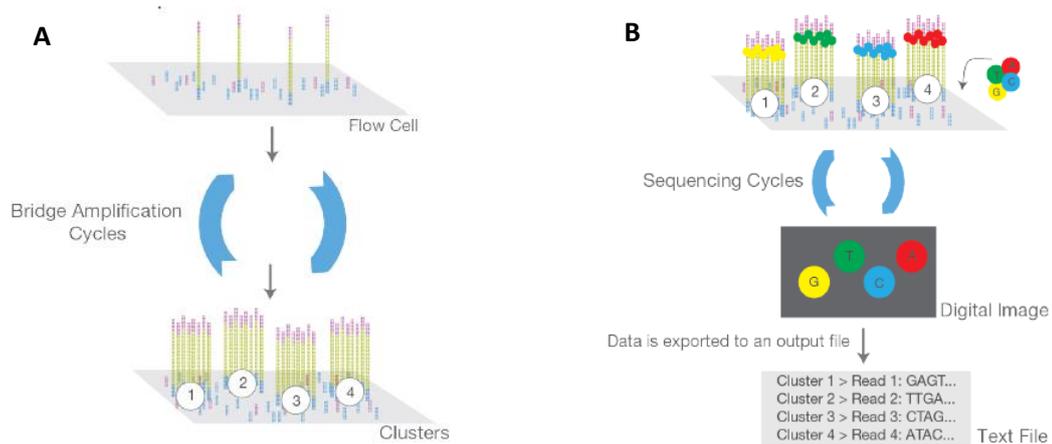
#### 4.4.4. Secuenciación masiva (Next-Generation Sequencing).

La secuenciación se llevó a cabo en el equipo NextSeq 550 (Illumina®) de acuerdo a su guía de sistema Illumina.

En primer lugar, las bibliotecas normalizadas son desnaturizadas y diluidas, luego son cargadas en un cartucho de reactivo y posteriormente en una celda de flujo (*flow cell*). Durante esta etapa, ocurre la generación de clusters, donde cada molécula individual de ADN es clonalmente amplificada a través de amplificación por puente (Figura 18). Para ello, inicialmente las monohebras de ADN de la librería se unen a los oligos complementarios en la celda, la amplificación por puente ocurre cuando el otro extremo del fragmento ligado forma un puente hacia otro oligo complementario en la celda, la posterior repetición de los ciclos de desnaturalización y extensión resulta en la amplificación localizada de moléculas individuales en millones de clusters clonales únicos.

A continuación, se realiza la secuenciación por síntesis (SBS), la cual utiliza cuatro nucleótidos fluorescentemente marcados. Durante cada ciclo de secuenciación, un dNTP marcado es incorporado en la cadena nucleotídica, actuando como un terminador reversible para la polimerización. Luego, el fluoróforo es identificado a través de excitación por láser y adquisición de imagen de la celda. Por último, el fluoróforo es clivado enzimáticamente.

Finalmente, cada cluster en la celda de flujo producirá un solo read de secuencia.



**Figura 18. Diagrama sobre la secuenciación masiva (NGS).**

**A.** Generación de clusters. **B.** Secuenciación. Extraído de An introduction to Next-Generation Sequencing Technology Illumina.

#### 4.4.5. Análisis bioinformático.

El análisis informático se llevó a cabo en el laboratorio AUSTRAL-omics, UACH. Con el propósito de identificar los genes con expresión diferencial entre las células A549 sin infectar e infectadas, el análisis informático de las secuencias se basó parcialmente en el artículo de Trapnell et al., 2012.

Primeramente, las lecturas obtenidas mediante la secuenciación fueron sometidas a un control de calidad utilizando el programa PrinSeq (Schmieder y Edwards, 2011). Este control de calidad consistió, en primer lugar, en la remoción de las primeras 11 pb de cada secuencia para así eliminar las bases poco resueltas por el secuenciador, propio de la tecnología Illumina. Luego, se realizó un *trimming* por calidad en el extremo 3' para remover las regiones de baja calidad introducidas por la secuenciación. Además, se eliminaron las lecturas que presentaron un largo de secuencia menor a 40 pb, para evitar el alineamiento inespecífico de fragmentos de ADN muy cortos. Seguidamente, se eliminó el conjunto de datos de lecturas con calidad promedio menor a Q30.

Posteriormente, las lecturas filtradas fueron alineadas contra el genoma humano (versión GRCh38, GenBank assembly accession: GCA\_000001405.15) como referencia.

El alineamiento se realizó con el software mapeador de lecturas de ARN-seq TopHat (Trapnell et al., 2009) utilizando el parámetro *--library-type=fr-firststrand*, diseñado para considerar las uniones de splicing entre exones presentes en genomas eucariotas, el cual utiliza el alineador Bowtie (Langmead et al., 2009).

Luego de alineadas las secuencias, con el objetivo de identificar los genes diferencialmente expresados, se utilizó el programa Cufflinks a través de la herramienta Cuffdiff (Trapnell et al., 2010), empleando la anotación de genes de ensembl versión 83, correspondientes al genoma de referencia (GRCh38). El software Cuffdiff permite calcular con elevada exactitud los niveles de expresión de 2 o más muestras con significancia estadística, este modelo estadístico asume que el número de lecturas generadas por cada transcripto es proporcional a su abundancia, pero fluctúa debido a la variabilidad técnica introducida por la preparación de las librerías, secuenciación y por la variabilidad biológica de las réplicas.

Una vez cuantificados los transcriptos, se normalizaron los niveles de expresión con el método FPKM (Fragmentos por kilobase de transcripto por millones de fragmentos mapeados) en Cuffdiff, permitiendo que los niveles de expresión para los diferentes genes y transcriptos puedan ser comparados entre corridas. A continuación, se realizó un análisis de la variabilidad de las réplicas utilizando el método Escalado Multidimensional (MDS) en Cuffdiff, con el propósito de observar si existen réplicas atípicas (*outliers*) que se pueden llegar a originar durante las etapas de preparación de librerías y secuenciación.

Finalmente, los genes con expresión diferencial estadísticamente significativa respecto a la condición control fueron definidos como aquellos que exhibieron un valor de FDR < 0.05 (p-valor ajustado para múltiples pruebas utilizando la corrección de Benjamini-Hochberg- tasa de descubrimiento falso) y a su vez,  $(\text{Log}_2(\text{tratamiento/control}) \geq 1, \text{ o } \leq -1)$ , es decir, el valor del logaritmo en base 2 de la tasa de cambio ( $\log_2$  fold change) sea

mayor o igual a 1 (genes sobre-expresados DGE-UP), o por otro lado, menor o igual a -1 (genes sub-expresados DGE-DOWN).

Asimismo, se utilizó la herramienta R/Bioconductor (Gentleman et al., 2004) CummeRbund con los resultados generados mediante Cuffdiff para la visualización y realización de los gráficos.

Posteriormente, el análisis bioinformático de los datos obtenidos se realizó en el marco de una pasantía en la Universidad Austral de Chile-Valdivia.

A partir de los genes diferenciales obtenidos se realizó una búsqueda para identificar los términos enriquecidos de ontología de genes (GO) y p-valores, con un umbral de  $10^{-3}$ , utilizando la herramienta GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>) (Eden et al., 2009). A continuación, estos valores fueron sometidos al software REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (Supek et al., 2011), el cual reduce términos GO redundantes, permitiendo visualizar gráficamente los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares involucrados.

Conjuntamente, se realizó la anotación funcional de los DGE totales empleando el programa DAVID v 6.8 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery- <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) (Huang et al., 2009a).

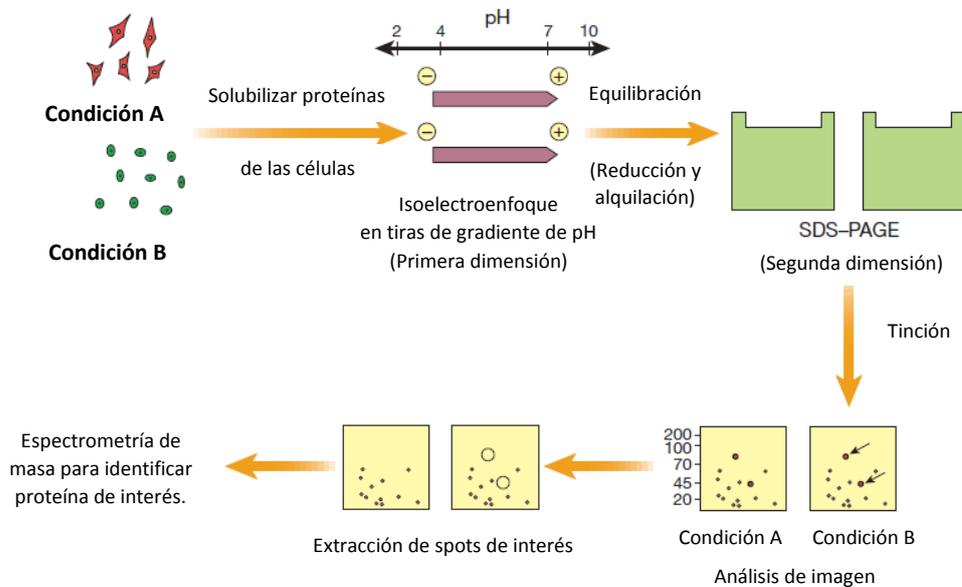
Paralelamente, se llevaron a cabo además, análisis de ontología identificando las vías metabólicas y de señalización alteradas por medio del programa Panther (<http://www.pantherdb.org/geneListAnalysis.do>) (Mi et al., 2016).

#### **4.5. Análisis proteómicos.**

El proteoma representa a la totalidad de proteínas pertenecientes a un organismo o sistema en un contexto biológico dado, mientras que la proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas. El análisis proteómico ha sido asociado tradicionalmente a la exhibición de grandes números de proteínas de una línea celular dada u organismo en geles de poliacrilamida bidimensionales, en términos de presencia y abundancia relativa. El objetivo de esta técnica usualmente es la caracterización de la compleja red de regulación celular, identificando proteínas que están sobre-expresadas o sub-expresadas, es decir comparar el perfil de expresión proteica, entre dos condiciones biológicas distintas.

La electroforesis bidimensional clasifica a las proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes en dos pasos separados (Figura 19).

La etapa de primera dimensión corresponde al isoelectroenfoco (IEF), el cual separa las proteínas de acuerdo a su punto isoelectrónico (pI) y el paso de segunda dimensión es una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), separando a las proteínas según su peso molecular. Por lo tanto, cada spot resultante en el ensayo bidimensional corresponde a una única proteína de la muestra (2D Electrophoresis Principles and Methods-Amersham Biosciences).



**Figura 19. Esquema representando la técnica de electroforesis bidimensional.**

Las células derivadas de 2 condiciones diferentes son solubilizadas y el extracto crudo es sometido a isoelectroforesis. Luego, las cisteínas de la tira son reducidas y alquiladas para aplicarse a un gel SDS-PAGE. El gel se tiñe, se analizan las imágenes y los spots diferenciales de interés son estudiados por espectrometría de masa. Extraído y modificado de Pandey y Mann, 2000.

#### 4.5.1. Lisis celular.

Primeramente, se realizó la reinfección de HEV en A549 con el pasaje celular que presentó mayor número de copias de ARN como se describió anteriormente. Las monocapas celulares de A549 sin infectar e infectadas con confluencia del 100% correspondientes a placas p100 de cultivo celular (aproximadamente  $8,8 \times 10^6$  células) fueron tripsinizadas, diluidas en PBS 1X y centrifugadas a 2000 RPM por 5 minutos, luego, el pellet se lavó en PBS, volviéndose a centrifugar, este procedimiento fue repetido 3 veces y el pellet seco fue conservado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. Se realizó la optimización de la lisis celular utilizando diferentes condiciones.

##### ✿ Lisis mecánica.

Con el objetivo de comparar la efectividad de las distintas condiciones, se emplearon 3 métodos por separado de lisis mecánica: congelado-descongelado en nitrógeno líquido, sonicación y calor. Para ello, el pellet obtenido anteriormente fue resuspendido en 200  $\mu\text{l}$  de PBS.

A continuación, por un lado se realizó la lisis mediante 3 rondas de congelado y descongelado en nitrógeno líquido, paralelamente, se lisó mediante sonicación durante 72 segundos a 38% de potencia, según Shen et al., 2014 y por último, otra suspensión celular fue calentada a 90 °C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó 15 minutos a 14000 RPM a 4 °C para remover el debris celular, conservando el sobrenadante y almacenándolo a -80 °C hasta su análisis.

#### ✿ Lisis por medio de detergentes.

Asimismo, se optimizó la lisis celular con un método más adecuado utilizando buffers de lisis conteniendo detergente, según Shen et al., 2014 con modificaciones.

En primer lugar, se utilizó un buffer de lisis 1 conteniendo 7 M de urea, 2 M de tiourea, 4% del detergente zwitteriónico CHAPS, 1X de Inhibidor de Proteasa en tableta (SigmaFAST™) y 50 µM de DTT. Se añadió 200 µl del buffer de lisis al pellet celular y se permitió solubilizar a temperatura ambiente durante 1 hora. Inmediatamente, el ADN fue removido y la suspensión de lisis fue centrifugada a 14000 RPM por 15 minutos, recuperándose el sobrenadante, el cual se centrifugó nuevamente para remover todo remanente de debris celular. El sobrenadante fue alicuotado y conservado a -80 °C.

Finalmente, se escogió el buffer de lisis 2 como opción más apropiada, conteniendo 7 M de urea desionizada, 2 M de tiourea, 2% de CHAPS, 0,002% de azul de bromofenol y 20 mM de TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) como agente reductor. Se agregó 800 µl de este buffer de lisis al pellet celular y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 14000 RPM a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante, volviéndose a centrifugar a continuación.

Por último, se alicuotó el sobrenadante, almacenándolo a -80 °C.

#### 4.5.2. Cuantificación por método de Bradford.

La cuantificación por el método de Bradford se basa en una reacción colorimétrica, utilizando la tinción Coomassie G-250, la cual es catiónica doblemente protonada bajo condiciones ácidas y de color rojo. Cuando entra en contacto con una proteína, el Coomassie es convertido a una forma estable azul desprotonada con una absorción máxima a 595 nm. Precisamente, debido a que la cantidad de la forma azul aniónica es proporcional a la cantidad de proteínas en la muestra, es posible cuantificar la concentración de las mismas por medio de una curva estándar lineal.

En primer lugar, se puso a punto la metodología, se preparó una solución stock de 10 mg/ml de BSA (Seroalbúmina bovina) (AppliChem), a partir de la cual se prepararon 5 diluciones, 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 mg/ml y un blanco (agua miliQ) para realizar la curva de calibración.

Paralelamente, las muestras de lisados celulares fueron medidas sin diluir y diluidas ½, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80.

El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 wells fondo plano (Greiner CELLSTAR®), se cargó por duplicado en cada pocillo 10 µl de cada dilución y 300 µl del reactivo de Bradford (Fermentas®). Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Varioskan® Flash (Thermo Scientific®) a 595 nm.

A continuación, se graficó la curva de calibración absorbancia versus concentración proteica en mg/ml, restándose la absorbancia del blanco a las absorbancias obtenidas para las diluciones. Finalmente, la concentración proteica de los lisados fue interpolada de la curva de calibración.

#### 4.5.3. SDS-PAGE.

Los lisados celulares fueron inicialmente analizados por SDS-PAGE en geles 12% de 10 X 8 X 0,46 cm (BioRad Mini PROTEAN system).

Todas las concentraciones se expresan como concentraciones finales.

El gel separador consistió en acrilamida/bisacrilamida 12%, 375 mM de Tris-HCl/SDS pH 8,8, 0,1% de Persulfato de amonio (APS), 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sodio) y 0,07% de Temed (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) en un volumen final de 5 ml.

Para el gel concentrador se utilizó 5% de solución de acrilamida/bisacrilamida, 80 mM de Tris-HCl/SDS pH 6,8, 0,1% de APS, 0,1% de SDS y 0,1% de Temed, en un volumen final de 2 ml.

Se sembraron 1,4 µg, 4 µg, 10 µg, 20 µg de proteína de las muestras para las distintas condiciones de lisado mecánico, evaluándose la diferencia sin calentar y calentadas a 80°C por 7 minutos en buffer de carga (SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,1% y 50 mM DTT), en un volumen final de 20 µl. Además, se analizaron los lisados en buffer de lisis para 4 µg, 5 µg, 10 µg y 20 µg de proteínas en buffer de carga sin calentar, en un volumen final de 20 µl.

Se utilizó 5 µl del marcador de peso molecular *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific®).

A continuación, se realizó la corrida electroforética en la cuba *Mini PROTEAN Tetra Cell* (BioRad) a 60 mA utilizando buffer de electroforesis (Tris base, glicina y SDS).

Posteriormente, los geles fueron fijados y teñidos en agitación overnight en solución de tinción (0.05% Coomassie R-250, 9% ácido acético, 45% metanol y se completó con miliQ).

Al día siguiente, los geles fueron desteñidos utilizando una solución decolorante (20% metanol, 10% etanol, 5% ácido acético, completándose con agua miliQ) manteniéndose en agitación hasta la visualización de las bandas.

#### 4.5.4. Isoelectroenfoque

El punto isoeléctrico de una proteína se define como el valor de pH para el cual su carga neta es cero. Precisamente, las diferencias en los puntos isoeléctricos de las proteínas son la base de separación por isoelectroenfoque.

El principio del método isoelectroenfoque es someter proteínas a un gradiente de pH

bajo un campo eléctrico, por lo que comenzarán a moverse hacia el electrodo con carga opuesta. Durante la migración a través del gradiente de pH, las proteínas acumularán o perderán protones, a medida que migran, su carga neta y movilidad disminuirán, eventualmente, la proteína se detendrá al llegar al punto en el que el gradiente de pH iguale su pI.

El procedimiento se llevó a cabo utilizando tiras de pH inmovilizado (IPG strips), donde el gradiente de pH está covalentemente unido a la matriz de acrilamida, se emplearon Immobiline DryStrip Gels pH 4-7 lineal de 13 cm (GE Healthcare, Life Sciences), según el protocolo de Shen et al., 2014 con modificaciones.

En primer lugar, las tiras fueron rehidratadas de forma pasiva, para ello, se añadió 75 µg de lisado del buffer de lisis 1, 0,5% de IPG buffer 4-7 conteniendo anfolitos (mejorando la solubilidad de las proteínas y produciendo una conductividad más uniforme) y buffer de rehidratación (7 M de urea desionizada, 2 M de tiourea, 2% de CHAPS, 0,002% de azul de bromofenol, 18 mM DTT) en un volumen final de 250 µl en bandejas de cerámica de 13 cm con electrodos (Ettan IPGphor Strip Holder-GE). Luego, se selló con aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.

Posteriormente, se optimizó utilizando finalmente 120 µg de proteínas directamente del buffer de lisis 2, el cual es a su vez el buffer de rehidratación (utilizándose inmediatamente después de efectuada la lisis celular), añadiendo solamente 0,5% de IPG buffer, cargándose 250 µl en las bandejas.

La rehidratación pasiva con la muestra se realizó directamente en las bandejas de cerámica en el equipo Ettan IPGphor II a 20 °C durante 16 horas. El protocolo de corrida del isoelectroenfoco se realizó a 20 °C en la unidad Ettan IPGphor II a 50 µA por tira (Tabla 8), según las recomendaciones del manual de GE 2D Electrophoresis Principles and Methods. Las tiras fueron luego conservadas a -20 °C hasta su utilización.

**Tabla 8.** Protocolo de corrida para isoelectroenfoco en tiras de 13 cm IPG strips 4-7 GE.

Etapa	Modo de voltaje	Voltaje	Tiempo	Volts-horas
S1	Step and hold	500 V	1 hr	
S2	Gradient	1000 V	1 hr	
S3	Gradient	8000 V	2:30 hr	
S4	Step and hold			8000 Vhr
<b>Total</b>				<b>20.500 Vhr</b>

#### 4.5.5. Equilibración.

Las tiras deben ser equilibradas previo a realizar la segunda dimensión. Para solubilizar las proteínas enfocadas y permitir la unión del SDS, es necesario equilibrarlas en buffers conteniendo SDS.

Primeramente, las tiras fueron incubadas en buffer de equilibración (Urea 6M, glicerol

30%, Tris-HCl pH 8,8 50 mM, SDS 2% y azul de bromofenol 0,002%), se añadió además 5 mM de TCEP y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos para reducir los grupos sulfhidrilos. Subsiguientemente, se retiró la solución y se agregó nuevamente buffer de equilibración con el agregado esta vez de 20 mM de iodoacetamida (IAA) para alquilar las cisteínas reducidas, permitiéndose incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

#### 4.5.6. Electroforesis bidimensional.

Se prepararon geles verticales SDS-PAGE 10% de 15 cm X 15 cm X 1,5 mm como fue detallado previamente, utilizando 34 ml de gel separador y 4 ml de gel concentrador sin colocar peine. Las tiras fueron colocadas en la parte superior de los geles junto con el marcador de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific®) cargado en papel de filtro. Seguidamente, la tira y el marcador fueron cubiertos con solución de sellado de agarosa (agarosa 0,5%, buffer de corrida SDS 1X, azul de bromofenol 0,002% y cantidad suficiente de agua miliQ).

A continuación, se efectuó la corrida electroforética a 50 V por 17 horas y se aumentó a 200 V durante 2:30 horas finales.

Los geles 2D fueron fijados en solución de fijación (30% etanol, 7% ácido acético y agua miliQ hasta completar) y se tiñeron *overnight* con solución de Coomassie coloidal (ácido fosfórico 10%, sulfato de amonio 10%, Coomassie Blue G-250 1,2% y etanol 15%).

Se escanearon los geles en un escáner UMAX Power-Look 1120 (Institut Pasteur de Montevideo) con el software LabScan (GE Healthcare). Las imágenes fueron analizadas visualmente.

#### 4.5.7. Identificación de proteínas por espectrometría de masa.

El spot diferencial identificado fue escindido manualmente del gel y analizado por el servicio de espectrometría de masa del Institut Pasteur de Montevideo. La adquisición de los espectros (MS y MS/MS) se realizó en un espectrómetro de masa MALDI/TOF-TOF (Analyzer Abi Sciex).

Posteriormente, la identificación de la proteína por mapeo peptídico se realizó con el motor de búsqueda Mascot (<http://www.matrixscience.com>) a partir de los valores obtenidos de masas monoisotópicas MS (m/z) y MS/MS (m/z).

Los parámetros de búsqueda utilizados fueron: un salto de corte de tripsina permitido, carbamidometilación de cisteínas (debido al empleo de IAA) y oxidación de metioninas (debido al empleo de APS) como modificaciones, una tolerancia de masa de péptidos (MS) de 0,05 Da y una tolerancia de masa de fragmento (MS/MS) de 0,6 Da.

Finalmente, se consideró una correcta identificación de la proteína a los valores de score de Mascot estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

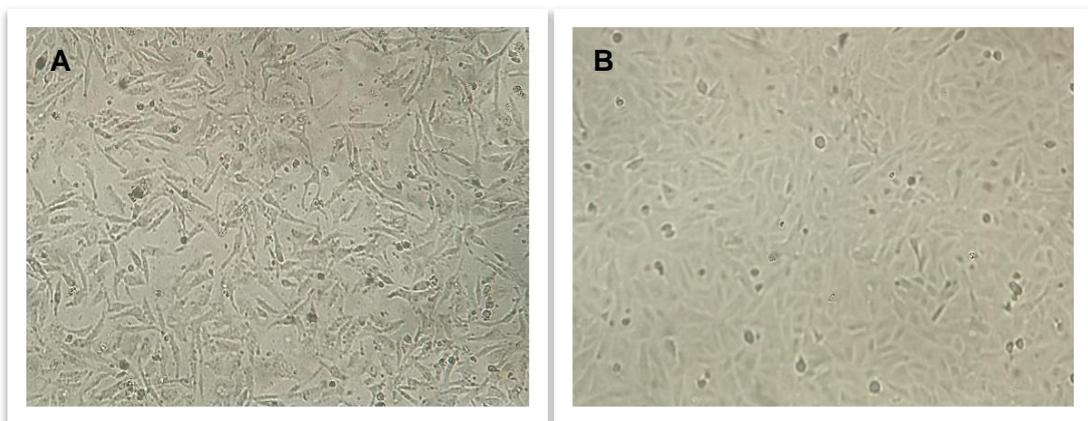
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Aislamiento viral.

#### ☀ Células A549.

Luego de 22 pasajes seriados post-infección (ppi) a partir de los dos sueros humanos S2 y S3 del HEV3, se observó un claro efecto citopático (CPE) en la monocapa celular de las células A549, en comparación a las células controles sin infectar (Figura 20).

Sin embargo, HEV no presenta un efecto citopático característico por lo que se confirmó su aislamiento por técnicas moleculares y serológicas.

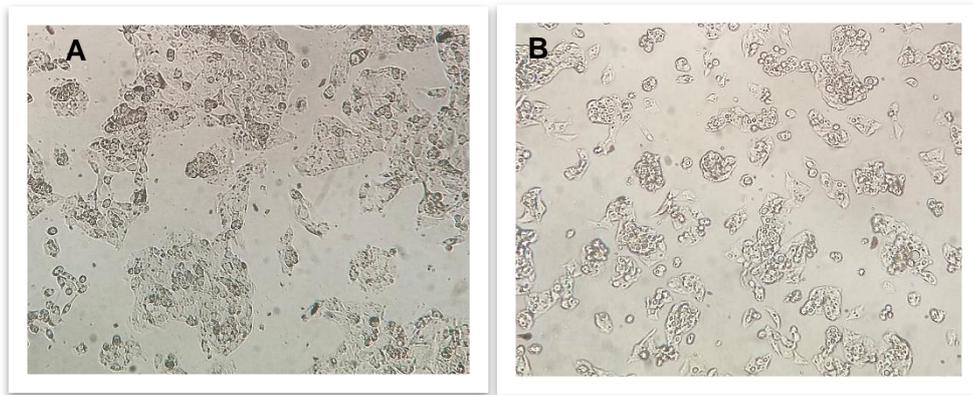


**Figura 20. Imágenes obtenidas del microscopio invertido para la línea celular A549 a un aumento de 10X.**

- A.** Efecto citopático observado en el ppi 22 para las células inoculadas con suero infectado con HEV, donde se visualiza una notoria afectación de la monocapa celular.  
**B.** Células sin infectar.

### ☀ Células HepG2.

Con respecto a la línea celular HepG2, se realizaron 10 pasajes post-infección. No obstante, no se observó un efecto citopático particular (Figura 21). Por lo tanto, también se verificó el aislamiento por métodos moleculares.



**Figura 21. Imágenes obtenidas del microscopio invertido para la línea celular HepG2 a un aumento de 10X.**

**A.** Células infectadas, ppi 4. **B.** Células control sin infectar.

### ☀ Cultivo primario de hepatocitos de rata.

Luego de realizarse la disección de las ratas neonatas (*Rattus rattus*) (Figura 22), a los 4 días post plaqueo de los hepatocitos se observó la adhesión de las células a la placa de cultivo (Figura 23A), obteniéndose a los 8 días efectivamente el cultivo primario, visualizándose una monocapa de células (Fig. 23B). A los 11 días, fue posible apreciar una monocapa 100% confluyente, resultando por lo tanto en un procedimiento exitoso (Fig 23C).

Con respecto a la tinción PAS, se observó una tinción característica de los citoplasmas celulares, indicando la correcta diferenciación de los hepatocitos (Fig. 23D), por lo que fue posible llevar a cabo el procedimiento de aislamiento viral en dichos cultivos primarios.

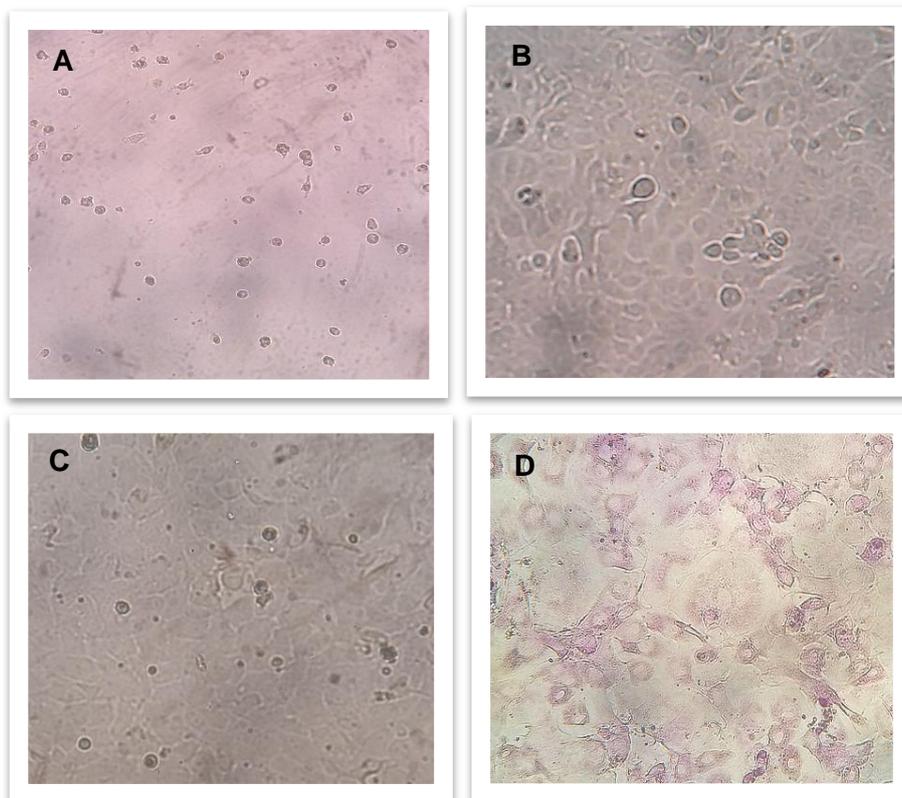
Sin embargo, no se observó efecto citopático alguno en el cultivo primario.



**Figura 22. Obtención de los hígados de rata.**

**A.** Ratitas neonatas (*Rattus rattus*).

**B.** Disección y extracción del hígado.



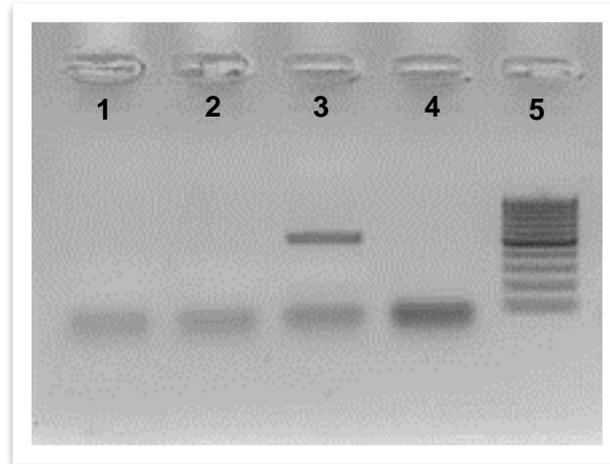
**Figura 23. Imágenes de cultivo primario obtenidas de microscopio óptico (20X).**

**A.** Células adheridas a los 4 días post plaqueo.

**B.** Monocapa celular a los 8 días. **C.** Monocapa confluyente para los 11 días. **D.** Tinción PAS, se aprecian los citoplasmas celulares teñidos de magenta.

## 5.2. Análisis de *Mycoplasma sp.* en cultivos celulares.

En cuanto a la PCR de detección de *Mycoplasma*, no se obtuvo amplificación tanto para las células A549 como para HepG2, observándose exclusivamente un producto de PCR correspondiente a 600 pb para el control positivo incluido en la reacción (Figura 24). Permitiendo por lo tanto, continuar con los posteriores ensayos.



**Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de *Mycoplasma*.**

Se visualiza un fragmento de amplificación de 600 pb.  
**1.** Células A549. **2.** Células HepG2. **3.** Control positivo. **4.** Control negativo. **5.** Marcador de peso molecular 100 pb GeneRuler™ Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®).

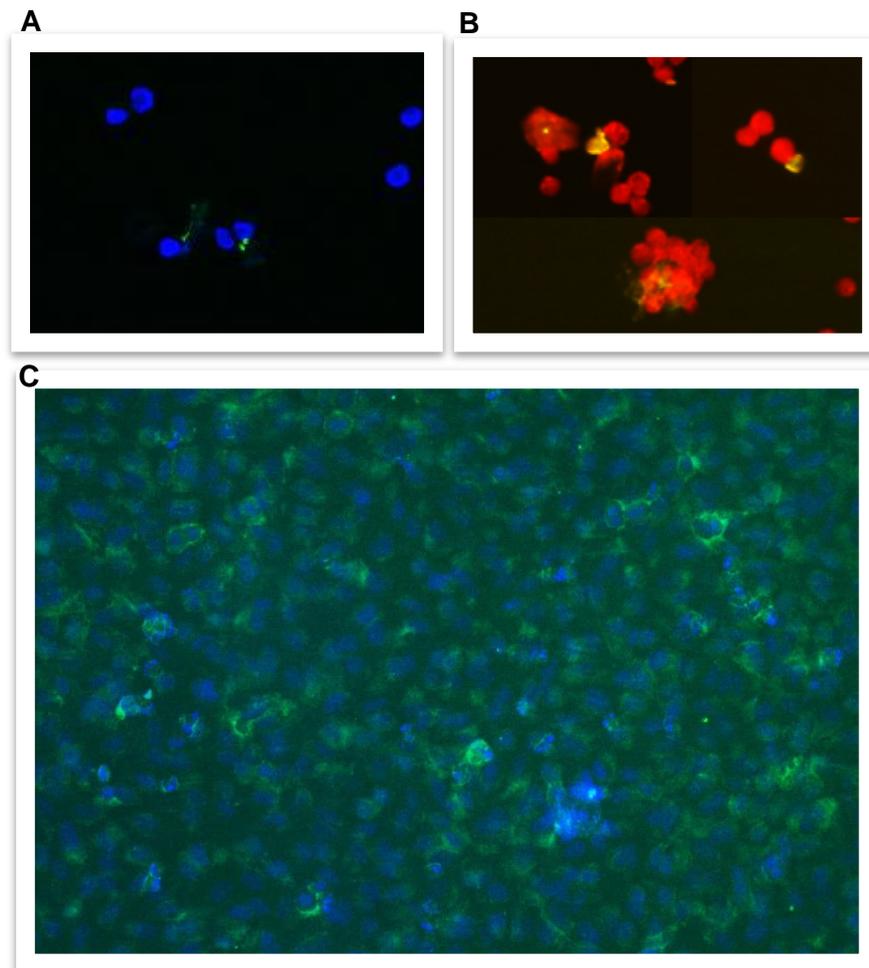
## 5.3. Detección de HEV en los aislamientos virales.

### 5.3.1. Inmunofluorescencia indirecta.

Se llevó a cabo el método de IFI en los aislamientos virales realizados en A549, utilizando un anticuerpo primario monoclonal reconociendo la proteína de cápside de HEV y un anticuerpo secundario IgG H&L conjugado a FITC para el caso de los pasajes celulares 11 y 20, por otro lado, se utilizó un anticuerpo secundario IgG H&L conjugado a Alexa Fluor® 555 para el ppi 15 (Figura 31).

Fue posible evidenciar la presencia de proteínas virales para los tres pasajes analizados, observándose señal correspondiente a FITC (ppi 11 y 20) y a Alexa Fluor® 555 (ppi 15) en el citoplasma celular.

Con respecto a los ppi 11 y 15 la señal fue observada sólo en algunas células (Fig. 31A y B), mientras que para el ppi 20 se visualizó la señal a lo largo de toda la monocapa celular (Fig. 31C), demostrando una mayor síntesis proteica.



**Figura 31. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de HEV (10X) en células A549 infectadas.**

**A.** Merge con DAPI para el ppi 11, se observan en azul los núcleos celulares y en verde la señal del fluoróforo FITC en el citoplasma.

**B.** Tinción con azul de Evans para el ppi 15, se visualizan en rojo las células y en amarillo el fluoróforo Alexa Fluor® 555 en el citoplasma.

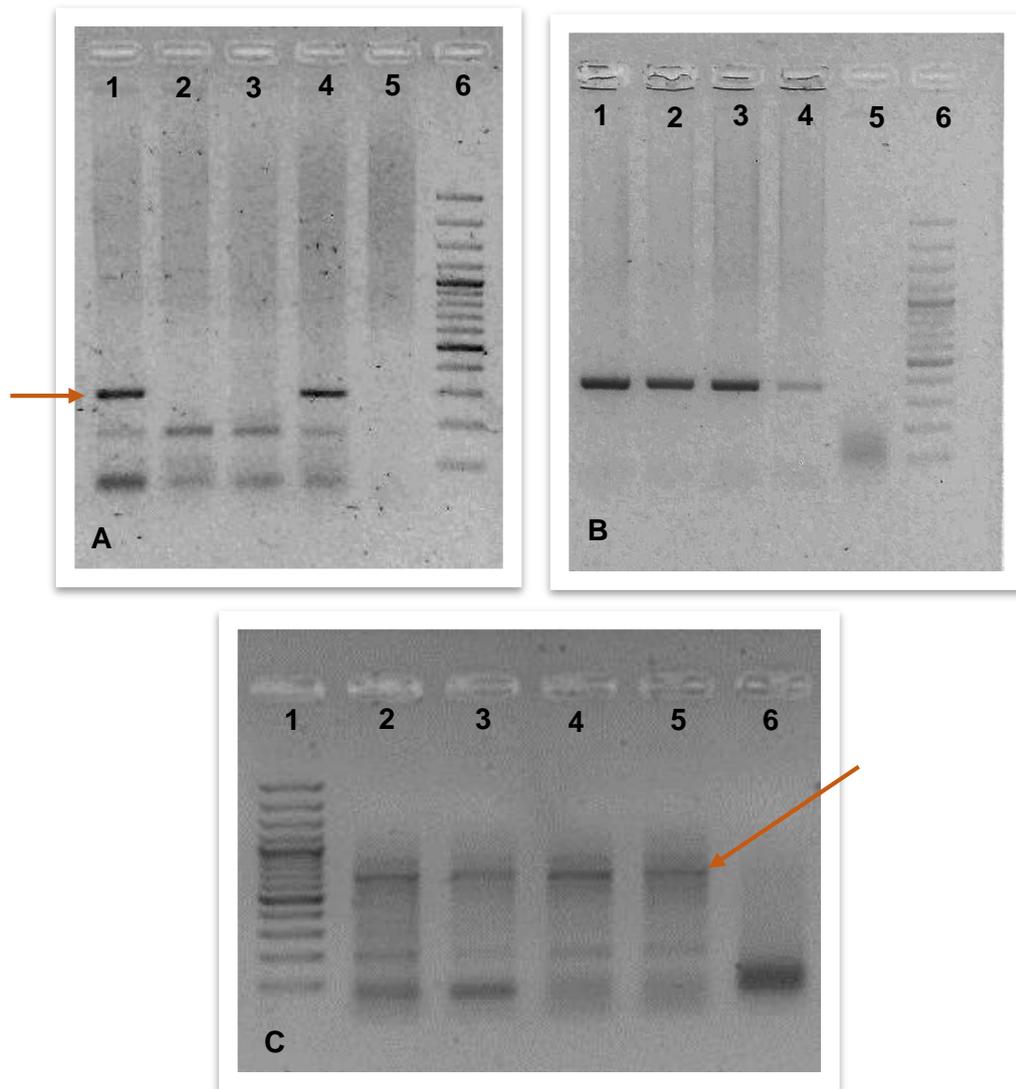
**C.** Merge con DAPI para el ppi 20, apreciándose los núcleos en azul y en verde la señal de FITC en el citoplasma para toda la monocapa celular.

### 5.3.2. RT-nested PCR.

Se llevó a cabo la detección molecular de HEV para analizar los aislamientos virales de la línea celular A549, amplificando tres regiones distintas del genoma viral por RT-nested PCR (Figura 25).

Para el caso de la región metiltransferasa correspondiente al ORF1 (Figura 25A), se obtuvo la amplificación para los cultivos infectados a partir de los sueros S1 y S4, mientras que, para las regiones de cápside de ORF2 (Figura 25B) y replicasa de ORF1 (Figura 25C) se observaron productos de PCR para todos los cultivos infectados con los sueros S1, S2, S3 y S4.

Asimismo, el análisis de las secuencias obtenidas para los fragmentos correspondientes a MT permitió confirmar una alta homología con cepas de HEV. Corroborándose, por consiguiente, el efectivo aislamiento de HEV para esta línea celular.



**Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de las RT-nested PCR en A549.**

Se visualizan los productos de amplificación de los segundos rounds para las 3 regiones MT, CAP y REP de HEV para el ppi 11.

**A.** Fragmentos de 287 pb para MT. 1. Suero S1. 2. S2. 3. S3. 4. S4. 5. Control negativo.

**B.** PCR de CAP, se visualizan los fragmentos de 348 pb. 1. S1. 2. S2. 3. S3. 4. S4. 5. Control negativo.

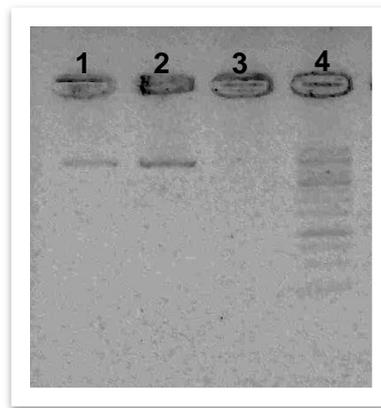
**C.** Productos de PCR de 600 pb para REP. 2. S1. 3. S2. 4. S3. 5. S4. 6. Control negativo. El marcador de peso molecular de 100 pb GeneRuler™ Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®) se observa en los carriles 6 (A, B) y 1 (C).

Las flechas indican el producto de PCR esperado.

### 5.3.3. Obtención de la curva estándar para Real time-RT-PCR.

#### 5.3.3.1. Linealización del vector pJET-ORF2 HEV.

Inmediatamente después de crecer los plásmidos y realizar su extracción, el vector clonado fue linealizado utilizando enzimas de restricción. Las digestiones enzimáticas fueron analizadas mediante una corrida electroforética, donde fue posible comprobar la correcta linealización de los vectores, observándose un único fragmento del tamaño esperado de 5000 pb (Figura 26). Estos resultados permitieron avanzar y llevar a cabo la transcripción *in vitro* de los plásmidos.



**Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pJET 1.2-ORF 2 HEV linealizados.**

Se aprecian bandas correspondientes a 5000 pb.

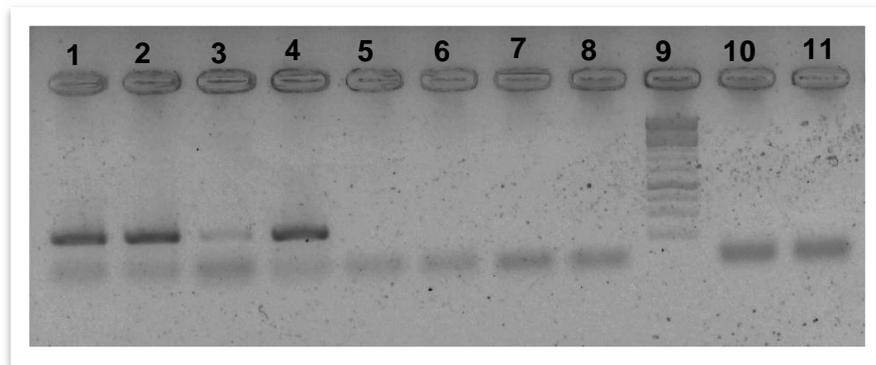
1. Vector 1. 2. Vector 2. 3. Control negativo. 4. Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®).

#### 5.3.3.2. RT-PCR CAP de transcritos.

Se evaluó la transcripción de los fragmentos por medio de RT-PCR y la ausencia de ADN en la reacción a través de una PCR, amplificando la región de la cápside (Figura 27).

Notablemente, se obtuvo una efectiva transcripción de los plásmidos, observándose amplificación para las RT-PCR. Además, se constató la ausencia de ADN plasmídico remanente en las diluciones a utilizar.

Ciertamente, debido a estos resultados obtenidos, los transcritos fueron utilizados para generar la curva estándar.



**Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de las RT-PCR CAP de los transcritos.**

Se aprecian productos de PCR de 348 pb.

1. RT-PCR Vector 1. 2. RT-PCR Vector 2. 3. PCR Vector 1. 4. PCR Vector 2. 5. PCR Vector 1 dil 1/10000. 6. PCR Vector 2 dil 1/10000. 7. PCR Vector 1 dil 1/100000. 8. PCR Vector 2 dil 1/100000. 9. Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific®). 10. Control negativo RT-PCR. 11. Control negativo PCR.

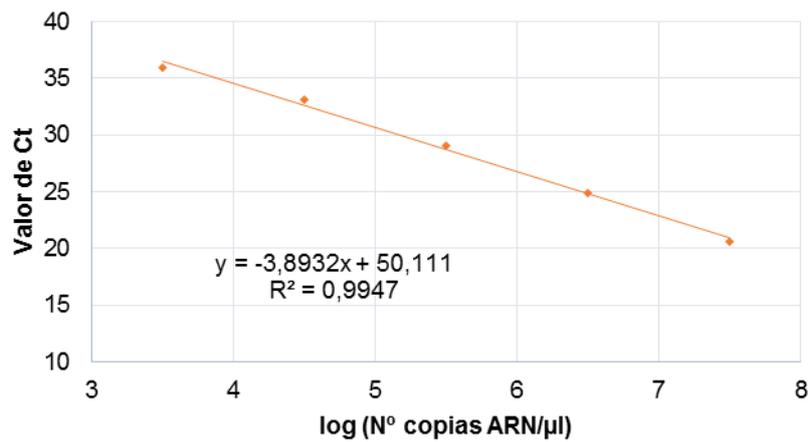
### 5.3.3.3. Curva estándar.

El vector 1 fue el seleccionado para realizar la curva estándar, ya que presentó mayor concentración. A partir de la fórmula detallada en la sección 4.3.5.5 de Materiales y Métodos, se realizó el cálculo del número de copias de ARN por  $\mu\text{l}$ , obteniéndose un valor de  $3 \times 10^{12}$  copias de ARN/ $\mu\text{l}$ . Posteriormente, se realizaron los ensayos de qRT-PCR para las diluciones de la curva de calibración y se graficaron los valores promedio de Ct vs logaritmo del número de copias/ $\mu\text{l}$  (Figura 28), analizándose los resultados obtenidos en base a distintos parámetros (Tabla 9).

En primer lugar, se observó un rango dinámico lineal entre  $3 \times 10^3$ -  $3 \times 10^7$  copias de ARN/ $\mu\text{l}$ , comportándose de forma cuantitativa.

Con respecto a los valores de eficiencia y coeficiente de determinación se obtuvieron valores aceptables de 81% y 0,9947, respectivamente.

Asimismo, el rango para los coeficientes de variación inter ensayo fue de 1,72-6,85 % y de 0,05-1,30 % para los CV intra-ensayo.



**Figura 28. Curva estándar de cuantificación absoluta por Real Time RT-PCR para HEV.**

Se graficó Ct vs log (nº copias ARN/μl), promediándose los valores de Ct entre 3 ensayos independientes con 2 réplicas cada uno. Además, se presenta la ecuación de la recta y el R<sup>2</sup> para la regresión lineal.

**Tabla 9. Parámetros analizados para la curva estándar de qRT-PCR.**

Se calcularon los valores de CV intra e inter ensayo y el porcentaje de eficiencia de la reacción para el rango dinámico 3 X 10<sup>3</sup>- 3 X 10<sup>7</sup> copias de ARN/μl.

Nº copias ARN/μl	CV (%) intra-ensayo	CV (%) inter-ensayo	Eficiencia (%)
3X10 <sup>7</sup>	0,41-1,33	6,82	81
3X10 <sup>6</sup>	0,08-0,37	6,85	
3X10 <sup>5</sup>	0,05-0,80	5,29	
3X10 <sup>4</sup>	0,31-1,03	5,59	
3X10 <sup>3</sup>	0,31-1,30	1,72	

#### 5.3.4. Amplificación por Real Time RT-PCR.

Los distintos pasajes de los aislamientos virales correspondientes a las líneas celulares A549, HepG2 y cultivo primario de hepatocitos fueron analizados por qRT-PCR. Asimismo, se cuantificó el título viral en todos los casos por cuantificación absoluta a través de la curva estándar y se graficó la cinética de replicación viral como el número de copias de ARN/ $\mu$ l para cada pasaje (Figura 29).

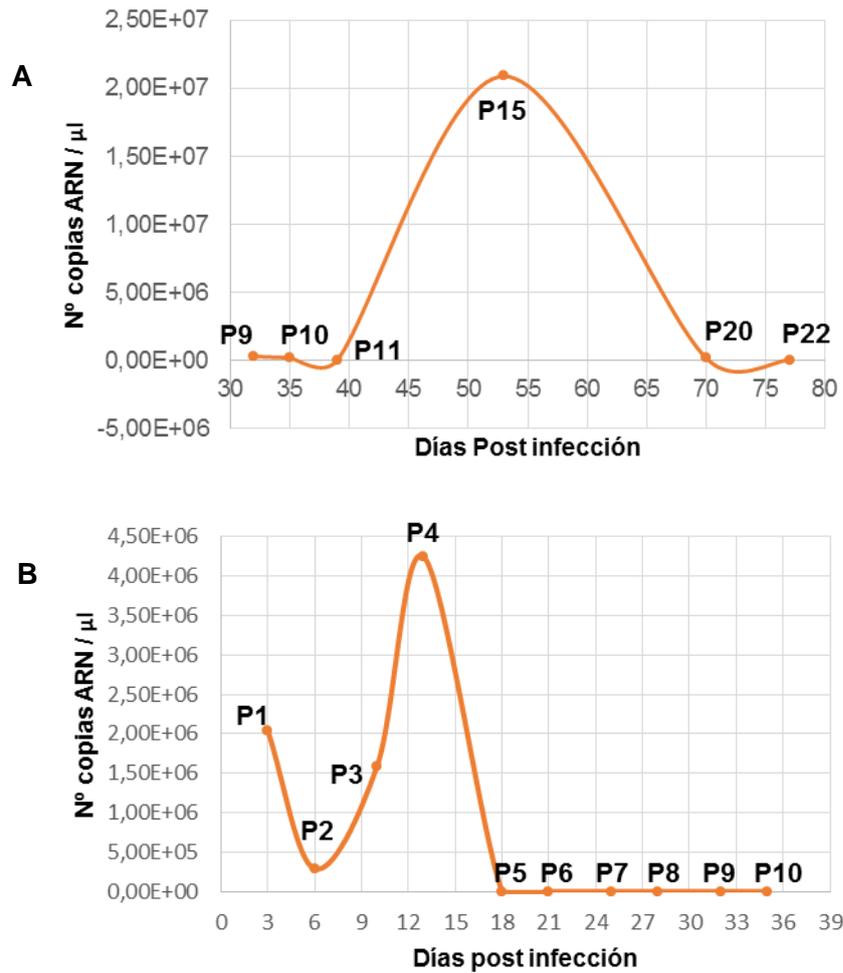
En cuanto a las células A549 infectadas, se amplificó exitosamente la región de solapamiento ORF 2-3 en todos los pasajes testeados (ppi 9, 10, 11, 15, 20 y 22 para S3). A su vez, se observó una disminución en el título viral desde el ppi 9 hacia el 11, continuado por un constante incremento, obteniéndose el máximo valor para el ppi 15, presentando  $2.09 \times 10^7$  número de copias de ARN/ $\mu$ l (indicando el pico de concentración de ARN viral), seguido de un marcado decremento en el número de copias para los restantes pasajes (Figura 29A y Tabla 10).

Con respecto a los aislamientos virales en HepG2, se obtuvo amplificación solamente para los 4 primeros pasajes.

En la cinética de replicación viral, se apreció una distribución similar a la presentada en A549, caracterizada por una disminución del título del ppi 1 al 2, con un concomitante aumento hacia el ppi 4, registrándose en este último, el máximo valor de  $4,24 \times 10^6$  número de copias de ARN/ $\mu$ l (Figura 29B y Tabla 10). Por lo tanto, se comprobó la presencia de ARN de HEV en las células HepG2. Sin embargo, el mayor número de copias alcanzado para HepG2 resultó ser significativamente inferior en comparación a A549.

Por otro lado, no fue posible aislar HEV en los cultivos primarios de hepatocitos de rata, ya que no se detectó ARN viral en los cultivos infectados.

Finalmente, se evaluó la capacidad de reinfección de HEV en las líneas celulares A549 (inoculando con el ppi 15) y HepG2 (inoculando con el ppi 4) a las 48, 72 y 96 horas de post reinfección (Figura 30). No obstante, se observó exclusivamente una amplificación del genoma viral para los cultivos de A549, con una mayor carga viral a las 72 horas ( $1,94 \times 10^6$  número de copias de ARN/ $\mu$ l), decayendo a las 96 horas. Consiguientemente, los cultivos de HepG2 no fueron susceptibles para la reinfección de HEV (datos no mostrados).



**Figura 29. Gráficas de cinética de replicación viral para los cultivos infectados A549 y HepG2.**

Se representan como nº de copias ARN/ $\mu$ l vs días post infección detallando los números de pasajes sobre la curva.

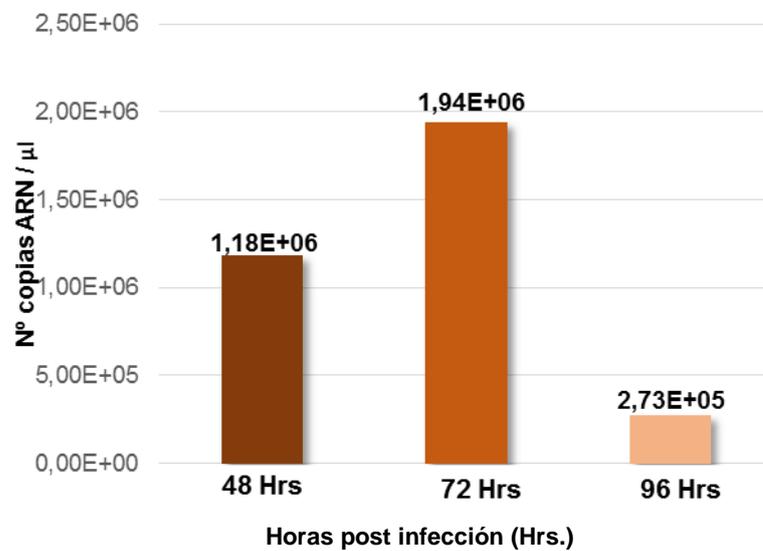
**A.** Carga viral para los cultivos de A549, se observa un pico de número de copias para el ppi 15 de S3.

**B.** Título viral para los cultivos de HepG2, se visualiza un pico de número de copias para el ppi 4.

**Tabla 10. Valores de números de copias ARN/ $\mu$ l para los pasajes de los aislados virales (ppi).**

A la izquierda se detalla la carga viral para A549, y a la derecha para HepG2.

Ppi	Nº copias ARN/ $\mu$ l	Ppi	Nº copias ARN/ $\mu$ l
9	$2,93 \times 10^5$	1	$2,04 \times 10^6$
10	$2,04 \times 10^5$	2	$2,89 \times 10^5$
11	$4,93 \times 10^4$	3	$1,59 \times 10^6$
15	$2,09 \times 10^7$	4	$4,24 \times 10^6$
20	$1,57 \times 10^5$		
22	$2,90 \times 10^4$		



**Figura 30. Gráfica de barras comparativa para la reinfección en las células A549 a las 48, 72 y 96 horas.**

Se presentan los números de copias/ $\mu$ l vs horas post reinfección, observándose la mayor carga viral para las 72 horas.

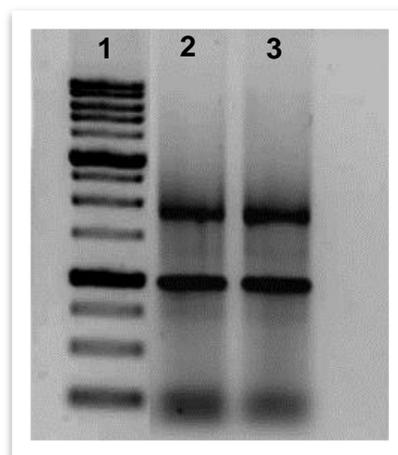
## 5.4. Análisis transcriptómicos.

### 5.4.1. Análisis de integridad del ARN celular.

En primer lugar, con el propósito de verificar la integridad del ARN total previo a realizar las librerías y la secuenciación, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa del ARN total celular extraído para el ppi 11 de A549 y el control de células (Figura 32). Ciertamente, se observaron 2 bandas muy definidas correspondientes a las subunidades 28s y 18s de los ARNr.

Asimismo, se evaluaron los ARN totales a través de un Fragment Analyzer (Figura 33). Se obtuvieron 2 picos para el electroferograma RFU (unidades relativas de fluorescencia) vs tamaño del ARN (en nucleótidos) a 4,5 Kb para el 28s y a 1,9 Kb para el 18s, presentando además como se esperaba, el doble de intensidad para la banda de 28s. Los valores de RIN para las muestras se encontraron entre un rango de 8.2 y 10.

Por lo tanto, se obtuvo ARN total íntegro de alta calidad permitiendo realizar los posteriores ensayos de generación de librerías.



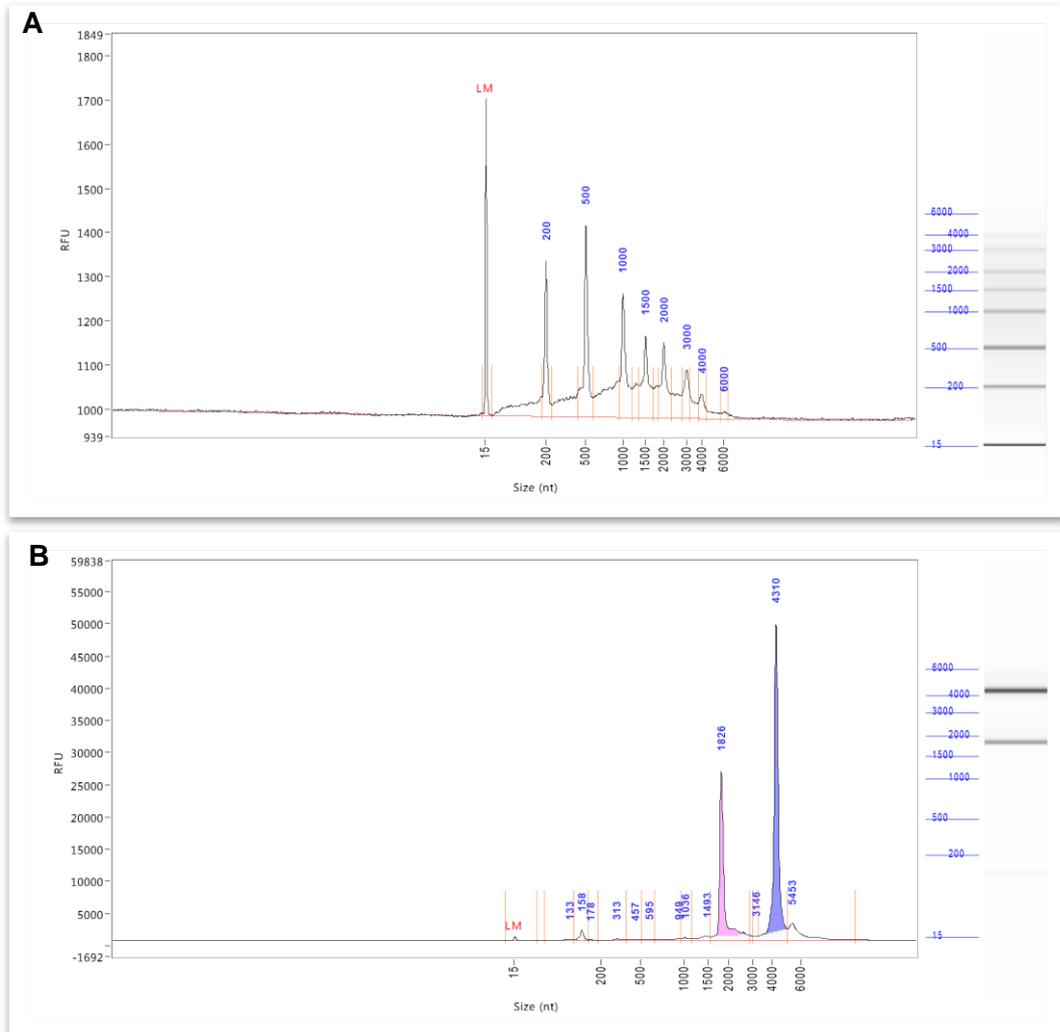
**Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa para los ARN totales celulares de A549.**

Se visualizan 2 bandas nítidas, pertenecientes a las subunidades ribosomales 28s y 18s del ARNr.

1. Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific®).

2. ARN control de células.

3. ARN ppi 11.



**Figura 33. Electroferogramas de Fragment Analyzer para los ARN totales.**

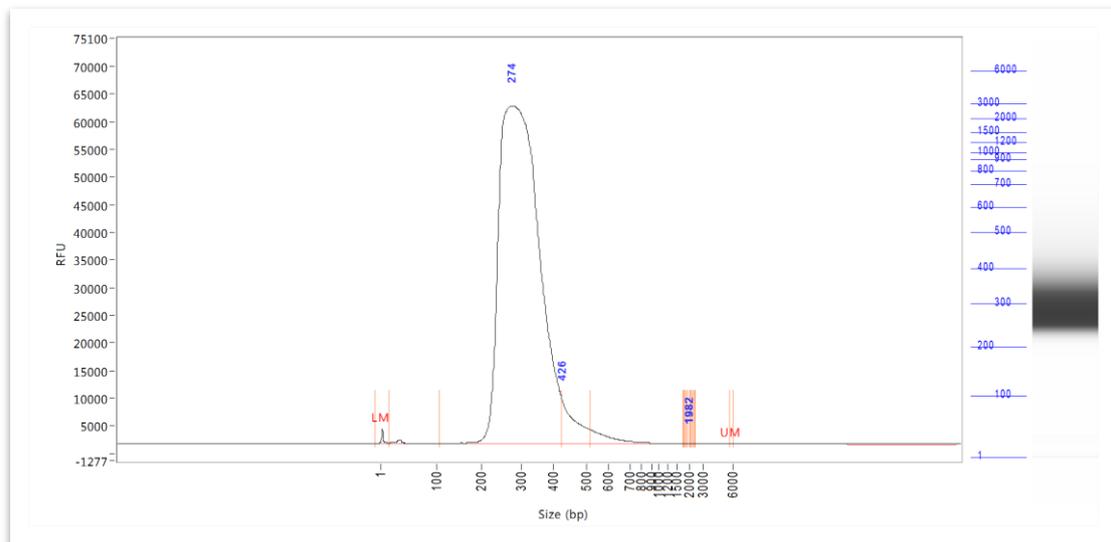
**A.** Gráfico RFU vs tamaño para el marcador ladder de fragment analyzer utilizado de 15-6000 nt.

**B.** Gráfico RFU vs tamaño (nt) para el ARN celular, con el kit DNF 471. Se aprecian 2 picos en el gráfico indicando las subunidades ribosomales 28s y 18s. LM, indica el marcador de tamaño de la corrida (15 nt).

### 5.4.2. Generación de librerías.

Una vez obtenidas las librerías, se verificaron utilizando un Fragment Analyzer (Figura 34).

Se observó para el electroferograma RFU vs tamaño (nt) un pico a 300 nt. De esta forma, se demostró que los productos obtenidos presentaban el tamaño correcto como se especifica en el kit KAPA Stranded mRNA-Seq Illumina® Platforms (Kapa Biosystems).



**Figura 34. Electroferograma para las librerías obtenidas.**

Gráfico RFU vs tamaño (nt) obtenidos por Fragment Analyzer con el kit de alta sensibilidad NGS-HS DNF 474 (1pb -6000 pb). LM, Marcador bajo de la corrida, UM, Marcador alto de la corrida. Se obtuvo un pico a 300 nt en el gráfico, como se indica en el kit utilizado.

### 5.4.3. Análisis bioinformático.

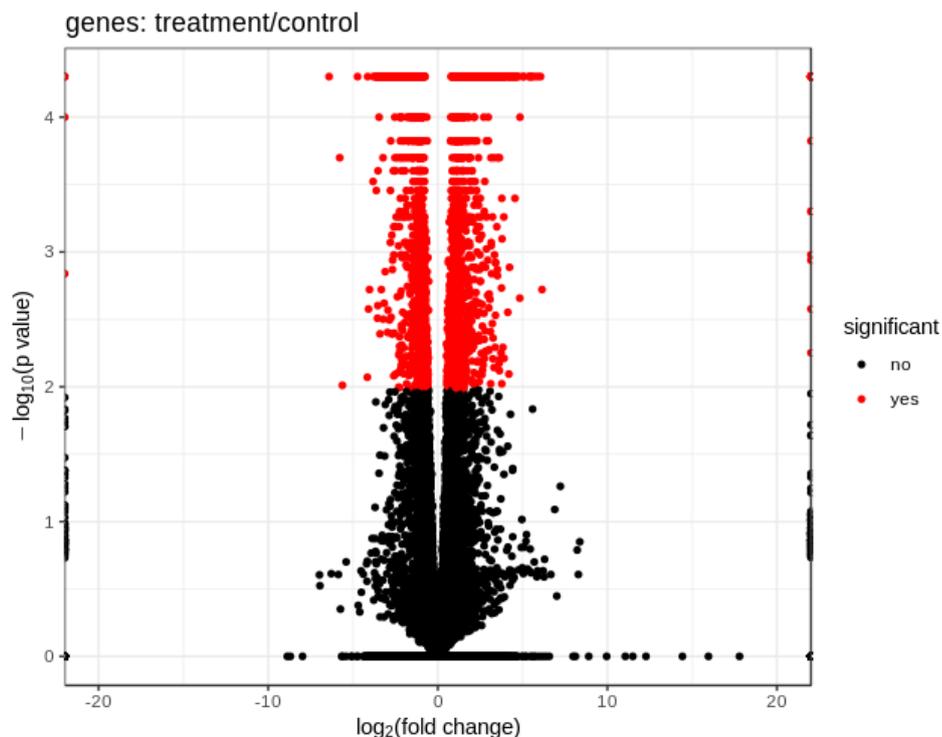
Primeramente, se detalla a continuación (Tabla 11) el número de lecturas crudas obtenidas a partir de la secuenciación masiva, el número de lecturas filtradas luego de aplicado el control de calidad con el software Prinseq y el porcentaje de lecturas filtradas alineadas con respecto al genoma de referencia utilizando el programa TopHat. Destacadamente, fue posible alinear más del 99,5% de las lecturas filtradas.

**Tabla 11. Resultados obtenidos del análisis bioinformático.** Se especifican los números de lecturas crudas, filtradas y alineadas luego de la secuenciación masiva para cada muestra. CC, control de células. S, sueros humanos infectados con HEV.

Muestra	Nº de lecturas crudas	Nº de lecturas filtradas	Porcentaje de lecturas filtradas alineadas
CC1	25.988.507	22.150.947	99,85 %
CC2	27.370.211	23.258.626	99,86 %
S1	21.167.106	18.061.885	99,84 %
S2	22.685.154	19.482.915	99,77 %
S3	22.179.558	18.205.794	99,67 %

Asimismo, el análisis de MDS (Anexo I, Figura 1) reveló que no se presentaron réplicas atípicas provenientes del procedimiento de librerías y/o secuenciación.

Una vez efectuado el procesamiento completo de los datos, se identificaron un total de 60687 transcritos para las células A549, pudiendo realizarse el análisis estadístico con 16840 genes, de los cuáles 2474 presentaron expresión diferencial (DGE) cumpliendo con los criterios estadísticos propuestos  $FDR < 0.05$  y  $(|\log_2(\text{fold change})| > 1)$  (Figura 35), encontrándose 1300 sobre-expresados (DGE-UP) y 1174 sub-expresados (DGE-DOWN) con respecto a la condición control.



**Figura 35. Gráfico de volcán representando el análisis estadístico de los datos.**

Eje X,  $\log_2(\text{fold change tratamiento/control}) \geq 1$  (DGE-UP), o,  $\leq -1$  (DGE-DOWN) y en el eje Y,  $-\log_{10}(\text{p-valor})$ .

Se aprecian en rojo los genes DGE estadísticamente significativos para las células infectadas con respecto al control.

### 5.4.3.1. Ontología de genes (GO).

A continuación, con respecto al análisis de ontología de genes utilizando el software Panther (Mi et al., 2016), en líneas generales se destacan que los genes alterados están involucrados en procesos metabólicos, de regulación biológica, de adhesión biológica y en procesos del sistema inmune.

Particularmente, a través del programa REVIGO (Supek et al., 2011), se obtuvieron 2 gráficos tree maps para las categorías de GO (removiéndose términos redundantes) de DGE total: proceso biológico y función molecular (Figura 36A y B).

Con respecto a los procesos biológicos en los cuales participan las proteínas codificadas por los genes totales con expresión diferencial, se observaron principalmente procesos asociados a la respuesta al estrés del retículo endoplasmático, regulación de autofagia, metabolismo lipídico, catabolismo aminoacídico, procesos celulares de sistemas y muerte celular necrótica (Figura 36A).

Por otra parte, se identificaron las principales funciones moleculares alteradas, encontrándose entre ellas, transporte transmembrana de moléculas inorgánicas, actividad oxido-reductasa, señalización celular y unión a receptor (Figura 36B).

Complementariamente, con el propósito de obtener información sobre la frecuencia de genes diferencialmente expresados correspondientes a las distintas anotaciones funcionales, se empleó el programa DAVID (Huang et al., 2009a), donde cada gen puede estar anotado a uno o más términos.

Mayoritariamente, en cuanto a función molecular, se observó que un 52.1% (1203 genes) de DGE codifican para proteínas de unión. Seguidamente, un 10.7% (248) corresponden a proteínas de unión al ADN, un 10% (231) a proteínas de unión a ATP, un 5.4% (125) se asocian a factores de transcripción y un 5% (124) de las proteínas poseen actividad catalítica.

Asimismo, el 49.2% (1135) del total de DGE codifican para fosfoproteínas y el 55.3% (1277) codifican para proteínas para las cuales existen al menos 2 isoformas debido a eventos de splicing alternativo del pre-ARNm.

Simultáneamente, se visualizaron gráficamente los términos GO enriquecidos para los procesos biológicos de DGE-UP y DGE-DOWN por medio del software REVIGO, indicando el grado de similitud de los términos (Anexo II, Figura 1 y 2). Se observó para los genes sobre-expresados una menor representación de términos en comparación a los genes sub-expresados.

Asimismo, los procesos biológicos modificados implicados a los DGE-UP fueron: metabolismo de aminas, metabolismo lipídico (20), respuesta inflamatoria aguda (30 genes), respuesta al estrés del retículo endoplasmático (24) y muerte celular necrótica. Por otro lado, los procesos biológicos reconocidos para los DGE-DOWN están relacionados al ciclo celular (158 genes), regulación de procesos celulares, metabolismo de ADN, división celular (107), reparación (50 genes) y replicación de ADN (61 genes), organización y segregación de cromosomas (3), organización de microtúbulos del citoesqueleto (16 genes), procesos del sistema respiratorio, procesamiento y presentación de antígenos vía MHC clase II (11 genes), entre otros.

Interesantemente, también se observó una disminución en el proceso biológico de regulación positiva de proliferación celular (44 genes sub-expresados), mientras que se presentó un incremento para el proceso de regulación negativa de la proliferación celular (32 genes sobre-expresados).

Conjuntamente, con respecto al análisis utilizando el software GOrilla (Eden et al., 2009), se representaron los términos GO significativos para DGE total mediante gráficas en estructura DAG (grafo acíclico dirigido), presentando una forma jerárquica en donde cada gen puede estar anotado a uno o más términos en cada ontología (Anexo II, Figura 3, 4 y 5).



**Figura 36. Gráficos *tree map* para los términos GO de los DGE.**

Se observan los términos GO más enriquecidos, dónde cada rectángulo es un sólo cluster representativo, encontrándose agrupados los subtérminos relacionados por similitud semántica ( $\text{SimRel}=0,7$ ) en “superclusters” indicados por el mismo color y un término superpuesto. El área de los rectángulos es proporcional a la significancia de la sobre-representación del término GO ( $-\log_{10} p\text{-valor}$ ).

**A.** Se aprecia la categoría de ontología de proceso biológico para DGE.

Rango de p-valor obtenidos del programa GOrilla:  $1,39 \times 10^{-9} - 9,6 \times 10^{-4}$ .

**B.** Se presenta la categoría de función molecular para DGE.

Rango de p-valores obtenidos del programa GOrilla:  $8,76 \times 10^{-7} - 9,56 \times 10^{-4}$ .

Realizado con el programa REVIGO.

Paralelamente, se analizaron las vías metabólicas y de señalización modificadas empleando el programa Panther (Figura 37).

Respecto a los genes sub- y sobre-expresados, coincidiendo para ambos casos, se observaron principalmente vías correspondientes a señalización de apoptosis, estrés oxidativo, vías de inflamación mediada por citoquinas y quimioquinas, vía de señalización de p53 y vías Wnt.

Asimismo, se reconocieron exclusivamente para los DGE-UP, vías de señalización de interleuquinas, metabolismo y salvataje de pirimidinas, PI3K y p38 MAPK (Figura 37A). En cuanto únicamente a los DGE-DOWN, los procesos metabólicos y de señalización alterados se asocian a la vía de la ubiquitina-proteasoma, regulación del citoesqueleto, ciclo celular, regulación de la transcripción, biosíntesis de purinas y pirimidinas *de novo* y vías de señalización del interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Figura 37B).

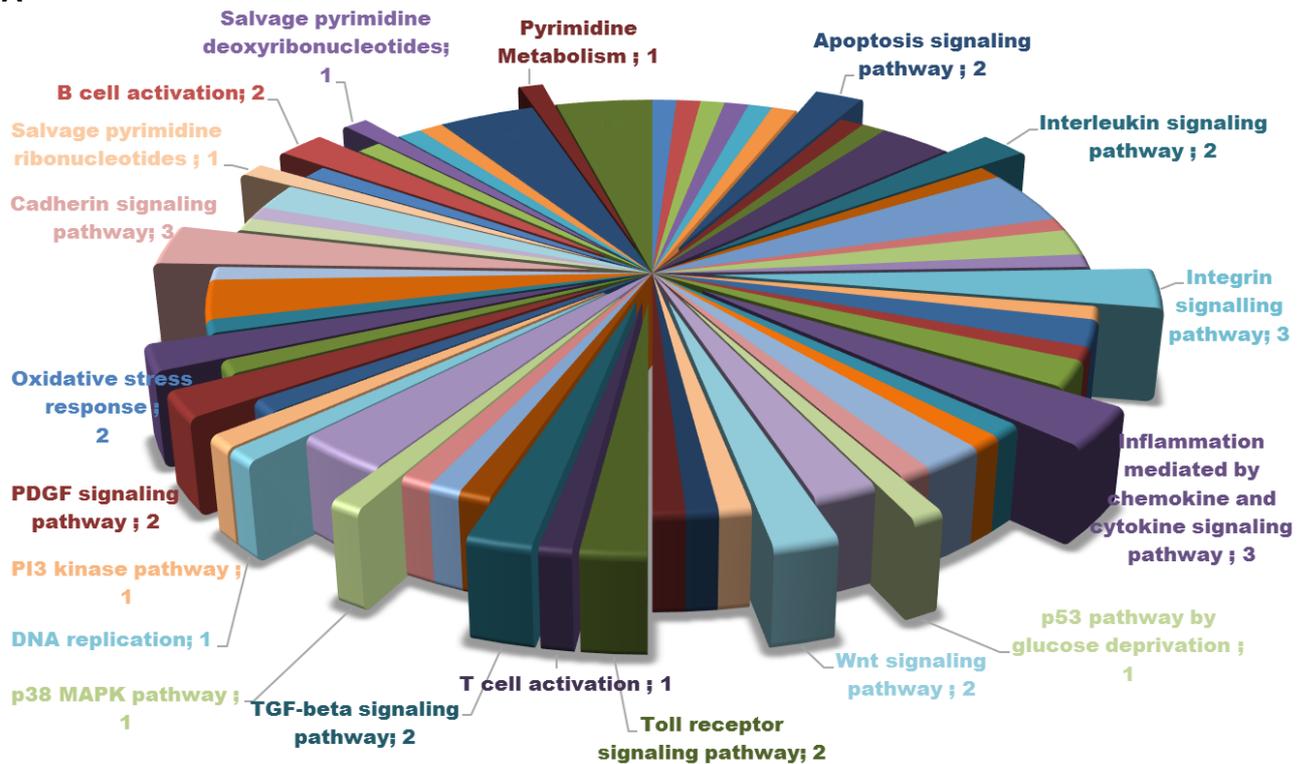
Además, se utilizó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) encontrándose 25 genes sobre-expresados pertenecientes a la vía de procesamiento de proteínas del retículo endoplasmático.

Interesantemente, numerosos genes pertenecientes a la vía de señalización JAK/STAT activados por interferón resultaron alterados; identificándose una sobre-expresión de 2.13, 4.09, 2.12, 4.36 y 4.00 veces para los genes IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , STAT6 (transductor de señal y activador de la transcripción), JAK3 (janus quinasa) e IRF7 (factor de regulación de interferón), respectivamente. Asimismo, se observó una disminución de los genes SOCS3 (perteneciente a la vía del INF- $\gamma$ ) y SOCS2 (ambos supresores de señalización por citoquinas que regulan negativamente la vía JAK/STAT), presentando una expresión de un 23% y 38%, respectivamente.

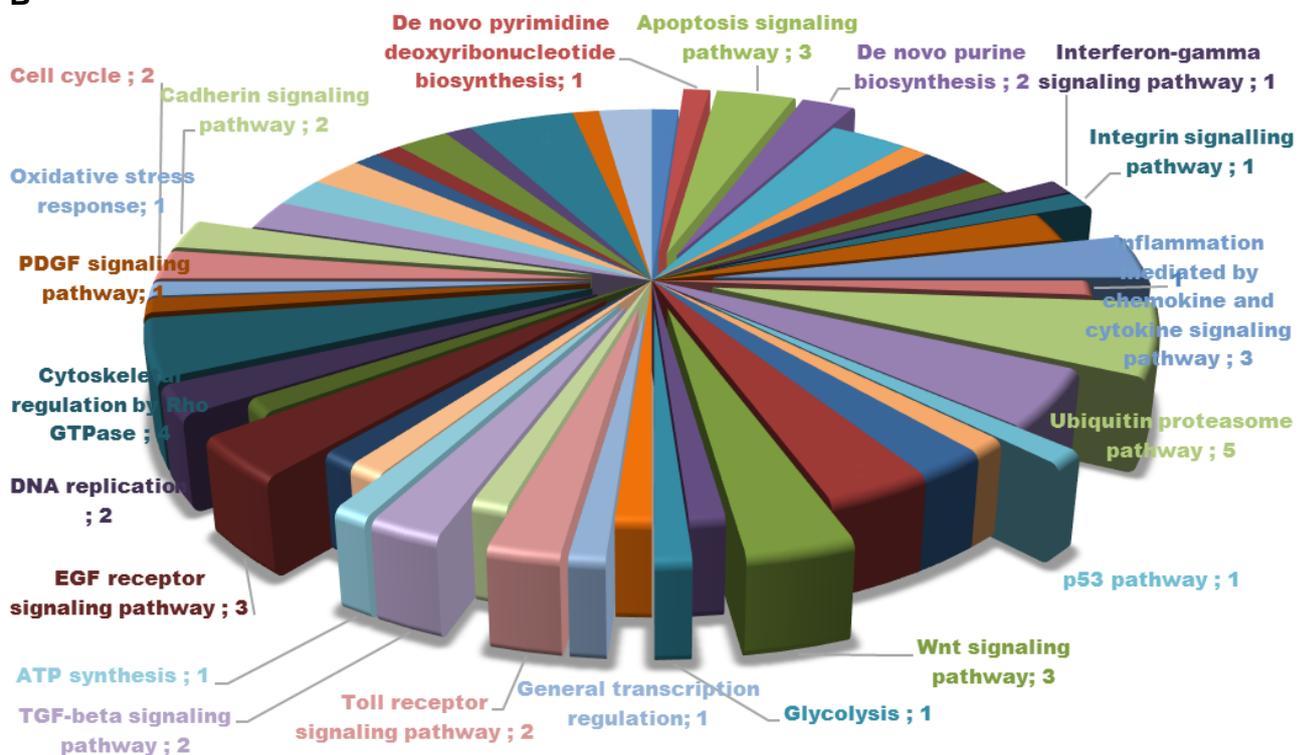
Por otra parte, en el Anexo III (Tablas 1 y 2) se detallan las listas de los 10 genes con mayor sobre- y sub-expresión para las células A549 infectadas. Destacándose significativamente, los genes SNTB1 (Sintrofina) y SCIN (Scinderina), los cuales se expresan 71 y 67 veces más, respectivamente, con respecto al control sin infectar.

Contrariamente, los genes BCL2A1 (Proteína BCL2) y BMPER (Proteína reguladora endotelial-BMP) exhibieron una expresión notablemente disminuida, expresándose solamente en un 3,7% y 5,5%, respectivamente, en comparación al control sin infectar.

A



B



**Figura 37. Gráficos circulares de las vías metabólicas afectadas por los DGE.**

**A.** Se indican para los DGE-UP las vías metabólicas involucradas más relevantes.

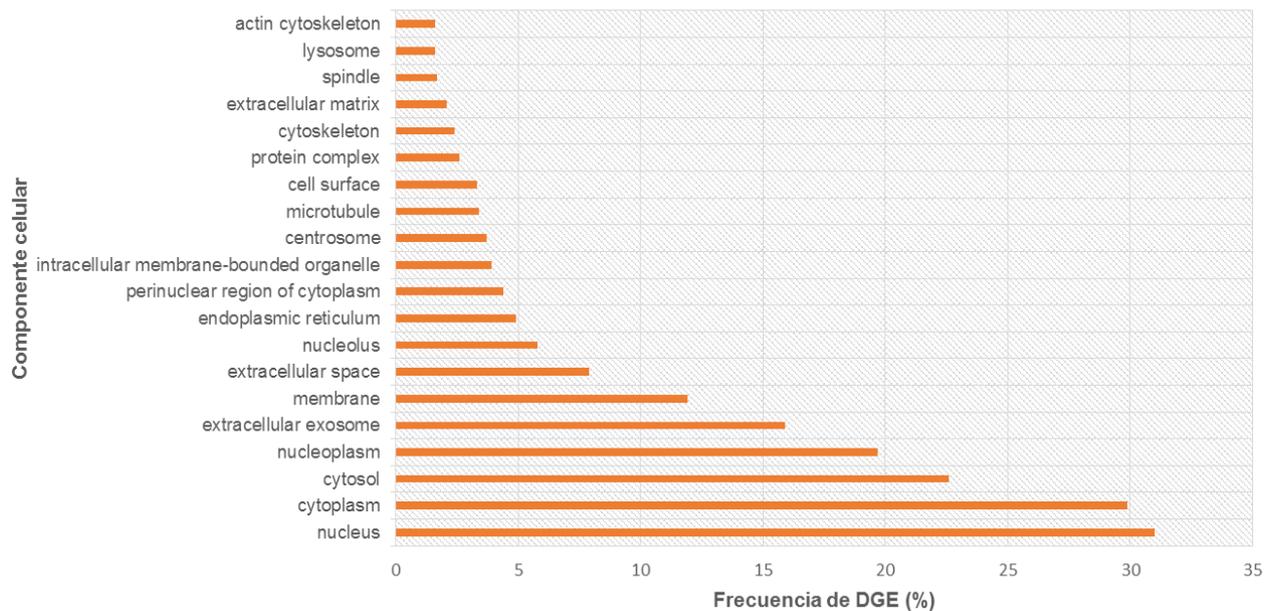
**B.** Se representan para los DGE-DOWN las vías metabólicas involucradas más destacadas.

En ambos casos se muestra el número de DGE pertenecientes a cada vía metabólica seleccionada.

Realizado con el programa Panther.

Nota: Las gráficas obtenidas son con respecto al total de genes que fueron identificados por el programa Panther.

Por otro lado, por medio del programa DAVID, se observó principalmente que el 31% (715) de las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados se localizan en el núcleo celular, seguido por un 29.9% (689) de proteínas localizadas en el citoplasma (Figura 38).



**Figura 38. Gráfico de barras de los términos GO-componente celular para los genes diferencialmente expresados.**

Se representa el componente celular con respecto a la frecuencia de DGE.

Se detalla el porcentaje de DGE identificados para cada componente celular. Se muestran solo las anotaciones con mayor porcentaje. Rango de p-valor:  $7,0 \times 10^{-8}$  –  $1,2 \times 10^{-2}$ .

GO y p-valores obtenidos del programa DAVID.

## 5.5. Análisis proteómicos.

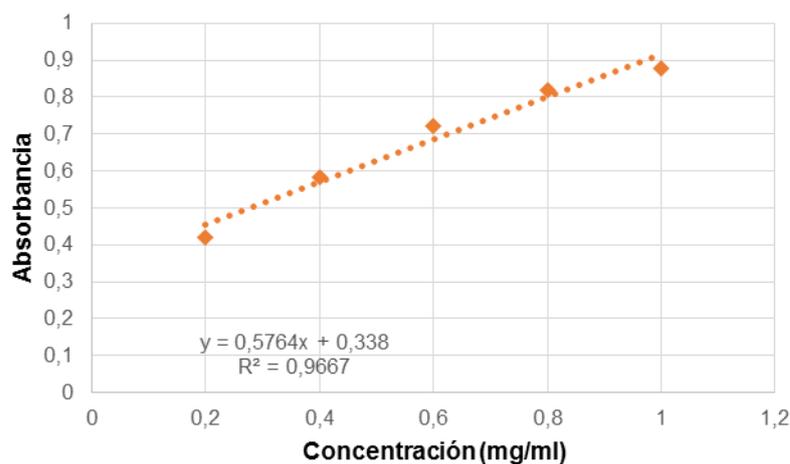
### 5.5.1. Cuantificación de proteínas por Bradford.

Primeramente, se obtuvo la curva de calibración Absorbancia vs Concentración (mg/ml) para el rango de 0.2-1 mg/ml (Figura 39).

A continuación, se interpolaron del gráfico los valores de las concentraciones para las distintas condiciones de lisis realizadas en las células A549 (Figura 40). Las diluciones que se encontraron dentro del rango de concentraciones de la curva estándar, permitiendo ser interpoladas, fueron al medio y al quinto para los casos de lisis por congelado-descongelado y por detergente (buffer de lisis). Asimismo, en el caso de lisis mediante sonicación fue posible calcular la concentración solamente para la muestra sin dilución. Sin embargo, para el caso de la lisis por calor, no se logró determinar la concentración ya que los valores de absorbancia resultaron ser muy inferiores al valor límite de la curva de calibración.

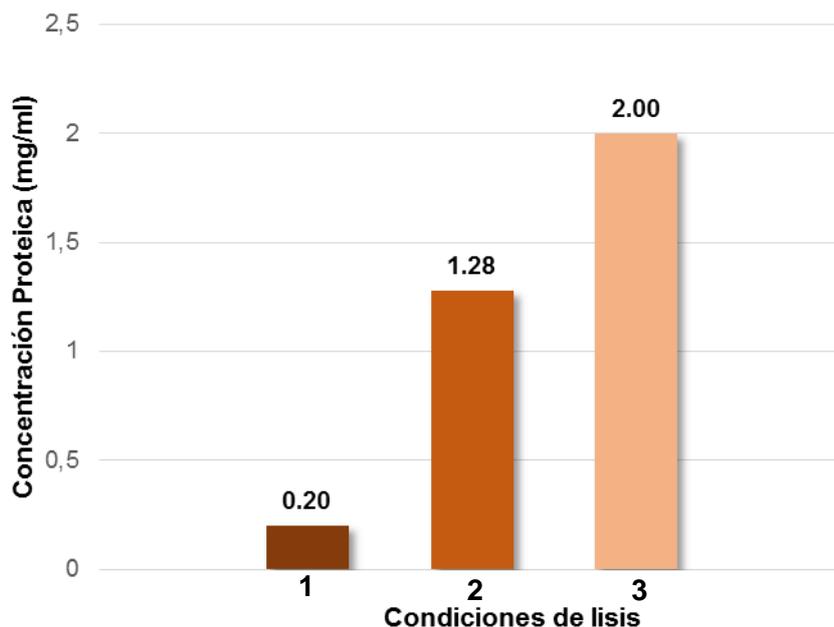
Con respecto a la lisis mecánica mediante tres rondas de congelado-descongelado en nitrógeno líquido, se obtuvo una concentración de 1.28 mg/ml. En cambio, en cuanto a la lisis realizada a través de sonicación por 72 segundos a 38% de potencia, se obtuvo un valor de 0.20 mg/ml. Por otro lado, utilizando buffer de lisis se alcanzó un valor de 2.00 mg/ml.

Por lo tanto, la lisis celular utilizando buffer de lisis fue la condición que exhibió mayor concentración proteica.



**Figura 39. Curva de calibración Absorbancia (595 nm) vs Concentración proteica (mg/ml).**

Se obtuvo el gráfico para el estándar BSA utilizando el método de Bradford. Se presentan la ecuación de la recta y el  $R^2$  para la regresión lineal.



**Figura 40. Gráfica de barras comparativa para las distintas condiciones de lisis celular en A549.**

Se presenta la concentración proteica en mg/ml para cada condición, observándose la mayor concentración para el caso 3.

1. Lisis mecánica mediante sonicación por 72 segundos a 38% de potencia.
2. Lisis mecánica por 3 rondas de congelado-descongelado en N<sub>2</sub> líquido.
3. Lisis utilizando buffer de lisis.

### 5.5.2. SDS-PAGE.

Subsiguientemente, los lisados celulares obtenidos fueron verificados mediante un SDS-PAGE (Figura 41).

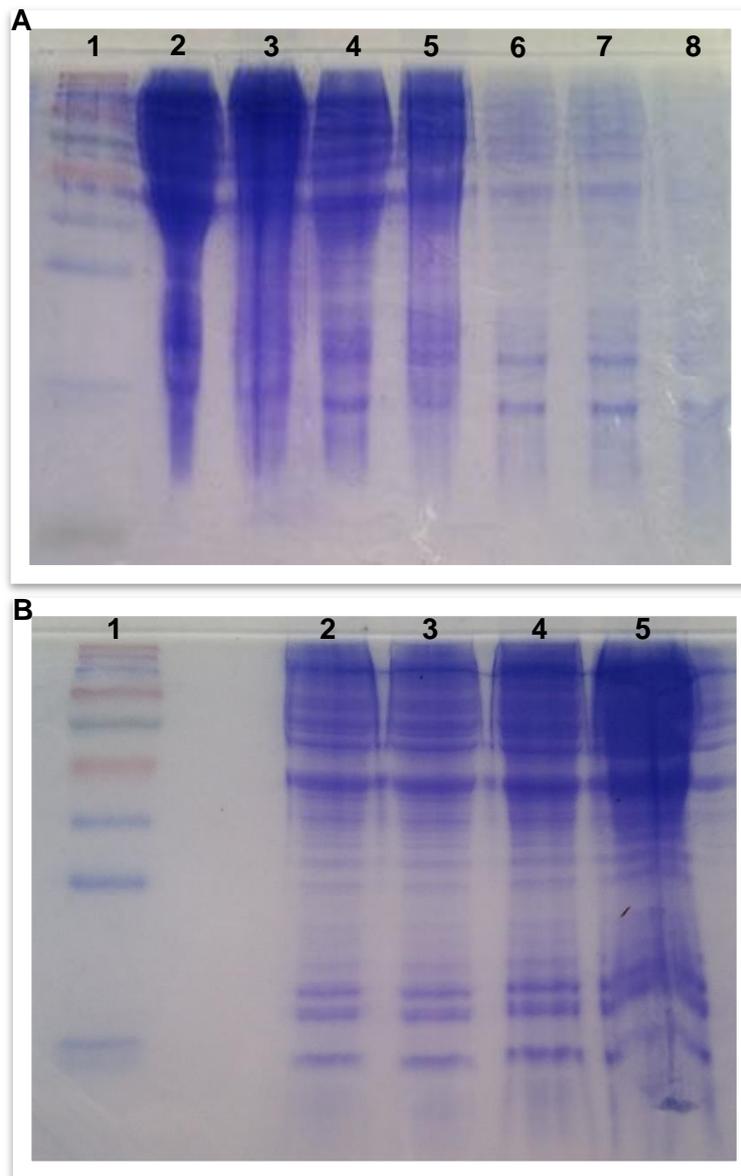
Con respecto a los lisados por métodos mecánicos (Figura 41A), se observó una lisis más efectiva para el caso del congelado-descongelado en nitrógeno líquido. Precisamente, fue posible apreciar la presencia de bandas a distintas alturas para los 10 µg de proteínas, mientras que para 20 µg se visualizó un exceso de concentración proteica impidiendo la distinción de las bandas.

Paralelamente, en cuanto a la lisis por sonicación se observaron bandas pero de muy baja intensidad en comparación a las demás condiciones. Asimismo, no se visualizaron bandas para la lisis mediante calor.

En todos los casos se obtuvieron mejores resultados para las muestras sin calentar.

Por otro lado, para la lisis utilizando un buffer apropiado con detergente (Figura 41B) se identificaron mayor número de bandas, con mayor nitidez y definición en comparación a los métodos exclusivamente mecánicos. No obstante, se apreció un exceso de concentración para los 20 µg, dificultando su correcta visualización, al igual que en el caso del congelado-descongelado.

Indudablemente, el método empleando el buffer de lisis resultó ser el más apropiado y efectivo para la lisis de células eucariotas A549.



**Figura 41. SDS-PAGE al 12% comparando las diferentes condiciones de lisis para las células A549.**

**A.** Lisis por métodos mecánicos. **2.** Congelado-descongelado en N<sub>2</sub> líquido, 20 µg de proteínas sin calentar la muestra. **3.** Congelado-descongelado, 20 µg de proteínas, muestra calentada. **4.** Congelado-descongelado, 10 µg de proteínas sin calentar. **5.** Congelado-descongelado, 10 µg de proteínas, muestra calentada. **6.** Sonicado, 4 µg de proteínas, sin calentar. **7.** Sonicado, 4 µg de proteínas, muestra calentada. **8.** Lisis por calor.

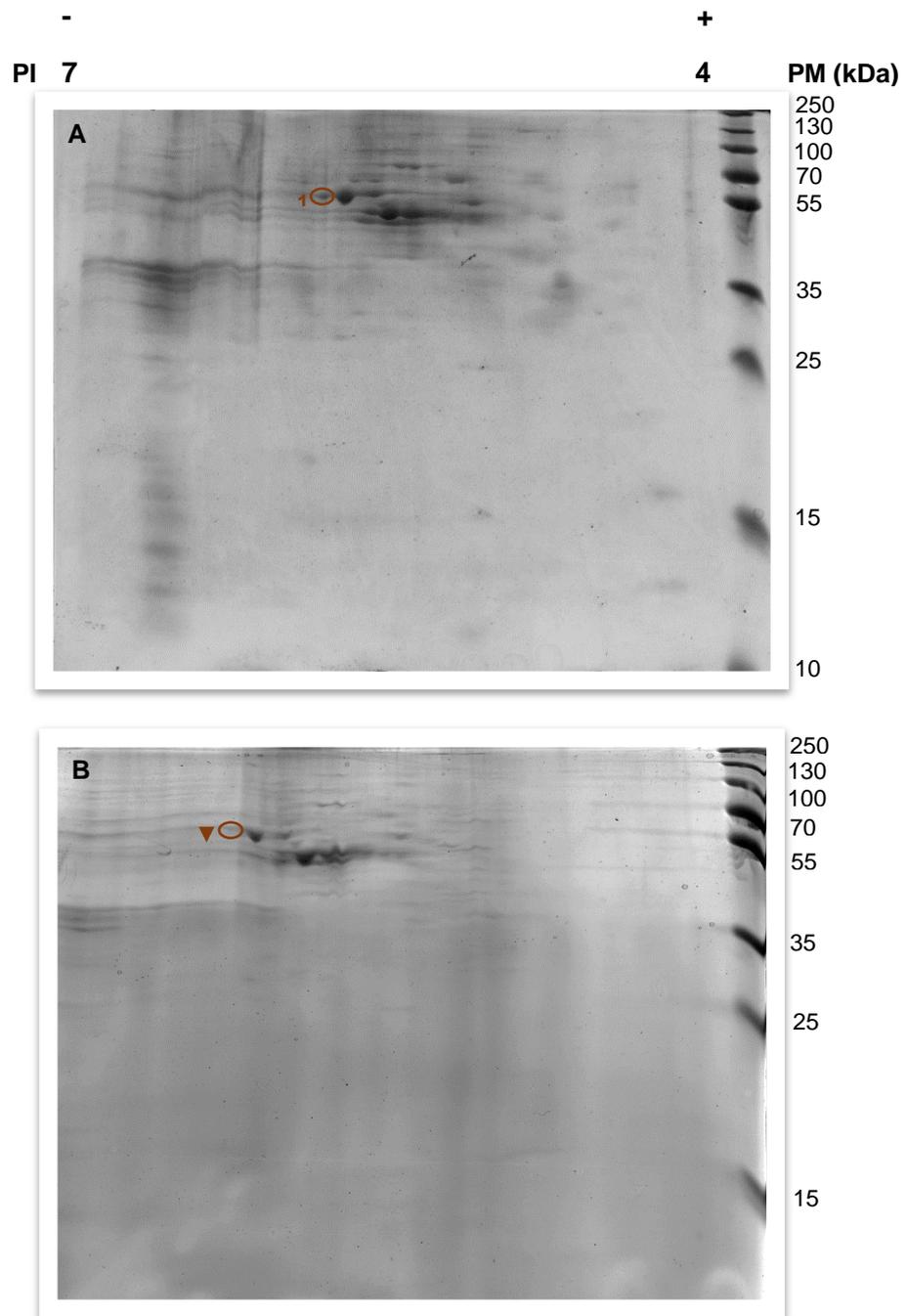
**B.** Lisis por buffer de lisis. **2.** 4 µg de proteínas. **3.** 5 µg de proteínas. **4.** 10 µg de proteínas. **5.** 20 µg de proteínas.

El marcador de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific®) se observa en el carril 1 para ambos casos.

### 5.5.3. Electroforesis bidimensional.

Posteriormente, una vez definido el método de lisis celular, con el propósito de comparar los perfiles de expresión proteica entre las células A549 infectadas con HEV y sin infectar, se procedió a optimizar el protocolo de isoelectroenfoque y electroforesis bidimensional. Se utilizaron tiras de gradiente de pH 4-7 de 13 cm para la primera dimensión y luego, las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE 10 % para la segunda dimensión.

En los geles bidimensionales se reconocieron varios spots definidos (Figura 42), observándose perfiles de proteínas mayormente conservados entre ambas condiciones. Sin embargo, fue posible detectar un spot diferencial sub-expresado en las células infectadas.



**Figura 42. Electroforesis bidimensional de las proteínas totales de las células A549.**

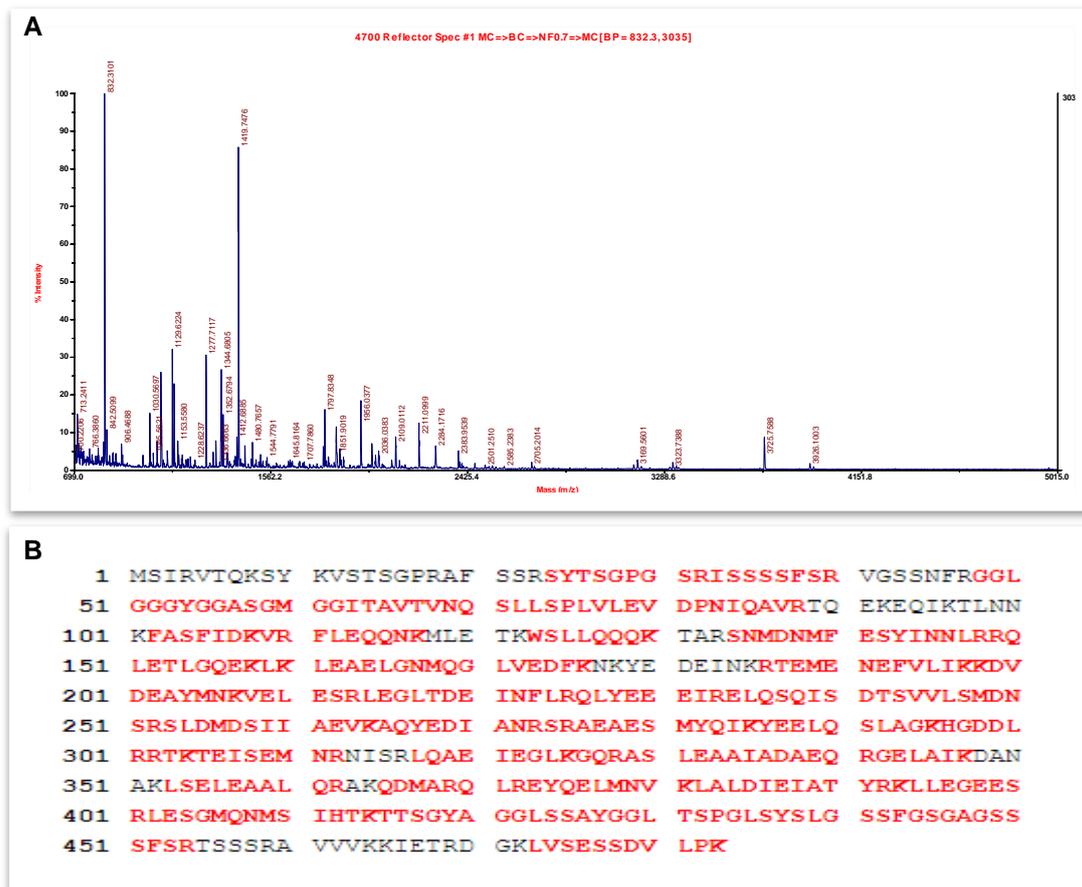
Se especifican el gradiente de pH 4-7 y el peso molecular (PM) para cada banda del marcador PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific®).

**A.** Células A549 control sin infectar, se indica el spot 1 diferencialmente expresado e identificado por un círculo.

**B.** Células A549 infectadas con HEV, se muestra con un círculo el spot 1 sub-expresado, representado por un triángulo descendente.

### 5.5.4. Espectrometría de masa.

La proteína fue identificada mediante espectrometría de masa MALDI/TOF-TOF (Figura 43) como queratina humana K8 (keratin, type II cytoskeletal 8 isoform 2 [Homo sapiens]) utilizando el motor de búsqueda Mascot, con un 81% de cobertura de secuencia y un score estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabla 12). Asimismo, el valor de pI y masa molecular obtenidos se corresponden al resultado visualizado para dicho spot en el gel bidimensional SDS-PAGE.



**Figura 43. Resultado del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para el spot 1.**

**A.** Espectro de masa (porcentaje de intensidad vs m/z) de los péptidos trípticos obtenidos a partir del spot 1.

**B.** Se muestran la asignación de los valores m/z a péptidos de la secuencia de la proteína K8, mediante el motor de búsqueda Mascot. En rojo se representan los péptidos identificados, con una cobertura de secuencia del 81%.

**Tabla 12. Identificación de proteína celular por MALDI-TOF/TOF diferencialmente expresada en células A549 infectadas por HEV.**

Nº spot en el gel	Proteína	Cobertura de secuencia	Score de proteína	p-valor	pl teórico	Masa molecular teórica	Nº acceso NCBI
1	keratin, type II cytoskeletal 8 isoform 2 [Homo sapiens] ▼	81%	74	0.0064	5.52	54 KDa	NP_002264.1

Nota: El triángulo negro descendente indica que la proteína se encuentra sub-expresada en células A549 infectadas.

## 6. DISCUSIÓN

En la actualidad, HEV es reconocido como una importante causa de hepatitis viral aguda mundialmente, siendo la principal en regiones endémicas (Guerra et al., 2017).

Particularmente, en los países industrializados se ha registrado en los últimos años un aumento drástico en el número de casos autóctonos, identificándose como HEV3, principalmente transmitido por vía zoonótica a partir del consumo de carne de cerdo insuficientemente cocida o cocinada a baja temperatura (Li et al., 2005b; Colson et al., 2010; Lewis et al., 2010; Miyamura et al., 2011); habiéndose detectado recientemente cepas de HEV en cerdos nacionales (Mirazo et al., 2018).

En Uruguay, el consumo de carne de cerdo por habitante ha crecido un 54% entre los años 2009-2014, representando un 15% del consumo total de carnes. Asimismo, el 70,9% de la carne de cerdo que se consume en el mercado interno procede del exterior (DIEA-MGAP, 2014; INAC, 2014), sugiriendo que la transmisión zoonótica a partir de reservorios animales mamíferos (particularmente el cerdo) juega un rol importante en la diseminación de HEV en regiones no endémicas como América del Sur. Si bien han transcurrido más de dos décadas desde el descubrimiento y secuenciación del genoma completo de HEV, el conocimiento de este virus respecto a su ciclo viral y patogenia es aún limitado.

Recientemente, las perspectivas de las investigaciones sobre HEV han cambiado drásticamente a raíz de los últimos hallazgos en el área. Actualmente, los estudios se han centrado en comprender la biología viral y caracterizar la respuesta inmune del hospedero durante la infección (Nan et al., 2017).

Además, el creciente número de casos clínicos de HEV3 reportados en nuestro país, hace necesario profundizar en el estudio de este virus emergente.

Precisamente, en el presente trabajo se implementaron por primera vez a nivel mundial estudios transcriptómicos y proteómicos sobre la replicación *in vitro* de HEV3, analizando los cambios moleculares inducidos en las células A549.

Hasta el momento, no existen antecedentes en la literatura que describan el análisis transcriptómico en células A549 infectadas con HEV3 humano, por lo que este estudio prueba ser pionero.

Asimismo, no se han reportado estudios proteómicos en células A549 infectadas con HEV3 humano, por lo que este análisis también resulta ser novedoso. En primer lugar, se aisló HEV *in vitro* exitosamente a partir de tres sueros humanos infectados con HEV3 en células A549, observándose un claro efecto citopático en las monocapas celulares para dos de los sueros utilizados, luego de 22 pasajes seriados post-infección (ppi). Estos resultados concuerdan con lo observado por Zhang et al., 2011.

La evidencia respaldando estos resultados proviene de estudios, donde se demostró que el desarrollo del CPE depende del título viral, mientras que la replicación del virus en cultivo no depende de este factor (Dzagurov et al., 1997).

Asimismo, fue posible llevar a cabo el aislamiento de HEV en células HepG2, si bien, los cultivos no presentaron efecto citopático. Precisamente, se ha propuesto además, que la ocurrencia del CPE pueda estar principalmente relacionado al sistema de cultivo *in vitro* empleado (Huang et al., 1999).

Adicionalmente, fue posible desarrollar y llevar a cabo exitosamente una curva de

calibración para la cuantificación del ARN viral por medio de una Real Time RT-PCR. Paralelamente, con respecto a la cinética de replicación viral por qRT-PCR en las células A549 y HepG2 infectadas, en términos comparativos, ambas exhibieron un comportamiento análogo al presentar un progresivo incremento en el número de copias de ARN/ $\mu\text{l}$  hacia el ppi con mayor título viral (ppi 15 y 4, respectivamente) debido a la constante replicación del ARN viral; finalizando con un descenso gradual hasta los ppi analizados, pudiendo explicarse por la etapa de síntesis de proteínas virales y con siguiente ensamblaje y producción de viriones. Asimismo, se ha reportado que ciertas mutaciones en el genoma viral son necesarias para la adaptación al cultivo celular (Johns et al., 2014), por lo tanto, es posible que estas cepas virales no se encuentren adaptadas al crecimiento *in vitro*.

Cabe destacar también, que se obtuvo un mayor título viral para la infección en las células A549 ( $2,09 \times 10^7$  n° copias ARN/ $\mu\text{l}$ ).

Por otro lado, se analizó la capacidad de reinfección de HEV en los 2 sistemas de cultivos celulares. En el caso de A549, fue posible detectar una reinfección, observándose a las 72 horas el mayor título viral.

Acorde a lo expuesto anteriormente, A549 representó ser una línea celular más adecuada para el aislamiento de HEV3.

En contraposición, el sistema de aislamiento en HepG2 no demostró ser estable ni eficiente, ya que no se obtuvo reinfección viral en los cultivos y el título viral alcanzado en los cultivos infectados resultó ser marcadamente inferior ( $4,24 \times 10^6$  n° copias ARN/ $\mu\text{l}$ ).

Conjuntamente, fue posible obtener con éxito cultivos primarios de hepatocitos de rata neonata (*Rattus Rattus*), sin embargo, no se detectaron en los cultivos ARN viral de HEV en lo absoluto. Por lo tanto, se comprobó que los hepatocitos de rata no son susceptibles a la infección por HEV3. Asimismo, estudios *in vivo* en ratas tampoco han demostrado susceptibilidad a la infección por HEV humano (Li et al., 2008; Huang et al., 2009b; Purcell et al., 2011; Li et al., 2013a; 2013b).

Previos estudios sugieren un rol crucial de la respuesta inmune mediada por células en la patogénesis de la infección por HEV (Prabhu et al., 2011). No obstante, la interacción patógeno-hospedero comienza antes de que el mecanismo de defensa adquirida se desencadene. Por consiguiente, es importante comprender la respuesta inicial del hospedero que pueda llegar a modificar el curso de la infección. De esta manera, para un mejor entendimiento de los cambios inmediatos que ocurren luego de la infección, en ausencia de factores externos modificadores de la respuesta, es necesario llevar a cabo un análisis transcriptómico *in vitro* (Jagya et al., 2014).

Notablemente, en los análisis transcriptómicos llevados adelante en esta tesis, se identificaron 2474 genes con expresión diferencial estadísticamente significativa, de los cuales 1300 corresponden a genes sobre-expresados y 1174 a genes sub-expresados. Complementariamente, el análisis de ontología de genes reveló que los principales procesos biológicos alterados están asociados a la respuesta al estrés del retículo endoplasmático, regulación de autofagia, catabolismo aminoacídico, metabolismo lipídico y muerte celular necrótica. Asimismo, el proceso de necrosis celular se encontró aumentado, igualmente, se identificó una disminución en la regulación positiva del proceso de proliferación celular y un incremento en la regulación negativa de la proliferación.

Estos resultados obtenidos se corresponden ampliamente a lo divulgado por otros investigadores, donde se observó la desregulación de genes involucrados en el

metabolismo lipídico y de apoptosis celular (Jagya et al., 2014; Xu et al., 2016a), (en análisis implicando la transfección de un clon de genoma completo HEV1 en células Huh-7 y en la transfección de un vector recombinante con ORF3 porcino en células HepG2).

Al mismo tiempo, los procesos modificados de catabolismo aminoacídico y metabolismo de aminos, se relacionan congruentemente a lo obtenido por Jagya et al., 2014, en el cual se reportó una expresión alterada de los genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos.

Paralelamente, se apreció alteración en los procesos de señalización celular, presentación de antígenos y un aumento en la respuesta a inflamación aguda, equivalentemente a lo reportado por Jagya et al., 2014.

Conjuntamente, los procesos relacionados al ciclo celular, división celular, reparación y replicación de ADN, se vieron disminuidos.

Asimismo, se constató un incremento en la actividad para las vías de señalización relacionadas a p38 MAPK, PI3K y señalización de interleuquinas. Precisamente, la vía de p38 MAPK está involucrada en procesos de diferenciación celular, apoptosis y senescencia, componiéndose de quinasas que responden al estrés celular y a citoquinas inflamatorias. (Zarubin y Han, 2005), similarmente la vía PI3K regula procesos de proliferación celular (Cantley, 2002).

En cambio, las vías de señalización disminuidas se asocian a la vía de la ubiquitina-proteasoma, regulación del citoesqueleto y vía de señalización del interferón- $\gamma$ .

Ciertamente, se identificaron genes sobre- y sub-expresados pertenecientes a las vías p53, la cual promueve la apoptosis (Fidman y Lowe, 2003) y wnt, la cual regula aspectos cruciales que determinan el destino de las células, como diferenciación celular, crecimiento celular y proliferación (Pfister y Kühl, 2018).

Destacadamente, estos resultados se corresponden a lo obtenido por Paingankar y Arankalle, 2015, reportando la desregulación en la vía wnt y en la organización del citoesqueleto debido a la infección por HEV.

Además notablemente, se observó un aumento en los genes activadores de la vía de señalización JAK/STAT a partir de IFN, resultando en la sobre-expresión de IRF7, lo que produce un efecto antiviral en las células (Fleming, 2016).

Recientemente, se reportó efectivamente una reducción de la replicación de HEV por IRF-1 mediante la vía JAK/STAT (Xu et al., 2016b).

Paralelamente, se detectó un aumento en la expresión de los genes CXCR4 (quimioquina) e INF- $\alpha$  y una sub-expresión por parte del gen SOCS3 (perteneciente a la vía del INF- $\gamma$ , actuando como supresor de señalización por citoquinas que regula negativamente la vía JAK/STAT) (Rawlings et al., 2004), coincidiendo con lo reportado en una investigación para el caso de pacientes con HEV aguda (TrehanPati et al., 2011). Asimismo, se constató un incremento de la expresión del gen EIF4EBP1 (represor del factor eucariota de iniciación de la traducción 4E) mediado por el aumento de la activación de la vía p53, reportándose en un estudio la limitación de la infección por HEV a través de este gen vía PI3K (Zhou et al., 2014).

Por otra parte, se identificaron los genes SNTB1 y SCIN como los más sobre-expresados, siendo SNTB1 una proteína de unión a actina, localizada en el citoesqueleto que participa en la contracción muscular, mientras que la proteína SCIN cliva filamentos de actina, asociándose a los procesos de regulación negativa de la proliferación celular y regulación positiva de la apoptosis. Las vías de señalización de este gen están mediadas por p38 MAPK (NCBI-Gene y Uniprot).

Contrariamente, los genes BCL2A1 y BMPER exhibieron la mayor sub-expresión. La proteína BCL2A1 actúa como un regulador pro- y anti-apoptótico, involucrado en una gran variedad de actividades celulares como homeostasis y tumorigénesis, este gen es además un blanco directo para ser transcrito por NF- $\kappa$ B en respuesta a mediadores de inflamación. La proteína BMPER está implicada en el proceso de angiogénesis y de regulación positiva de la cascada de ERK1/2 (quinasas reguladas por señal extracelular), la cual promueve a su vez, principalmente la proliferación celular y diferenciación (NCBI-Gene y Uniprot).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la infección por HEV promueve principalmente el proceso de apoptosis en la línea celular analizada.

En contraposición, en un proyecto realizado recientemente en la Sección Virología, se reportó que la expresión de la proteína codificada por ORF3 (mediante transfección estable a través de un vector de expresión) en la línea celular A549 protege a las células del proceso de apoptosis (García, Tesina de Grado 2016).

En forma destacada, se observó también que el 52.1% (1203) de DGE totales codifican para proteínas de unión y el 49.2% (1135) codifican para fosfoproteínas.

Por último, cabe resaltar que el 31% (715) de las proteínas codificadas por los DGE se localizan en el núcleo celular.

La naturaleza dinámica del proteoma de una célula, permite el estudio de la expresión génica directamente a un nivel proteómico. Ciertamente, las alteraciones en el proteoma debido a una enfermedad, pueden ocurrir en diversas maneras que no son predecibles desde el análisis genómico (Hanash et al., 2003).

Precisamente, los análisis proteómicos son una poderosa tecnología que brinda un mejor entendimiento de la patogénesis y de los biomarcadores involucrados en una enfermedad (Hanash et al., 2003).

Los cambios proteómicos en cultivos de células infectadas han sido previamente estudiados para varios virus (Chan et al., 2007; Chang et al., 2007; Sun et al., 2008), ya que las infecciones virales usualmente resultan en alteraciones en el proteoma de las células que determinan el destino de las mismas y el progreso de la patogénesis (Lee et al., 2011).

En primer lugar, se obtuvo una lisis celular exitosa con un método que probó ser efectivo y adecuado para células eucariotas de mamífero, utilizando detergente CHAPS, correspondiéndose con lo expresado en la literatura (Shen et al., 2014), en comparación a métodos estrictamente mecánicos, comprobándose mediante el gel SDS-PAGE y por la concentración proteica obtenida.

Se implementó un sistema de electroforesis bidimensional para reconocer el perfil de expresión proteico en el rango de pH 4-7 para células A549, detectándose varios spots de proteínas definidos. Asimismo, se apreció un perfil muy conservado entre las 2 condiciones, pudiendo indentificarse un spot diferencial asociado a una proteína sub-expresada en las células infectadas, correspondiéndose a la proteína queratina K8 (keratin, type II cytoskeletal 8 isoform 2 [Homo sapiens]) detectada por espectrometría de masa.

De forma similar, previos estudios proteómicos en células A549 infectadas con HEV suino, identificaron la sub-expresión de la proteína K9 (Keratin, type I cytoskeletal 9), entre otras (Shen et al., 2014).

Las queratinas son típicamente filamentos intermedios, perteneciendo al citoesqueleto, siendo importantes para la estabilidad mecánica y la integridad del epitelio (Moll et al., 2008). Adicionalmente, la proteína K8 de epitelio simple posee funciones regulatorias,

protegiendo a las células (especialmente los hepatocitos) de la apoptosis (Caulin et al., 2000; Ku et al., 2003a), estrés, daño celular (Zatloukal et al., 2000; Ku et al., 2003b) y posiblemente cumpliendo funciones en la regulación del ciclo celular (Toivola et al., 2001; Ku et al., 2002; Margolis et al., 2006; Galarneau et al., 2007; Magin et al., 2007). Notablemente, en la patología humana, defectos en K8 pueden predisponer a enfermedades hepáticas, particularmente cirrosis hepática criptogénica (Ku et al., 2003b; Zatloukal et al., 2004). Precisamente, se ha sugerido que esta proteína es necesaria para la integridad estructural de los hepatocitos (Ku et al., 1995; Loranger et al., 1997; Toivola et al., 1998), expresándose además en la mayoría de los carcinomas (Moll et al., 2008).

Dado lo expuesto, los resultados de proteómica sugieren un aumento en la apoptosis en las células de cultivo infectadas al encontrarse la proteína K8 sub-expresada, concordando con lo obtenido para el análisis de transcriptómica.

Sin embargo, el gen que codifica para la proteína K8 no se encontró diferencialmente expresado a través de la secuenciación masiva del transcriptoma.

Precisamente, discordancias significativas entre la expresión génica para los niveles de transcritos y proteínas han sido previamente reportadas, demostrándose una insuficiente correlación entre la abundancia relativa de los transcritos de ARNm y sus correspondientes productos proteicos, mediante las metodologías de microarray y electroforesis diferencial 2D, respectivamente (Gygi et al., 1999; Griffin et al., 2002; Ghazalpour et al., 2011; Stare et al., 2017). Destacadamente, en un estudio se obtuvo una correcta correspondencia entre proteínas y transcritos solo para la mitad del total de genes analizados, observándose, que el nivel de correlación varía dependiendo de la función biológica y localización celular de las proteínas (Ghazalpour et al., 2011).

Una de las razones biológicas para la baja correlación entre perfiles de expresión de transcriptoma y proteoma, yace en los mecanismos de regulación post-transcripcional (Vogel et al., 2012). Asimismo, la abundancia de proteínas refleja un balance dinámico entre eventos moleculares como: vida media del ARNm, eficiencia de traducción, *splicing* alternativo, plegamiento, transporte, localización, secreción, estabilidad proteica y degradación (Ghazalpour et al., 2011). Cabe resaltar que el proteoma celular es generalmente más estable y no todas las perturbaciones transcripcionales son manifestadas a nivel de proteínas (Dressaire et al., 2009; Maier et al., 2011).

Por lo tanto, los análisis de transcriptómica y proteómica son dos aspectos moleculares complementarios (Stare et al., 2017).

Por otro lado, es también posible que debido a la limitada sensibilidad de la técnica, algunos cambios en la abundancia de las proteínas no sean reconocidos.

En resumen, ambos estudios realizados en el presente proyecto permiten inferir que la replicación de HEV en células A549 produce una disminución en la proliferación celular, incrementando la apoptosis, caracterizándose además por un aumento en la expresión génica vinculada a la respuesta inflamatoria, alterando procesos y las vías metabólicas celulares wnt, p38 MAPK, p53 y JAK/STAT, dando así lugar al daño celular.

A pesar de que HEV está actualmente ganando reconocimiento y revistiendo gran importancia, aún resta comprender más en profundidad su patogénesis y los mecanismos moleculares implicados.

## 7. CONCLUSIONES

- ✿ Primeramente, se aisló exitosamente HEV3 de suero humano en las líneas celulares A549 y HepG2, observándose mayor eficiencia para las células A549.
- ✿ Se obtuvieron cultivos primarios estables de hepatocitos de rata neonata, no obstante, demostraron no ser susceptibles a la infección por HEV.
- ✿ Se realizó una curva de cinética de replicación para los días post-infección de HEV en A549 y HepG2, mediante la cuantificación absoluta por Real Time RT-PCR.
- ✿ Se generaron y aplicaron por primera vez en Uruguay metodologías de transcriptómica y proteómica en las células A549 infectadas con HEV3.
- ✿ Se identificaron 2474 genes con expresión diferencial, de los cuales 1300 corresponden a genes sobre-expresados y 1174 a genes sub-expresados.
- ✿ Respecto a la ontología de genes, se observó que los principales procesos biológicos alterados están asociados a la respuesta al estrés del retículo endoplasmático, regulación de autofagia, catabolismo aminoacídico, metabolismo lipídico y muerte celular necrótica.
- ✿ La mayoría de las proteínas codificadas por los DGE se localizan en el núcleo.
- ✿ En cuanto al análisis de proteómica, se detectó una proteína sub-expresada para la condición de infección, identificándose como queratina K8 (keratin, type II cytoskeletal 8 isoform 2 [Homo sapiens]).
- ✿ Por último, los resultados derivados de la implementación de ambas estrategias metodológicas sugieren que la replicación de HEV en células A549 produce una disminución de la proliferación celular, incrementando la apoptosis, promoviendo un aumento en la respuesta inflamatoria y alterando numerosos procesos biológicos celulares.

## 8. PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en esta Tesis representan una base para comenzar a profundizar los limitados conocimientos de la biología viral de HEV, planteando un amplio campo de investigación en Uruguay.

- ✿ En primer lugar, desarrollar y optimizar un cultivo primario de hepatocitos de cerdo.
  
- ✿ Conjuntamente, con respecto a los resultados obtenidos de proteómica en A549, a modo de profundizar se podría implementar un estudio de proteómica shotgun. En el cual no es necesario un paso previo de separación de proteínas, digiriéndose las proteínas enzimáticamente directamente de la mezcla compleja y separando los péptidos por HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS), permitiendo además, un análisis cuantitativo comparando el conteo de espectros de fragmentación entre las dos condiciones.
  
- ✿ Alternativamente, es posible llevar a cabo una metodología de 2D DIGE (Electroforesis diferencial de geles), la cual permite comparar dos condiciones biológicas al igual que el 2D clásico pero de forma cuantitativa. En esta técnica las proteínas de las dos condiciones a comparar son marcadas con dos fluoróforos distintos (Cy3 y Cy5), mezclándose junto a un estándar interno marcado (Cy2) y separándose en un mismo IEF y gel SDS-PAGE. El gel es analizado en un escáner de fluorescencia y software asociado, pudiendo determinarse la abundancia relativa de proteínas.
  
- ✿ Complementariamente, en cuanto a los resultados de transcriptómica, se podrían realizar estudios funcionales, comprobando experimentalmente mediante cuantificación relativa por qPCR, inhibiendo farmacológicamente o silenciando un gen o genes de una vía seleccionada para así determinar cuáles regulan finalmente a un DGE de interés.
  
- ✿ Eventualmente, evaluar el transcriptoma en distintas etapas de la cinética de replicación viral en los cultivos infectados de células A549 y asimismo, comparar analizando el transcriptoma de las células HepG2 infectadas.
  
- ✿ A largo plazo, para adquirir un mejor entendimiento sobre la biología viral de HEV, sería interesante realizar estudios de ribonómica, la cual considera la organización dinámica de los ARNm en la nucleoproteína, brindando información sobre traducibilidad y localización.

## 9. REFERENCIAS

- Abravanel, F., Sandres-Saune, K., Lhomme, S., Dubois, M., Mansuy, J.M., Izopet, J. 2012. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* 50; 897–902.
- Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Lhomme, S., Dubois, M., Peron, J.M., Alric, L., Rostaing, L., Kamar, N., Izopet, J. 2013. Performance of two commercial assays for detecting hepatitis E virus RNA in acute or chronic infections. *J. Clin. Microbiol.* 51; 1913–1916.
- Abravanel, F., Lhomme, S., El Costa, H., Schwartz, B., Peron, J.M., Kamar, N., Izopet, J. 2017. Rabbit hepatitis E virus infections in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 23; 1191–1193.
- Aggarwal, R., Naik, S.R. 1992. Hepatitis E: does person-to-person spread occur? *Indian J. Gastroenterol.* 11; 109–112.
- Aggarwal, R. Naik, S.R. 1994. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J Hepatol.* 21; 718–723.
- Aggarwal, R., Shahi, H., Naik, S., Yachha, S.K., Naik, S.R. 1997. Evidence in favour of high infection rate with hepatitis E virus among young children in India. *J. Hepatol.* 26(6); 1425–1426.
- Aggarwal, R., Kini, D., Sofat, S., Naik, S. R., Krawczynski, K. 2000. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet.* 356; 1081–1082.
- Aggarwal, R. 2010. Hepatitis E virus and person-to-person transmission. *Clin. Infect. Dis.* 51; 477–478.
- Aggarwal, R. 2013. Diagnosis of hepatitis E. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10; 24–33.
- Aggarwal, R., Goel, A. 2016. Advances in hepatitis E - I: virology, pathogenesis and diagnosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 10(9); 1053-63.
- Ahmad, I., Holla, R.P., Jameel, S. 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* 161; 47–58.
- Ahmed, A., Ali, I.A., Ghazal, H., Fazili, J., Nusrat, S. 2015. Mystery of hepatitis e virus: recent advances in its diagnosis and management. *Int J Hepatol.* doi: 10.1155/2015/872431.
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F., Girones, R. 2006. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 40; 7416–7422.
- Alvarado-Esquivel, C., Sanchez-Anguiano, L.F., Hernandez-Tinoco, J. 2015. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in mennonites in Mexico. *J Clin. Med. Res.* 7(2); 103–108.
- Alvarez-Muñoz, M.T., Torres, J., Damasio, L., Gomez, A., Tapia-Conyer, R., Munoz, O. 1999. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. *Arch Med Res.* 30; 251-254.
- Ansari, I.H., Nanda, S.K., Durgapal, H., Agrawal, S., Mohanty, S.K., Gupta, D., Jameel, S., Panda, S.K. 2000. Cloning, sequencing, and expression of the hepatitis E virus (HEV) nonstructural open reading frame 1 (ORF1). *J. Med.Virol.* 60; 275–283.
- Arankalle, V. A., Ticehurst, J., Sreenivasan, M. A., Kapikian, A. Z., Popper, H., Pavri, K. M., Purcell, R. H. 1988. Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non- A, non-B hepatitis. *Lancet.* 1; 550–554.
- Arankalle, V.A., Tsarev, S.A., Chadha, M.S., Alling, D.W., Emerson, S.U., Banerjee, K., Purcell, R.H. 1995. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J. Infect. Dis.* 171(2); 447–450.

- Arankalle, V. A., Chobe, L. P. 2000. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: evidence for posttransfusion hepatitis E. *Vox Sang.* 79; 72–74.
- Arankalle, V.A., Chadha, M.S., Chitambar, S.D., Walimbe, A.M., Chobe, L.P., Gandhe, S.S. 2001. Changing epidemiology of hepatitis A and hepatitis E in urban and rural India (1982–98). *J. Viral Hepat.* 8; 293–303.
- Arya, R.P., Arankalle, V.A. 2014. Toll like receptors in self-recovering hepatitis E patients with or without pregnancy. *Hum Immunol.* 75; 1147-1154.
- Avellon, A., Morago, L., Garcia-Galera del Carmen, M., Munoz, M., Echevarria, J. M. 2015. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J. Med. Virol.* 87; 1934–1939.
- Aye, T. T., Uchida, T., Ma, X. Z., Iida, F., Shikata, T., Zhuang, H., Win, K.M. 1992. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res.* 20; 3512.
- Balayan, M. S., Andjaparidze, A.G., Savinskaya, S.S., Ketiladze, E.S., Braginsky, D.M., Savinov, A.P., Poleschuk, V.F. 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 20(1); 23–31.
- Balayan, M.S., Zamyatina, N.A., Mikhailov, M.I., Sychev, A.V., Usmanov, R.K., Dvoynikova, O.V., Nelga, I.V., Grishina, G.K., Ankhundinova, L.A. 1994. Serological survey on hepatitis E virus infection in an endemic area: diagnosis potential of enzyme immunoassay for detection of IgG antibody. *Clin. Diagn. Virol.* 2; 297–304.
- Barnaud, E., Rogee, S., Garry, P., Rose, N., Pavo, N. 2012. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.* 78; 5153–5159.
- Batts, W., Yun, S., Hedrick, R., Winton, J. 2011. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res* 158; 116–123.
- Baylis SA, Corman VM, Ong E, Linnen, J.M., Nübling, C.M., Blümel, J. 2016. Hepatitis E viral loads in plasma pools for fractionation. *Transfusion.* 56; 2532-2537.
- Berkelman, T., Stenstedt, T. 1998. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients Principles and Methods. Amersham Biosciences.
- Bhatnagar, G., Sharma, S., Kumar, A., Prasad, S., Agarwal, S., Kar P. 2016. Reduced glutathione in hepatitis E infection and pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol Res.* 42;789-795.
- Bi, S. L., Purdy, M. A., Mccaustland, K. A., Margolis, H. S., Bradley, D. W. 1993. The sequence of hepatitis E virus isolated directly from a single source during an outbreak in China. *Virus Res.* 28; 233–247.
- Borgen, K., Herremans, T., Duizer, E., Vennema, H., Rutjes, S., Bosman, A., de Roda Husman, A.M., Koopmans, M. 2008. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in The Netherlands; A case series 2004–2006. *BMC Infect. Dis.* doi:10.1186/1471-2334-8-61.
- Bose, P.D., Das, B.C., Kumar, A., Gondal, R., Kumar, D., Kar, P. 2011. High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: Association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *J. Hepatol.* 54; 1107-1113.
- Bose, P. D., Das, B.C., Hazam, R.K., Kumar, A., Medhi, S., Kar, P. 2014. Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *J. Gen. Virol.* 95; 1266–1271.
- Bouwknegt, M., Engel, B., Herremans, M., Widdowson, M., Worm, H., Koopmans, M., Frankena, K., de Roda Husman, A., de Jong, M., van der Poel, W. 2008a. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 136; 567–576.

- Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes, S.A., Wellenberg, G.J., de Roda Husman, A.M., van der Poel, W.H., de Jong, M.C. 2008b. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet. Res.* doi:10.1051/vetres:2008017.
- Bouwknegt, M., Rutjes, S.A., Reusken, C.B., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M.C., de Roda Husman, A.M., Poel, W.H. 2009. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res.* doi: 10.1186/1746-6148-5-7.
- Bradley-Stewart, A.J., Jesudason, N., Michie, K., Winter, A.J., Gunson R.N. 2015. Hepatitis E in Scotland: assessment of HEV infection in two high-risk patient groups with elevated liver enzymes. *Journal of Clinical Virology.* 63; 36–37.
- Brahm, J., Hurtado, C., Moraga, M., Gil, L.C., Velasco, M., Alegria, S., Pagliero, B. 1996. Hepatitis E virus infection in Chile: preliminary report. *Rev Med Chil.* 124; 947-949.
- Brassard, J., Gagne, M.J., Genereux, M., Côté, C. 2012. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl Environ Microbiol.* 78; 3763-3766.
- Cantley, L.C. 2002. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science.* 296(5573); 1655-1657.
- Cao, D., Huang, Y.W., Meng, X.J. 2010. The nucleotides on the stem-loop RNA structure in the junction region of the hepatitis E virus genome are critical for virus replication. *J. Virol.* 84; 13040–13044.
- Caulin, C., Ware, C.F., Magin, T.M., Oshima, R.G. 2000. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 149(1); 17–22.
- Chan, E.Y., Qian, W.J., Diamond, D.L., Liu, T., Gritsenko, M.A., Monroe, M.E., Camp, D.G. II, Smith, R.D., Katze, M.G. 2007 Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1-infected CD41 cell proteome: dysregulated cell cycle progression and nuclear transport coincide with robust virus production. *J Virol.* 81; 7571–7583.
- Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M., Jaqmeel, S. 2008. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci.* 33; 451–64.
- Chang, L.Y., Ali, A.R., Hassan, S.S., AbuBakar, S. 2007. Human neuronal cell protein responses to Nipah virus infection. *Virol J.* 4; 54.
- Chapuy-Regaud, S., Dubois, M., Plisson-Chastang, C., Bonnefois, T., Lhomme, S., Bertrand-Michel, J., You, B., Simoneau, S., Gleizes, P.E., Flan, B., Abravanel, F., Izopet, J. 2017. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie.* 141; 70–79.
- Chatterjee, R., Tsarev, S., Pillot, J., Coursaget, P., Emerson, S. U., Purcell, R. H. 1997. African strains of hepatitis E virus that are distinct from Asian strains. *J. Med. Virol.* 53; 139–144.
- Chaundhry, S., Verma, N., Koren, D. 2015. Hepatitis E infection during pregnancy. *Can Fam Physician.* 61;607-608.
- Chibber, R., Usmani, M., Al-Sibai, M. 2004. Should HEV infected mothers breast feed? *Arch. Gynecol. Obstet.* 270; 15–20.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martín, M., Bofill-Mas, Girones, R. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9; 448–454.
- Clemente-Casares, P., Ramos-Romero, C., Ramirez-Gonzalez, E., Mas, A. 2016. Hepatitis E virus in industrialized countries: the silent threat. *Biomed. Res. Int.* doi: 10.1155/2016/9838041.
- Colson, P., Kaba, M., Bernit, E., Motte, A., Tamalet, C. 2007. Hepatitis E associated with surgical training on pigs. *Lancet.* doi: 10.1016/S0140-6736(07)61441-X.
- Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., Gerolami, R. 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis.* 202; 825-834.

- Colson, P., Dhiver, C., Poizot-Martin, I., Tamalet, C., Gerolami, R. 2011. Acute and chronic hepatitis E in patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Viral Hepat.* 18; 227–228.
- Corwin, A.L., Tien, N.T., Bounlu, K., Winarno, J., Putri, M.P., Laras, K., Larasati, R.P., Sukri, N., Endy, T., Sulaiman, H.A., Hyams, K.C. 1999. The unique riverine ecology of hepatitis E virus transmission in South-East Asia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93; 255–260.
- Crossan, C., Baker, P.J., Craft, J., Takeuchi, Y., Dalton, H.R., Scobie, L. 2012. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 18; 2085–2087.
- Dalton, H. R., Bendall, R. P., Keane, F. E., Tedder, R. S., Ijaz, S. 2009. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 361; 1025–1027.
- Dalton, H.R., Seghatchian, J. 2016a. Hepatitis E virus: emerging from the shadows in developed countries. *Transfus Apher Sci.* 55(3); 271–274.
- Dalton, H. R., Kamar, N., van Eijk, J.J., Mclean, B.N., Cintas, P., Bendall, R.P., Jacobs, B.C. 2016b. Hepatitis E virus and neurological injury. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 77–85.
- Das, K., Agarwal, A., Andrew, R., Frösner, G.G., Kar, P. 2000. Role of hepatitis E and other hepatotropic virus in aetiology of sporadic acute viral hepatitis: a hospital based study from urban Delhi. *Eur. J. Epidemiol.* 16(10); 937–940.
- Debing, Y., Gisa, A., Dallmeier, K., Pischke, S., Bremer, B., Manns, M., Wedemeyer, H., Suneetha, P.V., Neyts, J., 2014. A mutation in the hepatitis E virus RNA polymerase promotes its replication and associates with ribavirin treatment failure in organ transplant recipients. *Gastroenterology.* 147 (5); 1008–1011.
- Debing, Y., Ramiere, C., Dallmeier, K., Piorkowski, G., Trabaud, M.A., Lebosse, F., Scholtès, C., Roche, M., Legras-Lachuer, C., de Lamballerie, X., André, P., 2016. Hepatitis E virus mutations associated with ribavirin treatment failure result in altered viral fitness and ribavirin sensitivity. *J. Hepatol.* 65(3); 499–508.
- Devhare, P., Sharma, K., Mhaindarkar, V., Arankalle, V., Lole, K., 2014. Analysis of helicase domain mutations in the hepatitis E virus derived from patients with fulminant hepatic failure: effects on enzymatic activities and virus replication. *Virus Res.* 184; 103–110.
- DIEA-MGAP. 2015. Anuario Estadístico Agropecuario.
- Diez-Valcarce, M., Kokkinos, P., Söderberg, K., Bouwknegt, M., Willems, K., de Roda-Husman, A.M., von Bonsdorff, C.H., Bellou, M., Hernández, M., Maunula, L., Vantarakis, A., Rodríguez-Lázaro, D. 2012. Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environ. Virol.* 4; 73–80.
- Ding, Q., Heller, B., Capuccino, J. M., Song, B., Nimgaonkar, I., Hrebikova, G., Contreras, J.E., Ploss, A. 2017. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114; 1147–1152.
- Ditah, I., Ditah, F., Devaki, P., Ditah, C., Kamath, P.S., Charlton, M. 2014. Current epidemiology of hepatitis E virus infection in the United States: low seroprevalence in the National Health and Nutrition Evaluation Survey. *Hepatology.* 60; 815–822.
- Donnelly, M.C., Scobie, L., Crossan, C.L., Dalton, H., Hayes, P.C., Simpson, K.J. 2017. Review article: hepatitis E—a concise review of virology, epidemiology, clinical presentation and therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 46(2); 126–141.
- Dosztanyi, Z., Chen, J., Dunker, A. K., Simon, I., and Tompa, P. 2006. Disorder and sequence repeats in hub proteins and their implications for network evolution. *J. Proteome Res.* 5; 2985–2995.
- Drave, S. A., Debing, Y., Walter, S., Todt, D., Engelmann, M., Friesland, M., Wedemeyer, H., Neyts, J., Behrendt, P., Steinmann, E. 2016. Extra-hepatic replication and infection of hepatitis E virus in neuronal-derived cells. *J. Viral Hepat.* 23; 512–521.

- Drexler, H. G., Uphoff CC. 2000. Contamination of cell cultures, mycoplasma. *The Encyclopedia of Cell Technology*. Eds. Wiley, New York. p. 609–627.
- Drexler, J. F., Seelen, A., Corman, V. M., Fumie Tateno, A., Cottontail, V., Melim Zerbinati, R., Gloza-Rausch, F., Klose, S.M., Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S.K., Kalko, E.K., Osterman, A., Rasche, A., Adam, A., Müller, M.A., Ulrich, R.G., Leroy, E.M., Lukashev, A.N., Drosten, C. 2012. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J. Virol.* 86; 9134–9147.
- Dressaire, C., Gitton, C., Loubière, P., Monnet, V., Queinnec, I., Coccain-Bousquet, M. 2009. Transcriptome and proteome exploration to model translation efficiency and protein stability in *Lactococcus lactis*. *PLoS Comput. Biol.* doi: 10.1371/journal.pcbi.1000606.
- Ducancelle, A., Payan, C., Nicand, E., Le Guillou, H., Calès, P., Lunel-Fabiani, F. 2007. Intrafamilial hepatitis E in France. *J Clin Virol.* 39(1); 51–53.
- Dunker, A. K., Oldfield, C. J., Meng, J., Romero, P., Yang, J. Y., Chen, J. W., Vacic, V., Obradovic, Z., Uversky, V.N. 2008. The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics*. doi: 10.1186/1471-2164-9-S2-S1.
- Dzagurov, G.K., Kupriianov, V.V., Balaian, M.S. 1997. Study of hepatitis E virus replication in FRhK-4 cell culture. *Vopr Virusol.* 42(2); 63-66.
- E. H., Mishra, R. P., Joshi, D. D. 1984. Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* 252; 3140–3145.
- Echevarría, J.M. 2014. Light and darkness: prevalence of hepatitis E virus infection among the general population. *Scientifica (Cairo)*. doi: 10.1155/2014/481016.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., Yakhini, Z. 2009. GOrilla: A Tool For Discovery And Visualization of Enriched GO Terms in Ranked Gene Lists. *BMC Bioinformatics*. doi: 10.1186/1471-2105-10-48.
- EI-Esnawy, N.A. 2000. Examination for hepatitis E virus in wastewater treatment plants and workers by nested RT-PCR and ELISA. *J. Egypt. Public Health Assoc.* 75; 219–231.
- Emerson, S.U., Zhang, M., Meng, X.J., Nguyen, H., St Claire, M., Govindarajan, S., Huang Y.K., Purcell, R.H. 2001. Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98; 15270–15275.
- Emerson, S., Arankalle, V., Purcell, R. 2005. Thermal stability of hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* 192; 930–933.
- Emerson, S.U., Nguyen, H., Torian, U., Purcell, R.H. 2006. ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J. Virol.* 80; 10457–10464.
- Emerson, S. U. Nguyen, H.T., Torian, U., Burke, D., Engle, R., Purcell, R.H. 2010. Release of genotype 1 hepatitis E virus from cultured hepatoma and polarized intestinal cells depends on open reading frame 3 protein and requires an intact PXXP motif. *J. Virol.* 84; 9059–9069.
- Erker, J.C., Desai, S.M., Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Mushahwar, I. K. 1999. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J. Gen. Virol.* 80; 681–690.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J. 2008a. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int. J. Food Microbiol.* 123; 32–37.
- Feagins, A., Opriessnig, T., Huang, Y., Halbur, P., Meng, X.J. 2008b. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 80; 1379–1386.

- Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., Jeong, S.H., Walker, C., Lanford, R.E., Lemon, S.M. 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*. 496; 367–371.
- Fierro, N.A., Realpe, M., Meraz-Medina, T., Roman, S., Panduro, A. 2016. Hepatitis E virus: An ancient hidden enemy in Latin America. *World J Gastroenterol*. 22(7); 2271-2283.
- Fleming, S.B. 2016. J Viral Inhibition of the IFN-Induced JAK/STAT Signalling Pathway: Development of Live Attenuated Vaccines by Mutation of Viral-Encoded IFN-Antagonists. doi: 10.3390/vaccines4030023.
- Fridman, J.S., Lowe, S.W. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 22(56); 9030-9040.
- Fukae, J., Tsugawa, J., Ouma, S., Umezumi, T., Kusunoki, S., Tsuboi, Y. 2016. Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes in patients with anti-hepatitis E virus antibody: a hospital-based survey in Japan. *Neurol. Sci*. 37; 1849–1851.
- Fukuda, S., Ishikawa, M., Ochiai, N., Suzuki, Y., Sunaga, J., Shinohara, N., Nozawa, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Okamoto, H. 2007. Unchanged high prevalence of antibodies to hepatitis E virus (HEV) and HEV RNA among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan during 1991–2006. *Arch. Virol*. 152; 1623–1635.
- Galarneau, L., Loranger, A., Gilbert, S., Marceau, N. 2007. Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition. *Exp Cell Res*. 313(1); 179–194.
- Galiana, C., Fernandez-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M.T., Perez-Gracia, M.T. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2008. 78; 1012–1015.
- Gambel, J.M., Drabick, J.J., Seriwatana, J., Innis, B.L. 1998. Seroprevalence of hepatitis E virus among United Nations Mission in Haiti (UNMIH) peacekeepers, 1995. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 58(6); 731–736.
- García, C.G., Sánchez, D., Villalba, M.C., Pujol, F.H., de Los Ángeles Rodríguez Lay, L., Pinto, B., Chacón, E.P., Guzmán, M.G. 2012. Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *J. Med. Virol*. 84; 1025–1029.
- García, L. 2016. Rol de la proteína codificada por el ORF3 del Virus de la Hepatitis E (HEV) en la apoptosis y la proliferación celular in vitro. Tesina de Grado, Facultad de Ciencias.
- Geng, Y., Zhao, C., Huang, W., Harrison, T.J., Zhang, H., Geng, K., Wang, Y. 2016. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J. Hepatol*. 64; 37–43.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., et al. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. doi:10.1186/gb-2004-5-10-r80.
- Gérolami, R., Moal, V., Colson, P. 2008. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney transplant recipient. *N. Engl. J. Med*. 358;859–860.
- Geurtsvankessel, C. H., Islam, Z., Mohammad, Q.D., Jacobs, B.C., Endtz, H.P., Osterhaus, A.D. 2013. Hepatitis E and Guillain-Barre syndrome. *Clin. Infect. Dis*. 57; 1369–1370.
- Ghazalpour, A., Bennett, B., Petyuk, V.A., Orozco, L., Hagopian, R., Mungrue, I.N., Farber, C.R., Sinsheimer, J., Kang, H.M., Furlotte, N., Park, C.C., Wen, P.Z., Brewer, H., Weitz, K., Camp, D.G. II, Pan, C., Yordanova, R., Neuhaus, I., Tilford, C., Siemers, N., Gargalovic, P., Eskin, E., Kirchgessner, T., Smith, D.J., Smith, R.D., Lusk, A.J. 2011. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1001393.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Lai, M.M. 1991. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett*. 288; 201–205.

- Graff, J., Nguyen, H., Yu, C., Elkins, W.R., StClaire, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U. 2005. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J. Virol.* 79; 6680–6689.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., Emerson, S.U. 2006. A bicistronic Subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 80; 5919–5926.
- Griffin, T.J., Gygi, S.P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L., Aebersold R. 2002. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Proteomics.* 1(4); 323-333.
- Gu, Y., Tang, X., Zhang, X., Song, C., Zheng, M., Wang, K., Zhang, J., Ng, M.H., Hew, C.L., Li, S., Xia, N., Sivaraman, J. 2015. Structural basis for the neutralization of hepatitis E virus by a cross-genotype antibody. *Cell Res.* 25; 604–620.
- Guerra, J.A.A.A., Kampa, K.C., Morsolotto, D.G.B., Junior, A.P., Ivantes, C.A.P. 2017. Hepatitis E: A Literature Review. *J Clin Transl Hepatol.* 5(4); 376-383.
- Guinault, D. Ribes, D., Delas, A., Milongo, D., Abravanel, F., Puissant-Lubrano, B., Izopet, J., Kamar, N. 2016. Hepatitis E virus-induced cryoglobulinemic glomerulonephritis in a nonimmunocompromised person. *Am. J. Kidney Dis.* 67;660–663.
- Gutiérrez, C., Sánchez, D., Villalba, M.C., Pujol, F.H., Rodríguez-Lay, L., Pinto, B., Chacón, E.P., Guzmán, M.G. 2012. Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *J Med Virol.* 84; 1025–1029.
- Guu, T. S., Liu Z, Ye, Q., Mata, D.A., Li, K., Yin, C., Zhang, J., Tao, Y.J. 2009. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 106(31); 12992–12997.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.* Mar. 19(3); 1720-1730.
- Hakze-van der Honing, R.W., van Coillie, E., Antonis, A.F., van der Poel, W.H. 2011. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0022673.
- Halbur, P., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M., Purcell, R., Emerson, S., Toth, T., Meng, X.J. 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.* 39; 918–923.
- Hanash, S. Disease proteomics. 2003. *Nature.* 422(6928); 226-232.
- Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H., Meng, X. J. 2001. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* 82; 2449–2462.
- Hewitt, P. E. , Ijaz, S., Brailsford, S.R., Brett, R., Dicks, S., Haywood, B., Kennedy, I.T., Kitchen, A., Patel, P., Poh, J., Russell, K., Tettmar, K., Tossell, J., Ushiro-Lumb, I., Tedder, R.S. 2014. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet.* 384; 1766–1773.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 11; 1026–1030.
- Holla, R.P., Ahmad, I., Ahmad, Z., Jameel, S. 2013. Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin. LiverDis.* 33; 3–14.
- Holla, P., Ahmad, I., Ahmed, Z. Jameel, S. 2015. Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic* 16, 398–416.
- Hoofnagle, J. H., Nelson, K. E., Purcell, R. H. 2012. Hepatitis E. *N. Engl. J. Med.* 367; 1237–1244.

- Huang, R.T., Li, D.R., Wei, J., Huang, X.R., Yuan, X.T., Tian, X. 1992a. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *Journal of General Virology*. 73; 1143-1148.
- Huang, R.T., Li, D.R., Feng, J.J., Meng, J.C., Yuan, X.T. 1992b. PCR and nucleic acid hybridization of a virus isolated from the patient's feces with hepatitis E in China. *Chinese Journal of Epidemiology*. 13(Suppl2); 284-286.
- Huang, R., Nakazono, N., Ishii, K., Li, D., Kawamata, O., Kawaguchi, R., Tsukada, Y. 1995. I. Hepatitis E virus (87A strain) propagated in A549 cells. *J Med Virol*. 47; 299-302.
- Huang, R., Li, D., Wei, S., Li, Q., Yuan, X., Geng, L., Li, X., Liu, M. 1999. Cell-culture of sporadic Hepatitis E virus in China. *Clin Diagn Lab Immunol*. 6; 729-733.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Guenette, D.K., Woolcock, P.R., Larsen, C.T., Pierson, F.W., Elvinger, F., Toth, T.E., Meng, X.J. 2002. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis E virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microbiol*. 40; 4197-4202.
- Huang, Y.W., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Meng, X.J. 2007. Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo. *J. Virol*. 81; 3018-3026.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. 2009a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*. 4(1); 44-57.
- Huang, F., Zhang, W., Gong, G., Yuan, C., Yan, Y., Yang, S., Cui, L., Zhu, J., Yang, Z., Hua, X. 2009b. Experimental infection of Balb/c nude mice with Hepatitis E virus. *BMC Infect. Dis*. doi: 10.1186/1471-2334-9-93.
- Huang, S., Zhang, X., Jiang, H., Yan, Q., Ai, X., Wang, Y., Cai, J., Jiang, L., Wu, T., Wang, Z., Guan, L., Shih, J.W., Ng, M.H., Zhu, F., Zhang, J., Xia, N. 2010. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0013560.
- Huang, F., Li, Y., Yu, W., Jing, S., Wang, J., Long, F., He, Z., Yang, C., Bi, Y., Cao, W., Liu, C., Hua, X., Pan, Q. 2016. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology*. 64;350-359.
- Hyams, K.C., Yarbough, P.O., Gray, S., Callahan, J., Gotuzzo, E., Gutierrez, J., Vasquez, P.B., Hayes, C.G., Watts, D.M. 1996. Hepatitis E virus infection in Peru. *Clin Infect Dis*. 22; 719-720.
- Ibarra, H., Riedemann, S., Froesner, G., Reinhardt, G., Toledo, C. 1994. Acute sporadic hepatitis caused by the E virus in Chile. *Clinical case]. Rev Med Chil*. 122; 68-71.
- Ibarra, H., Riedemann, S., Reinhardt, G., Frieck, P., Siegel, F., Toledo, C., Calvo, M., Froösner, G. 1997. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile. *Rev. Med. Chil*. 125; 275-278.
- Illumina. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2017.
- INAC. 2014. Principales Indicadores del consumo de carnes en Uruguay.
- Inoue, J., Takahashi, M., Yazaki, Y., Tsuda, F., Okamoto, H. 2006. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods*. 137(2); 325-33.
- Ippagunta, S.K., Naik, S., Sharma, B., Aggarwal, R. 2007. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: Frequency and seasonal pattern. *Med. Virol*. 79; 1827-1831.
- Izopet, J, Dubois, M., Bertagnoli, S., Lhomme, S., Marchandea, S., Boucher, S., Kamar, N., Abravanel, F., Guérin, J.L. 2012. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, france. *Emerg. Infect. Dis*. 18; 1274-1281.

- Jagya, N., Varma, S.P., Thakral, D., Joshi, P., Durgapal, H., Panda, S.K. 2014. RNA-seq based transcriptome analysis of hepatitis E virus (HEV) and hepatitis B virus (HBV) replicon transfected Huh-7 cells. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0087835
- Jameel, S., Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Panda, S. K. 1996. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J. Virol.* 70; 207–216.
- Jardi, R., Crespo, M., Homs, M, van den Eynde, E., Girones, R., Rodriguez-Manzano, J., Caballero, A., Buti, M., Esteban, R., Rodriguez-Frias, F. 2012. HIV, HEV and cirrhosis: evidence of a possible link from eastern Spain. *HIV Medicine.* 13(6); 379–383.
- Jilani, N., Das, B.C., Husain, S.A., Baweja, U.K., Chattopadhyaya, D., Gupta, R.K., Sardana, S., Kar, P. 2007. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol.* 22;676-682.
- Jirintai, S., Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo, J.B., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nagashima, S., Nishizawa, T., Okamoto, H. 2014. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 185; 92–102.
- Johne, R., Heckel, G., Plenge-Bönig, A., Kindler, E., Maresch, C., Reetz, J., Schielke, A., Ulrich, R. G. 2010a. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 16; 1452-1455.
- Johne, R., Plenge-Bonig, A., Hess, M., Ulrich, R. G., Reetz, J., Schielke, A. 2010b. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 91; 750–758.
- Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R.G., Machnowska, P., Sachsenröder, J., Nickel, P., Hofmann, J. 2014. An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *J Viral Hepat.* 21(6); 447-456.
- Jothikumar, N., Aparna, K., Kamatchiammal, S., Paulmurugan, R., Saravanadevi, S., Khanna, P. 1993. Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59; 2558–2562.
- Kabrane-Lazizi, Y., Zhang, M., Purcell, R.H., Miller, K.D., Davey, R.T., Emerson, S.U. 2001. Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. *J. Gen. Virol.* 82; 1687–1693.
- Kadare, G., Haenni, A.L. 1997. Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.* 71; 2583–2590.
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S. A., Sehgal, D., Jameel, S. 2009. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J. Virol.* 83; 12714–12724.
- Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J.-M et al. 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *New England Journal of Medicine.* 358(8); 811–817.
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.S., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H.R. 2012a. Hepatitis E. *Lancet* 379; 2477–2488.
- Kamar, N., Weclawiak, H., Guilbeau-Frugier, C., Legrand-Abravanel, F., Cointault, O., Ribes, D., Esposito, L., Cardeau-Desangles, I., Guitard, J., Sallusto, F., Muscari, F., Peron, J.M., Alric, L., Izopet, J., Rostaing, L. 2012b. Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ-transplant patients. *Transplantation* 93; 617–623.
- Kamar, N., Dalton H.R., Abravanel, F., Izopet, J. 2014. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 27; 116–138.
- Kamar, N., Izopet, J., Pavio, N., Aggarwal, R., Labrique, A., Wedemeyer, H., Dalton, H.R. 2017. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers.* doi: 10.1038/nrdp.2017.86.
- Kane, M. A., Bradley, D. W., Shrestha, S. M., Maynard, J. E., Cook,

- Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I., Zhang, Y.J. 2009. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *J. Virol.* 83; 6375–6382.
- Kapur, N., Thakral, D., Durgapal, H., Panda, S. K. 2012. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor dependent clathrin-mediated endocytosis. *J. Viral Hepat.* 19; 436–448.
- Kar, P., Jilani, N., Husain, S.A., Pasha, S.T., Anand, R., Rai, A., Das, BC. 2008. Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am J Gastroenterol.* 103;2495-2501.
- Karpe, Y.A., Lole, K.S. 2010. NTPase and 50 to 30 RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain. *J. Virol.* 84; 3595–3602.
- Karpe, Y.A., Lole, K.S. 2011. Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease. *J. Gen. Virol.* 92; 2088–2092.
- Kaskheli, M.N., Baloch, S., Sheeba, A., Baloch S. 2015. Acute hepatitis E viral infection in pregnancy and maternal morbidity. *J Coll Physicians Surg Pak.* 24;734-737.
- Kasorndorkbua, C., Guenette, D.K., Huang, F.F., Thomas, P.J., Meng, X.J., Halbur, P.G. 2004. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J. Clin. Microbiol.* 42; 5047–5052.
- Kasorndorkbua, C., Opriessnig, T., Huang, F.F., Guenette, D.K., Thomas, P.J., Meng, X.J., Halbur, P.G. 2005. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl. Environ. Microbiol.* 71; 7831–7837.
- Kazachkov, Yu. A., Balayan, M. S., Ivannikova, T. A., Panina, L. I., Orlova, T. M., Zamyatina, N. A., Kusov, Yu. Yu. 1992. Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol* 127; 399–402.
- Kelly, A.G., Netzler, N.E., White, P.A. 2016. Ancient recombination events and the origins of hepatitis E virus. *BMC Evol Biol.* 16(1); 210.
- Kenfak-Foguena, A., Schöni-Affolter, F., Bürgisser, P. et al. 2011. Hepatitis E virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases.* 17(6); 1074–1078.
- Kenney, S. P., Wentworth, J. L., Heffron, C. L., Meng, X. J. 2015a. Replacement of the hepatitis E virus ORF3 protein PxxP motif with heterologous late domain motifs affects virus release via interaction with TSG101. *Virology* 486; 198–208.
- Kenney, S.P., Meng, X.J., 2015b. The lysine residues within the human ribosomal protein S17 sequence naturally inserted into the viral nonstructural protein of a unique strain of hepatitis E virus are important for enhanced virus replication. *J. Virol.* 89 (7); 3793–3803.
- Khuroo, M.S. 1980. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.* 68; 818–23.
- Khuroo, M.S., Teli, M.R., Skidmore, S., Sofi, M.A., Khuroo, M.I. 1981. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med.* 70; 252 –255.
- Khuroo, M. S., Kamili, S., Jameel, S. 1995. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet.* 345; 1025–1026.
- Khuroo, M.S., Kamil, S. 2003. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat.* 10;61-69.
- Khuroo, M. S., Kamili, S., Yatoo, G. N. 2004. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19; 778–784.
- Khuroo, M. S., Kamili, S., Khuroo, M. S. 2009. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J. Viral Hepat.* 16; 519–523.
- Khuroo, M.S., Khuroo, M.S., Khuroo, N.S. 2016. Transmission of hepatitis E virus in developing countries. *Viruses.* doi: 10.3390/v8090253.

- King AM. 2011. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier. Volume 9.
- Kmush, B., Wierzba, T., Krain, L., Nelson, K., Labrique, A.B. 2013. Epidemiology of hepatitis E in low- and middle-income countries of Asia and Africa. *Semin. Liver. Dis.* 33(1); 15-29.
- Kmush, B.L., Labrique, A., Li, W., Klein, S.L., Schulze, K., Shaikh, S., Ali, H., Engle, R.E., Wu, L., Purcell, R.H., Mehra, S., Christian, P., West, K. Jr., Nelson, K. 2016. The Association of Cytokines and Micronutrients with hepatitis E virus infection during pregnancy and the postpartum period in rural Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 94;203-211.
- Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Söderberg, K., Vasickova, P., Bouwknecht, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A.M., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., von Bonsdorff, C.H., Rzeżutka, A., Petrovic, T., Maunula, L., Pavlik, I., Vantarakis, A. 2017. Virological quality of irrigation water in leafy green vegetables and berry fruits production chains. *Food Environ Virol.* 9;72-78.
- Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R., Bradley, D.W. 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89; 8259–8263.
- Korkaya, H., Jameel, S., Gupta, D., Tyagi, S., Kumar, R., Zafrullah, M., Mazumdar, M., Lal, S.K., Xiaofang, L., Sehgal, D., Das, S.R., Sahal, D. 2001. The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK; *J. Biol. Chem.* 276; 42389–42400.
- Krawczynski, K., Aggarwal, R., Kamili, S. 2000. Hepatitis E. *Infect Dis Clin North Am.* 14; 669–687.
- Krog, J. S., Breum, S. O., Jensen, T. H., Larsen, L. E. 2013. Hepatitis E virus variant in farmed mink, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 19; 2028–2030.
- Ku, N.O., Michie, S., Oshima, R.G., Omary, M.B. 1995. Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *J. Cell Biol.* 131; 1303–1314.
- Ku, N.O., Michie, S., Resurreccion, E.Z., Broome, R.L., Omary, M.B. 2002. Keratin binding to 14–3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(7); 4373–4378.
- Ku, N.O., Soetikno, R.M., Omary, M.B. 2003a. Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology.* 37(5); 1006–1014.
- Ku, N.O., Darling, J.M., Krams, S.M., Esquivel, C.O., KeeVe, E.B., Sibley, R.K., Lee, Y.M., Wright, T.L., Omary, M.B. 2003b. Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(10); 6063–6068.
- Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J., Murthy, N. 2004. Hepatitis E in pregnancy. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 85; 240–244.
- Kumar, A., Devi, S.G., Kar, P., Agarwal, S., Husain, S.A., Gupta, R.K., Sharma, S. 2014. Association of cytokines in hepatitis E with pregnancy outcome. *Cytokine.* 65;95-104.
- Kwo, P. Y., Schlauder, G. G., Carpenter, H. A., Murphy, P. J., Rosenblatt, J. E., Dawson, G. J., Mast, E.E., Krawczynski, K., Balan, V. 1997. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin. Proc.* 72; 1133–1136.
- Lachish, T., Erez, O., Daudi, N., Shouvaal, D., Schwartz, E. 2015. Acute hepatitis E virus in pregnant women in Israel and in other industrialized countries. *J. Clin. Virol.* 73;20-24.
- Lange, H. Øverbø, J., Borgen, K., Dudman, S., Hoddevik, G., Urdahl, A.M., Vold, L., Sjurseth, S.K. 2017. Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiol. Infect.* 145; 181–186.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.

- le Coutre, P., Meisel, H., Hofmann, J., Röcken, C., Vuong, G.L., Neuburger, S., Hemmati, P.G., Dörken, B., Arnold, R. 2009. Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut*. 58;699–702.
- Leblanc, D., Ward, P., Gagné, M.J., Poitras, E., Müller, P., Trottier, Y.L., Simard, C., Houde, A. 2007. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int. J. Food Microbiol.* 117; 160–166.
- Lee, G., Han, D., Song, J.Y., Kim, J.H., Yoon, S. 2011. Proteomic analysis of swine hepatitis E virus (sHEV)-infected livers reveals upregulation of apolipoprotein and downregulation of ferritin heavy chain. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 61(3); 359-363.
- Lee, G. H., Tan, B. H., Chi-Yuan Teo, E., Lim, S. G., Dan, Y. Y., Wee, A., Aw, P.P., Zhu, Y., Hibberd, M.L., Tan, C.K., Purdy, M.A., Teo, C.G. 2016. Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology* 150; 355-357.
- León, P., Venegas, E., Bengoechea, L., Rojas, E., López, J.A., Elola, C., Echevarría, J.M. 1999. Prevalence of infections by hepatitis B, C, D and E viruses in Bolivia. *Rev. Panam. Salud Publica.* 5; 144-151.
- Lewis, H. C., Wichmann, O., Duizer, E. 2010. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol. Infect.* 138; 145–166.
- Lhomme, S., Garrouste, C., Kamar, N., Saune, K., Abravanel, F., Mansuy, J.M., Dubois, M., Rostaing, L., Izopet, J. 2014. Influence of polyproline region and macro domain genetic heterogeneity on HEV persistence in immunocompromised patients. *J. Infect. Dis.* 209; 300–303.
- Li, D. R., Huang, R. T., Pang, J. J., Yuan, X. T., Li, X. Y. 1996. Biological feature and genome analysis of HEV isolated by cell culture. *Enterically-Transmitted Hepatitis Viruses.* 349–361.
- Li, T. C., Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M. A., Uchida, T., Takeda, N., Miyamura, T. 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71; 7207–7213.
- Li, T. C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., Wang, J. C., Engvall, H., Hammar, L., Xing, L., Cheng, R.H. 2005a. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 79; 12999–13006.
- Li, T. C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., Miyamura, T. 2005b. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1958–1960.
- Li, R.C., Ge, S.X., Li, Y.P., Zheng, Y.J., Nong, Y., Guo, Q.S., Zhang, J., Ng, M.H., Xia, N.S. 2006. Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China. *Emerg. Infect. Dis.* 12; 1682–1688.
- Li, T.C., Miyamura, T., Takeda, N. 2007. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76; 170–172.
- Li, T.-C., Suzaki, Y., Ami, Y., Tsunemitsu, H., Miyamura, T., Takeda, N. 2008. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* 70; 1359-1362.
- Li, T.C., Ami, Y., Suzaki, Y., Takeda, N., Takaji, W. 2013a. No evidence for hepatitis E virus genotype 3 susceptibility in rats. *Emerg. Infect. Dis.* 19(8); 1343-1345.
- Li, T.-C., Yoshizaki, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Yasuda, S. P., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takeda, N. and Wakita, T. 2013b. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet. Microbiol.* 163; 54-61.
- Li, T.C., Wakita, T. 2018. Small Animal Models of Hepatitis E Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* doi: 10.1101/cshperspect.a032581
- Lin, J., Norder, H., Uhlhorn, H., Belak, S., and Widen, F. 2014. Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose. *J. Gen. Virol.* 95; 557–570.

- Lopez-Fabal, M. F., Gomez-Garces, J. L. 2015. Seroprevalence of hepatitis E virus in patients with hepatitis C and / or infected with HIV. *Revista Española de Quimioterapia*. 28(6); 314–316.
- Loranger, A., Duclos, S., Grenier, A., Price, J., Wilson-Heiner, M., Baribault, H., Marceau, N. 1997. Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity. *Am. J. Pathol.* 151; 1673–1683.
- Lorenzo, F. R., Tsatsralt-Od, B., Ganbat, S., Takahashi, M., Okamoto, H. 2007. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from farm pigs in Mongolia. *J. Med. Virol.* 79; 1128–1137.
- Lorenzo, F.R., Tanaka, T., Takahashi, H., Ichiyama, K., Hoshino, Y., Yamada, K., Inoue, J., Takahashi, M., Okamoto, H. 2008. Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Res.* 137(1); 86–96.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., et al. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 380; 2095-2128.
- Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H. 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16; 5–36.
- M. Kaba, H. Richet, I. Ravaux, Moreau, J., Poizot-Martin, I., Motte, A., Nicolino-Brunet, C., Dignat-George, F., Ménard, A., Dhiver, C., Brouqui, P., Colson, P. 2011. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Journal of Medical Virology*. 83(10); 1704–1716.
- Maier, T., Schmidt, A., Güell, M., Kühner, S., Gavin, A.-C., Aebbersold, R., Serrano, L. 2011. Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. *Mol. Syst. Biol.* doi: 10.1038/msb.2011.38.
- Magden, J., Takeda, N., Li, T., Auvinen, P., Ahola, T., Miyamura, T., Merits A., Kääriäinen L. 2001. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J. Virol.* 75; 6249–6255.
- Magin, T.M., Vijayaraj, P., Leube, R.E. 2007. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res.* 313(10); 2021–2032.
- Mahilkar, S., Paingankar, M. S., Lole, K. S. 2016. Hepatitis E virus RNA-dependent RNA polymerase: RNA template specificities, recruitment and synthesis. *J. Gen. Virol.* 97; 2231–2242.
- Mansuy, J.M., Saune, K., Rech, H., Abravanel, F., Mengelle, C. L. Homme, S., Destruel, F., Kamar, N., Izopet J. 2015. Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, Southern France. *Euro Surveill.* 20(19); 27-34.
- Margolis, S.S., Perry, J.A., Forester, C.M., Nutt, L.K., Guo, Y., Jardim, M.J., Thomenius, M.J., Freel, C.D., Darbandi, R., Ahn, J.H., Arroyo, J.D., Wang, X.F., Shenolikar, S., Nairn, A.C., Dunphy, W.G., Hahn, W.C., Virshup, D.M., Kornbluth, S. 2006. Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. *Cell.* 127(4); 759–773.
- Martínez, Wassaf, M.G., Pisano, M.B., Barril, P.A., Elbarcha, O.C., Pinto, M.A., Mendes de Oliveira, J., DiGiusto, P., Nates, S.V., Ré, V.E. 2014. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: environmental and serological survey. *J. Clin. Virol.* 61; 334-339.
- Mast E, Polish L, Favarov M, Khudyakova, N.S., Collins, C., Tukey, P.M., Koptich, D., Khudyakov, Y.E., Fields, H.A., Margolis, H.S., the Somali Refugee Medical Team. 1994. Hepatitis E among refugees in Kenya: minimal apparent person-to-person transmission: evidence for age-dependent disease expression, and new serologic assays. *Viral Hepat Liver Dis.* 375–378.
- Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 2003; 188: 944.
- Maunula, L., Kaupke, A., Vasickova, P., Söderberg, K., Kozyra, I., Lazic, S., van der Poel, W.H., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K.A., Moloney, R., D'Agostino, M., de Roda Husman, A.M., von Bonsdorff, C.H., Rzeżutka, A., Pavlik, I., Petrovic, T., Cook, N. 2013. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int J Food Microbiol.* 167; 177-185.

- McClean, B.N., Gulliver, J., Dalton, H.R. 2017. Hepatitis E virus and neurological disorders. *Pract Neurol.* 17(4); 282-288.
- Meng, J., Guinet, R., Pillot, J. 1996. Infection of PLC/PRF-5 cells with the hepatitis E virus. *Enterically-Transmitted Hepatitis Viruses.* 336–345.
- Meng, X.J., Purcell, R., Halbur, P., Lehman, J., Webb, D., Tsareva, T., Haynes, J., Thacker, B., Emerson, S. 1997a. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94; 9860–9865.
- Meng, J., Dubreuil, P., Pillot, J. 1997b. A new PCR-based seroneutralization assay in cell-culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol.* 35; 1373–1377.
- Meng, X. J., Halbur, P. G., Haynes, J. S., Tsareva, T. S., Bruna, J. D., Royer, R. L., Purcell, R.H., Emerson, S.U. 1998. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch. Virol.* 143; 1405–1415.
- Meng, X.J., Shivaprasad, H.L., Payne, C. 2008. *Hepatitis E Virus Infections. Diseases of Poultry*, 12<sup>a</sup> ed. Eds. Blackwell Publishing Press: Ames, IA, USA. p. 443–452
- Meng, X.J. 2011. From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* 161; 23–30.
- Mhaindarkar, V., Sharma, K., Lole, K.S. 2014. Mutagenesis of hepatitis E virus helicase motifs: effects on enzyme activity. *Virus Res.* 179; 26–33.
- Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., Thomas, P.D. 2016. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucl. Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkw1138.
- Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Gagliano, G., Arbiza, J. 2011. Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human hepatitis E virus infection in Uruguay. *Arch Virol.* 156(8);1451-1454.
- Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Arbiza, J. 2013. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Vir. Res.* 173; 364-370.
- Mirazo, S. 2014. *Caracterización Molecular y Variabilidad genética del Virus de la Hepatitis E.* Tesis Doctoral-PEDECIBA.
- Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S., Arbiza, J. 2014a. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med.* 6;45-59.
- Mirazo, S., Mainardi, V., Ramos, N., Gerona, S., Rocca, A., Arbiza J. 2014b. Indigenous hepatitis E virus genotype 1 infection, Uruguay. *Emerg Infect Dis.*20; 171-173.
- Mirazo, S., Gardinali, N.R., D'Albora, C., Verger, L., Ottonelli, F., Ramos, N., Castro, G., Pinto, M.A., a Ré, V., Pisano, B., Lozano, A., Mendes de Oliveira, J., Arbiza, J. 2018. Serological and virological survey of hepatitis E virus (HEV) in animal reservoirs from Uruguay reveals elevated prevalences and a very close phylogenetic relationship between swine and human strains. *Vet. Microbiol.* 213; 21-27.
- Mirghani, O.A., Saeed, O.K., Basama, F.M. 1992. Viral hepatitis in pregnancy. *East Afr Med J.* 69;445 –449.
- Miyamura, T. 2011. Hepatitis E virus infection in developed countries. *Virus Res.* 161; 40–46.
- Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y., Sugai, Y., Tokita, H., Akahane, Y., Itoh, K., Gotanda, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Okamoto H. 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic Cases of acute hepatitis in Japan. *J. Clin.Microbiol.* 40; 3209–3218.
- Moin, S.M., Panteva, M., Jameel, S. 2007. The hepatitis E virus Orf3 protein Protects cells from mitochondrial depolarization and death. *J. Biol.Chem.* 282; 21124–21133. doi:10.1074/jbc.M701696200.

- Moll, R., Divo, M., Langbein, L. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 129(6); 705-733.
- Mori, Y., Matsuura, Y. 2011. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.* 161; 59–64.
- Mulyanto, Suparyatmo, J. B., Andayani, I. G., Khalid, Takahashi M., Ohnishi H., Jirintai S., Nagashima S., Nishizawa T., Okamoto H. 2014. Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis. *Virus Res.* 179; 102-112.
- Munne, M.S., Vladimirov, S., Otegui, L., Brajterman, L., Castro, R., Soto, S., Moreira, R., Ciocca, M., Cuarterolo, M., Buamscha, D., Giannivelli, S., Sasbón, J., Schlauder, G., González, J.E. 2006. Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 36; 125-130.
- Murrison, L. B., Sherman, K. E. 2017. The enigma of hepatitis E virus. *Gastroenterol. Hepatol. (N.Y.).* 13; 484–491.
- Nagashima, S., Jirintai, S., Takahashi, M., Kobayashi, T., Tanggis, Nishizawa, T., Kouki, T., Yashiro, T., Okamoto, H. 2014a. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J. Gen. Virol.* 95; 2166–2175.
- Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, S., Tanggis, Kobayashi, T., Nishizawa, T., Okamoto H. 2014b. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch. Virol.* 159; 979–991.
- Naidu, S. S., Viswanathan, R. 1957. Infectious hepatitis in pregnancy during Delhi epidemic. *Indian J. Med. Res.* 45; 71–76.
- Naik, S. R., Aggarwal, R., Salunke, P. N., Mehrotra, N. N. 1992. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull. World Health Organ.* 70; 597–604.
- Nair, V.P., Anang, S., Subramani, C., Madhvi, A., Bakshi, K., Srivastava, A., Shalimar, Nayak, B., Ranjith, Kumar, C.T., Surjit, M. 2016. Endoplasmic reticulum stress induced synthesis of a novel viral factor Mediates efficient replication of genotype-1 hepatitis E virus. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1005521.
- Namsai, A., Louisirrotchanakul, S., Wongchinda, N., Siripanyaphinyo, U., Virulhakul, P., Puthavathana, P., Myint, K., Gannarong, M., Ittpong, R. 2011. Surveillance of hepatitis A and E viruses contamination in shellfish in Thailand. *Lett. Appl. Microbiol.* 53; 608–613.
- Nan, Y., Zhang, Y.J. 2016. Molecular Biology and Infection of Hepatitis E Virus. 7; 1419. *Front. Microbiol.*
- Nan, Y., Wu, C., Zhao, Q., Zhou, E.M. 2017. Zoonotic Hepatitis E Virus: An Ignored Risk for Public Health. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.02396.
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M., Shata, M.T. 2008. Hepatitis E and pregnancy: Understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 28;1190-1199.
- Nicand E, Armstrong GL, Enouf, V., Guthmann, J.P., Guerin, J.P., Caron, M., Nizou, J.Y., Andraghetti, R. 2005. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus in Darfur, Sudan, and neighboring Chad. *J Med Virol.* 77; 519–521.
- Nimgaonkar, I., Ding, Q., Schwartz, R.E., Ploss, A. 2018. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 15(2); 96-110.
- Nishiura, H. 2010. Household data from the Ugandan hepatitis E virus outbreak indicate the dominance of community infection. *Clin. Infect. Dis.* 51; 117–118.
- O'Reilly, E.K., Kao, C.C. 1998. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 252; 287–303.
- Okamoto, H. 2013. Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol.* 48(2); 147-158.

- Oliveira-Filho, E., König, M., Thiel, H.J. 2013. Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet. Microbiol.* 165;148-154.
- Paingankar, M.S., Arankalle, V.A. 2015. Identification and characterization of cellular proteins interacting with Hepatitis E virus untranslated regions. *Virus Res.* 2(208); 98-109.
- Pal, R., Aggarwal, R., Naik, S.R., Das, V., Das, S., Naik S. 2005. Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol.* 20;1094-1101.
- Paliwal, D., Panda, S.K., Kapur, N., Varma, S.P., Durgapal, H. 2014. Hepatitis E virus (HEV) protease: achymotrypsin-like enzyme that processes both non-structural (pORF1) and capsid (pORF2) protein. *J. Gen. Virol.* 95; 1689-1700.
- Panda, S.K., Ansari, I.H., Durgapal, H., Agrawal, S., Jameel, S. 2000. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J. Virol.* 74; 2430-2437.
- Panda, S.K., Thakral, D., Rehman, S. 2007. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 17;151-180.
- Pandey, A., Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 405; 837-846.
- Panduro, A., Escobedo Meléndez, G., Fierro, N.A., Ruiz Madrigal B., Zepeda-Carrillo, E.A., Román, S. 2011. Epidemiology of viral hepatitis in Mexico. *Salud Publica Mex. Suppl 1;* S37-S45.
- Parana, R., Cotrim, H.P., Cortey-Boennec, M.L., Trepo, C., Lyra, L. 1997. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit of liver diseases in Salvador, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57; 60-61.
- Parvez, M.K. 2013. Molecular characterization of hepatitis E virus ORF1 gene supports a papain-like cysteine protease (PCP)-domain activity. *Virus Res.* 178; 553-556.
- Parvez, M.K. 2015. The intergenic-junction variant (genotype 2 isolate) of hepatitis E virus restores the CREX 'stem-loop' structural integrity, essential for viral lifecycle. *Gene.* 559; 149-154.
- Patra, S., Kumar, A., Trivedi, S.S., Puri, M., Sarin, S.K. 2007. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med.* 147;28-33.
- Pehrson, J.R., Fried, V.A. 1992. Macro H2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257; 1398-1400.
- Pehrson, J.R., Fuji, R.N. 1998. Evolutionary conservation of histone macro H2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* 26; 2837-2842.
- Peralta, B., Biarnés, M., Ordóñez, G., Porta, R.N., Martín, M., Mateu, E., Pina, S., Meng, X.J. 2009. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet. Microbiol.* 137; 31-36.
- Perez-Gracia, M. T., Mateos, M.L., Galiana, C., Fernández-Barredo, S., García, A., Gómez, M.T., Moreira, V. 2007. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77; 893-896.
- Pérez-Gracia, M.T., Mateos Lindemann, M.L., Caridad Montalvo Villalba, M. 2013. Hepatitis E: current status. *Rev Med Virol.* 23(6); 384-398.
- Perttala, J., Spuul, P., Ahola, T. 2013. Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *J. Gen. Virol.* 94; 807-816.
- Pfister, A.S., Kühl, M. 2018. Of Wnts and Ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 153; 131-155.
- Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., Girones, R. 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J. Hepatol.*, 33; 826-833.
- Pineda, J. A., Cifuentes, C., Parr, M., Merchante, N., Pérez-Navarro, E., Rivero-Juárez, A., Monje, P., Rivero, A., Macías, J., Real, L.M. 2014. Incidence and natural history of hepatitis e virus coinfection among HIV-infected patients. *AIDS.* 28(13); 1931-1937.

- Pourbaix, A., Ouali, N., Soussan, P., Roque Afonso, A.M., Péraldi, M.N., Rondeau, E., Peltier, J. 2017. Evidence of hepatitis E virus transmission by renal graft. *Transpl Infect Dis.* doi: 10.1111/tid.12624.
- Prabhu, S.B., Gupta, P., Durgapal, H., Rath, S., Gupta, S.D., Acharya, S.K., Panda, S.K. 2011. Study of cellular immune response against hepatitis E virus (HEV). *J Viral Hepat.* 18;587-594.
- Prusty, B.K., Hedau, S., Singh, A., Kar, P., Das, B.C. 2007. Selective suppression of NF-kBp65 in hepatitis virus-infected pregnant women manifesting severe liver damage and high mortality. *Mol Med.* 13;518-526.
- Pudupakam, R. S., Huang, Y. W., Opriessnig, T., Halbur, P. G., Pierson, F. W., Meng, X. J. 2009. Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo. *J. Virol.* 83; 384–395.
- Pudupakam, R. S., Kenney, S. P., Cordoba, L., Huang, Y. W., Dryman, B. A., Leroith, T., et al. 2011. Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J. Virol.* 85; 10031–10040.
- Pujol, F.H., Favorov, M.O., Marcano, T., Esté, J.A., Magris, M., Liprandi, F., Khudyakov, Y.E., Khudyakova, N.S., Fields, H.A. 1994. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *J Med Virol.* 42; 234-236.
- Purcell, R.H., Emerson, S.U. 2008. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* 48; 494–503.
- Purcell, R. H., Engle, R. E., Rood, M. P., Kabrane-Lazizi, Y., Nguyen, H. T., Govindarajan, S., St Claire, M., Emerson S. U. 2011. Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17; 2216-2222.
- Purdy, M. A. 2012a. Evolution of the hepatitis E virus polyproline region: order from disorder. *J. Virol.* 86, 10186–10193. doi: 10.1128/JVI.01374-12.
- Purdy, M. A., Lara, J., Khudyakov, Y. E. 2012b. The hepatitis E virus polyproline region is involved in viral adaptation. *PLOS ONE.* doi: 10.1371/journal.pone.0035974.
- Qi, Y. Zhang, F., Zhang, L., Harrison, T.J., Huang, W., Zhao, C., Kong, W., Jiang, C., Wang, Y.. 2015. Hepatitis E virus produced from cell culture has a lipid envelope. *PLoS ONE* doi: 10.1371/journal.pone.0132503.
- Raj, V. S., Smits, S. L., Pas, S. D., Provacia, L. B., Moorman-Roest, H., Osterhaus, A. D., Haagmans, B.L. 2012. Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 18; 1369–1370.
- Ramdasi, A.Y., Arya, R.P., Arankalle, V.A. 2014. Effect of pregnancy on anti-HEV antibody titres, plasma cytokines and the corresponding gene expression levels in the PBMCs of patients presenting with self-recovering clinical and subclinical hepatitis E. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0103257.
- Rapicetta, M., Monarca, R., Kondili, L. A, Chionne, P., Madonna, E., Madeddu, G., Soddu, A., Candido, A., Carbonara, S., Mura, M.S., Starnini, G., Babudieri, S. 2013. Hepatitis e virus and hepatitis a virus exposures in an apparently healthy highrisk population in Italy. *Infection.* 41(1); 69–76.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., Harrison, D.A. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 117; 1281-1283.
- Rehman, S.,Kapur, N.,Durgapal, H., Panda, S.K. 2008. Subcellular Localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* 370; 77–92.
- Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn, J.S., Wiersma, S.T. 2012. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology.* 55; 988-997.
- Renou, C., Cadranel, J.F., Bourlière, M., Halfon, P., Ouzan, D., Rifflet, H., Carenco, P., Harafa, A., Bertrand, J.J., Boutrouille, A., Muller, P., Igual, J.P., Decoppet, A., Eloit, M., Pavio, N. 2007. Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerg. Infect. Dis.* 13; 1094–1096.

- Renou, C., Lafeuillade, A., Cadranet, J.-F., Pavio, N., Pariente, A., Allègre, T., Poggi, C., Pénaranda, G., Cordier, F., Nicand, E., ANGH. 2010. Hepatitis E virus in HIV-infected patients. *AIDS*, 24(10); 1493–1499.
- Rey, J.A., Findor, J.A., Daruich, J.R., Velazco, C.C., Igartua, E.B., Schmee, E., Kohan, A.I. 1997. Prevalence of IgG Anti-HEV in Buenos Aires, a Nonendemic Area for Hepatitis E. *J Travel Med.* 4; 100-101.
- Reyes, G. R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.C., Young, L.M., Fry, K.E., Bradley, D.W. 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*. 247; 1335–1339.
- Reyes, G.R., Huang, C.C., Tam, A.W., Purdy, M.A. 1993. Molecular Organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch. Virol. Suppl.* 7; 15–25.
- Riveiro-Barciela, M., Buti, M., Homs, M., Campos-Varela, I., Cantarell, C., Crespo, M., Castells, L., Taberner, D., Quer, J., Esteban, R., Rodríguez-Frías, F. Cirrhosis, liver transplantation and HIV infection are risk factors associated with hepatitis E virus infection. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0103028.
- Robinson, R.A., Burgess, W.H., Emerson, S.U., Leibowitz, R.S., Sosnovtseva, S.A., Tsarev, S., Purcell, R.H. 1998. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* 12; 75–84.
- Robson, S.C., Adams, S., Brink, N., Woodruff, B., Bradley, D. 1992. Hospital outbreak of hepatitis E. *Lancet*. 339(8806); 1424-1425.
- Ropp, S.L., Tam, A.W., Beames, B., Purdy, M., Frey, T.K. 2000. Expression of the hepatitis E virus ORF1. *Arch. Virol.* 145; 1321–1337.
- Rožanov, M.N., Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E. 1992. Conservation of the Putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 73; 2129–2134.
- Rutjes, S., Lodder, W., Lodder-Verschoor, F., van den Berg, H., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M., de Roda Husman, A. 2009. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15; 381–387.
- Sadler, G.J., Mells, G.F., Shah, N.H., Chesner, I.M., Walt, R.P. 2006. UK Acquired hepatitis E—An emerging problem? *J. Med. Virol.* 78; 473–475.
- Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H.L., Walsh, A., Ramsay, M.E., Morgan, D., Hepatitis E Incident Investigation Team. 2009. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* 15; 1738–1744.
- Sailaja, B., Murhekar, M.V., Hutin, Y.J., Kuruva, S., Murthy, S.P., Reddy, K.S., Rao, G.M., Gupte, M.D. 2009. Outbreak of waterborne Epidemiology of hepatitis E in Hyderabad, India, 2005. *Epidemiol. Infect.* 2009. 137; 234–40.
- Salam, G.D., Kumar, A., Kar, P., Aggarwal, S., Husain, A., Sharma, S. 2013. Serum tumor necrosis factor- $\alpha$  level in hepatitis E virus-related acute viral hepatitis and fulminant hepatic failure in pregnant women. *Hepatol Res.* 43;826-835.
- Satake, M. et al. 2017. Unique clinical courses of transfusion-transmitted hepatitis E in patients with immunosuppression. *Transfusion* 57; 280–288.
- Sayed, I., Vercoouter, A.S., Abdelwahab, S., Vercautresn, K., Meuleman, P. 2015. Is hepatitis E virus an emerging problem in industrialized countries? *Hepatology*. 62;1883-1892.
- Schlauder, G. G., Dawson, G. J., Erker, J. C., Kwo, P. Y., Knigge, M. F., Smalley, D. L., Rosenblatt, J.E., Desai, S.M., Mushahwar, I.K. 1998. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J. Gen. Virol.* 79; 447–456.

- Schlauder, G.G., Desai, S.M., Zanetti, A.R., Tassopoulos, N.C., Mushahwar, I.K. 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV. *J. Med. Virol.* 57; 243–251.
- Schlauder, G.G., Frider, B., Sookoian, S., Castano, G.C., Mushahwar, I.K. 2000. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis.* 182; 294-297.
- Schmieder, R., Edwards, R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 27; 863-864.
- Schlosser, B., Stein, A., Neuhaus, R., Pahl, S., Ramez, B., Krüger, D.H., Berg, T., Hofmann, J. 2012. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol.* 56; 500-502.
- Scotto, G., Martinelli, D., Centra, M., Querques, M., Vittorio, F., Delli Carri, P., Tartaglia, A., Campanale, F., Bulla, F., Prato, R., Fazio, V. 2014. Epidemiological and clinical features of HEV infection: a survey in the district of Foggia (Apulia, Southern Italy). *Epidemiology and Infection.* 142(2); 287–294.
- Sehgal, D., Thomas, S., Chakraborty, M., Jameel, S. 2006. Expression and Processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Virol. J.* doi:10.1186/1743-422X-3-38.
- Sehgal, R., Patra, S., David, P., Vyas, A., Khanam, A., Hissar, S., Gupta, E., Kumar, G., Kottlil, S., Maiwall, R., Sarin, S.K., Trehanpati, N. 2015. Impaired monocyte-macrophage functions and defective toll-like receptor signaling in hepatitis E virus-infected pregnant women with acute liver failure. *Hepatology.* 62;1683-1696.
- Servant-Delmas A, Abravanel F, Lefrere JJ, Lionnet, F., Hamon, C., Izopet, J., Laperche, S. 2016. New insights into the natural history of hepatitis E virus infection through a longitudinal study of multitransfused immunocompetent patients in France. *J Viral Hepat.* 23; 569-171.
- Shen, Q., Pu, Y., Fu, X., Xie, Y., Bian, X., Yang, S., Yang, Y., Cui, L., Wang, X., Wang, H., Zhang, W. 2014. Changes in the cellular proteins of A549 infected with hepatitis E virus by proteomics analysis. *BMC Vet Res.* doi: 10.1186/s12917-014-0188-5.
- Shrestha, A. C., Matsubayashi, K., Hoshi, Y., Taira, R., Furui, Y., Kokudo, N., Akamatsu, N., Yoshizumi, T., Ohkohchi, N., Okamoto, H., Miyoshi, M., Tamura, A., Fuse, K., Tadokoro, K. 2016. Hepatitis E virus RNA in Australian blood donations. *Transfusion.* 56; 3086–3093.
- Shukla, P., Nguyen, H.T., Torian, U., Engle, R.E., Faulk, K., Dalton, H.R., Bendall, R.P., Keane, F.E., Purcell, R.H., Emerson, S.U. 2011. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (6); 2438–2443.
- Siddiqui, A.R., Jooma, R.A., Smego, R.A. Jr. 2005. Nosocomial outbreak of hepatitis E infection in Pakistan with possible parenteral transmission. *Clin Infect Dis.* 40(6); 908-909.
- Skidmore SJ. 1999. Factors in spread of hepatitis E. *Lancet.* 354; 1049– 1050
- Smith, D. B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S. U., Harrison, T. J., Meng, X. J, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, Jameel, S., Emerson, S.U., Okamoto, H., Van der Poel, W.H., Purdy, M.A. 2014. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 95; 2223–2232.
- Smith, D.B., Simmonds, P., Izopet, J., Oliveira-Filho, E.F., Ulrich, R.G., Johne, R., Koenig, M., Jameel, S., Harrison, T.J., Meng, X.J., Okamoto, H., Van der Poel, W.H., Purdy, M.A. 2016. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* 97(3); 537–542.
- Somani, S.K., Aggarwal, R., Naik, S.R., Srivastava, S., Naik, S. 2003. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J. Viral. Hepat.* 10; 446–449.
- Song, Y.J., Jeong, H.J., Kim, Y.J., Lee, S.W., Lee, J.B., Park, S.Y., Song, C.S., Park, H.M., Choi, I.S. 2010. Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J. Med. Virol.* 82; 583–591.

- Sridhar, S., Teng, J. L. L., Chiu, T. H., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y. 2017. Hepatitis E Virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.* doi: 10.3390/ijms18040869.
- Stare, T., Stare, K., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Gruden, K. 2017. Comparison between Proteome and Transcriptome Response in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Leaves Following Potato Virus Y (PVY) Infection. *Proteomes*. doi: 10.3390/proteomes5030014.
- Stevens, O., Claeys, K. G., Poesen, K., Saegeman, V., Van Damme, P. 2017. Diagnostic challenges and clinical characteristics of hepatitis E virus-associated Guillain-Barre syndrome. *JAMA Neurol.* 74; 26–33.
- Sun, Z., Larsen, C., Dunlop, A., Huang, F., Pierson, F., Toth, T., Meng, X.J. 2004. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J. Gen. Virol.* 85; 693–700.
- Sun, J., Jiang, Y., Shi, Z., Yan, Y., Guo, H., He, F., Tu, C. 2008. Proteomic alteration of PK-15 cells after infection by classical swine fever virus. *J Proteome Res.* 7; 5263–5269.
- Suneetha, P.V., Pischke, S., Schlaphoff, V., Grabowski, J., Fyttili, P., Gronert, A., Bremer, B., Markova, A., Jaroszewicz, J., Bara, C., Manns, M.P., Cornberg, M., Wedemeyer. 2012. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology.* 55 (3); 695–708.
- Suppek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., Šmuc, T. 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0021800.
- Suppiah, S., Zhou, Y., Frey, T.K. 2011. Lack of processing of the expressed ORF1 gene product of hepatitis E virus. *Virol. J.* doi:10.1186/1743-422X-8-245.
- Surjit, M., Oberoi, R., Kumar, R., Lal, S. K. 2006. Enhanced  $\alpha$ 1 microglobulin secretion from Hepatitis E virus ORF3-expressing human hepatoma cells is mediated by the tumor susceptibility gene 101. *J. Biol. Chem.* 281; 8135–8142.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Yoshikawa, A., Sato, S., Isoda, N., Ido, K., Sugano, K., Okamoto, H. 2002. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. *J. Gen. Virol.* 83; 1931–1940.
- Takahashi, K., Kang, J. H., Ohnishi, S., Hino, K., Miyakawa, H., Miyakawa, Y., Maekubo, H., Mishiro, S. 2003. Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan. *Intervirology* 46; 308–318.
- Takahashi, K., Toyota, J., Karino, Y., Kang, J.H., Maekubo, H., Abe, N., Mishiro, S. 2004a. Estimation of the mutation rate of hepatitis E virus based on a set of closely related 7.5-year apart isolates from Sapporo, Japan. *Hepatol. Res.* 29 (4); 212–215.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Gotanda, Y., Tsuda, F., Komatsu, F., Kawabata, T., Hasegawa, K., Altankhuu, M., Chimedregzen, U., Narantuya, L., Hoshino, H., Hino, K., Kagawa, Y., Okamoto, H. 2004b. High prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses and viremia of hepatitis B, C, and D viruses among apparently healthy populations in Mongolia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11; 392–398.
- Takahashi, M., Yamada, K., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Tanaka, T., Okamoto, H. 2008. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch. Virol.* 153; 1703–1713.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Sato, H., Sato, Y., Jirintai, Nagashima, S., Okamoto, H. 2011. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* 92; 902–908.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Nagashima, S., Jirintai, S., Kawakami, M., Sonoda, Y., Suzuki, T., Yamamoto, S., Shigemoto, K., Ashida, K., Sato, Y., Okamoto, H. 2014. Molecular characterization of a novel

- hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res.* 180; 59–69.
- Tam, A.W., Smith, M.M., Guerra, M.E., Huang, C.C., Bradley, D.W., Fry, K. E., Reyes, G.R. 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185(1); 120-131.
- Tam, A. W., White, R., Reed, E., Short, M., Zhang, Y., Fuerst, T. R., Lanford, R. E. 1996a. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vitro-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 215; 1–9.
- Tam, A. W., Yarbough, P. O., Zhang, Y., Lanford, R. E., Fuerst, T. R. 1996b. Replication of hepatitis E virus in cultivated primary hepatocytes. *Enterically-Transmitted Hepatitis Viruses.* 346– 348.
- Tam, A. W., White, R., Yarbough, P. O., Brendan, J. R., Murphy, J., McAtee, C. P., Lanford, R. E., Fuerst, T. R. 1997. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 238; 94–102.
- Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., Okamoto, H. 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. 903-911.
- Taneja, S., Sen, S., Gupta, V.K., Aggarwal, R., Jameel, S. 2009. Plasma and urine biomarkers in acute viral hepatitis E. *Proteome Sci.* doi: 10.1186/1477-5956-7-39.
- Tang, Z. M., Tang, M., Zhao, M., Wen, G. P., Yang, F., Cai, W., Wang, S.L., Zheng, Z.Z., Xia, N.S. 2015. A novel linear neutralizing epitope of hepatitis E virus. *Vaccine* 33; 3504–3511.
- Taton, B., Moreau, K., Lepreux, S., Bachelet, T., Trimoulet, P., De Ledinghen, V., Pommereau, A., Ronco, P., Kamar, N., Merville, P., Couzi, L. 2013. Hepatitis E virus infection as a new probable cause of de novo membranous nephropathy after kidney transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* doi: 10.1111/tid.12143.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet.* 362; 371–373.
- Teo, C.G. 2010. Much meat, much malady: Changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin. Microbiol. Infect.* 16; 24–32.
- Teo, C.G., In CDC Health Information for International Travel 2010, Brunette, G.W., Kozarsky, P., Magill, A.J., Shliml, D.R., Whatley, A.D., 2009. Hepatitis E. Eds. Mosby. USA. 335–337.
- Teshale, E.H., Hu, D.J., Holmberg, S.D. 2010a. The two faces of hepatitis E virus. *Clin Infect Dis.* 51; 328-334.
- Teshale, E. H. Grytdal, S.P., Howard, C., Barry, V., Kamili, S., Drobeniuc, J., Hill, V.R., Okware, S., Hu, D.J., Holmberg, S.D. 2010b. Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. *Clin. Infect. Dis.* 50; 1006–1010.
- Thompson, K., CDC. 2013. Investigation of hepatitis E outbreak among refugees- Upper Nile, South Sudan, 2012–2013. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 62, 581–586.
- Todt, D., Gisa, A., Radonic, A., Nitsche, A., Behrendt, P., Suneetha, P.V., Pischke, S., Bremer, B., Brown, R.J., Manns, M.P., Cornberg, M., Bock, C.T., Steinmann, 2016. In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *65(10); 1733-43.*
- Toivola, D.M., Omary, M.B., Ku, N., Peltola, O., Baribault, H., Eriksson, J.E. 1998. Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly-incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity. *Hepatology.* 28; 116–128.
- Toivola, D.M., Nieminen, M.I., Hesse, M., He, T., Baribault, H., Magin, T.M., Omary, M.B., Eriksson, J.E. 2001. Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology.* 34(6); 1174–1183.

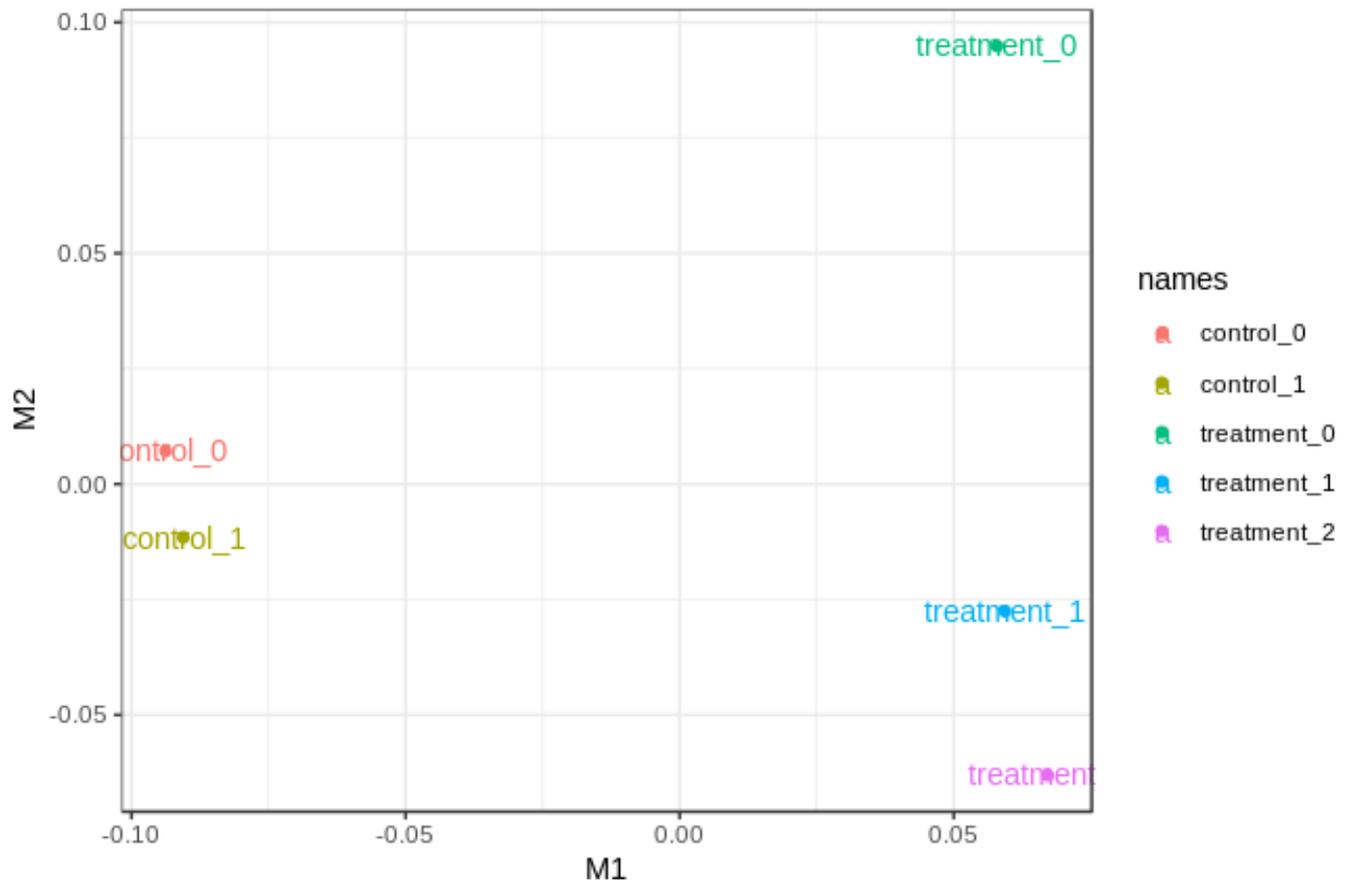
- Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq. *Bioinformatics*. 25; 1105–1111.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*. 28(5); 511-515.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., Pachter, L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*. 7(3); 562-578.
- TrehanPati, N., Sukriti, S., Geffers, R., Hissar, S., Riese, P., Toepfer, T., Guzman, C.A., Sarin, SK. 2011. Gene expression profiles of T cells from hepatitis E virus infected patients in acute and resolving phase. *J Clin Immunol*. 31(3); 498-508.
- Tsai, C. J., Ma, B., Sham, Y. Y., Kumar, S., and Nussinov, R. 2001. Structured disorder and conformational selection. *Proteins* 44; 418–427.
- Tsarev, S. A., Emerson, S. U., Reyes, G. R., Tsareva, T. S., Legters, L. J., Malik, I. A., Malik, I.A., Iqbal, M., Purcell, R.H. 1992. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89; 559–563.
- Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Yarbough, P. O., Legters, L. J., Moskal, T., Purcell, R. H. 1994. Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. *J Med Virol*. 43; 135–142.
- Tucker, T.J., Kirsch, R.E., Louw, S.J., Isaacs, S., Kannemeyer, J., Robson, S.C. 1996. Hepatitis E in South Africa: evidence for sporadic spread and increased seroprevalence in rural areas. *J. Med. Virol* 50(2); 117–119.
- Tyrrel, S.F., Quinton, J.N. 2003. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *J. Appl. Microbiol*. 94; (Suppl. S1) 87S–93S.
- Uphoff, C.C., Drexler, H.G. 2004. Detecting *Mycoplasma* contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods Mol Med*. 88; 319-26.
- Vaidya, S., Tilekar, B., Walimbe, A., Arankalle, V. 2003. Increased risk of hepatitis E in sewage workers from India. *J. Occup. Environ. Med*. 45; 1167–1170.
- Van Cauteren, D. Le Strat, Y., Sommen, C., Bruyand, M., Tourdjman, M., Da Silva, N.J., Couturier, E., Fournet, N., de Valk, H., Desenclos, J.C. 2017. Estimated annual numbers of foodborne pathogen-associated illnesses, hospitalizations, and deaths, France, 2008–2013. *Emerg. Infect. Dis*. 23; 1486–1492.
- van den Berg, B., van der Eijk, A.A., Pas, S.D., Hunter, J.G., Madden, R.G., Tio-Gillen, A.P., Dalton, H.R., Jacobs, B.C. 2014. Guillain-Barre syndrome associated with preceding hepatitis E virus infection. *Neurology* 82; 491–497.
- van Tong, H., Hoan, NX., Wang, B., Wedemeyer, H., Bock, CT., Velavan, T.P. 2016. Hepatitis E Virus Mutations: Functional and Clinical Relevance. *EBioMedicine*. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.07.039.
- Varma, S. P., Kumar, A. Kapur, N., Durgapal, H., Acharya, S.K., Panda, S.K. 2011. Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis. *J. Gen. Virol*. 92; 572–581.
- Velazquez, O., Stetler, H.C., Avila, C., Ornelas, G., Alvarez, C., Hadler, S.C., Bradley, D.W., Sepúlveda, J. 1990. Epidemic of enterically transmitted non-A and non-B hepatitis in Mexico, 1986–1987. *JAMA*. 263; 3281–3285.
- Viswanathan, R. 1957. *Epidemiology*. *Indian J. Med. Res*. 45; (Suppl.) 1–29.
- Vishwanathan, R. 2013. Infectious hepatitis in Delhi (1955–1956): a critical study-epidemiology. *Natl Med J India*. 26(6); 362-77.

- Vitral, C.L., da Silva-Nunes, M., Pinto, M.A., de Oliveira, J.M., Gaspar, A.M., Pereira, R.C., Ferreira, M.U. 2014. Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia. *BMC Infect Dis.* doi: 10.1186/1471-2334-14-458.
- Vivek, R., Chandy, G.M., Brown, D.W., Kang, G. 2010. Seroprevalence of IgG antibodies to hepatitis E in urban and rural southern India. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg* 104(4); 307–308.
- Vrati, S., Giri, D.K., Parida, S.K., Talwar, G.P. 1992. An epidemic of non-A, non-B hepatitis in South Dehli: epidemiological studies and transmission of the disease to rhesus monkeys. *Arch Virol.* 125(1–4); 319–326.
- Wang, Y., Ling, R., Erker, J.C., Zhang, H., Li, H., Desai, S., Mushahwar, I.K., Harrison, T. 1999. A divergent genotype of Hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology.* 80; 169–177.
- Wang, H., Zhang, W., Ni, B., Shen, H., Song, Y., Wang, X., Shao, S., Hua, X., Cui, L. 2010. Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus. *Virol. J.* doi: 10.1186/1743-422X-7-129.
- Wedemeyer, H., Pischke, S., and Manns, M. P. 2012. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology.* 142; 1388–1397.
- Wedemeyer, H., Rybczynska, J., Pischke, S., Krawczynski K. 2013. Immunopathogenesis of hepatitis E virus infection. *Semin Liver Dis.* 33;71–78. doi: 10.1055/s-0033-1338118.
- Wedemeyer, H., Dalton, H.R. 2017. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers.* doi: 10.1038/nrdp.2017.86.
- Wei, S., Walsh, P., Huang, R., To, S. S. T. 2000. 93G, a novel sporadic strain of hepatitis E virus in south China isolated by cell culture. *J Med Virol.* 61; 311–318.
- Wong, D.C., Purcell, R.H., Sreenivasan, M.A., Prasad, S.R., Pavri, K.M. 1980. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis etiology. *Lancet.* 2; 876–9.
- Wong, K.H., Liu, Y.M., Ng, P.S., Young, B.W., Lee, S.S. 2004. Epidemiology of hepatitis A and hepatitis E infection and their determinants in adult Chinese community in Hong Kong. *J. Med. Virol.* 72; 538–544.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tsang, A. K., Joseph, M., Wong, E. Y., Tang, Y., Sivakumar, S., Xie, J., Bai, R., Wernery, R., Wernery, U., Yuen KY. 2014. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.* 20; 1044–1048.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Cao, K. Y., Wernery, U., Schountz, T., Chiu, T.H., Tsang, A.K., Wong, P.C., Wong, E.Y., Yuen, K.Y. 2016. New hepatitis E virus genotype in bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 22; 2219–2221.
- World Health Organization (WHO). 2010 The global prevalence of hepatitis E virus infection and susceptibility: a systematic review. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals.
- Worm, H.C., Schlauder, G.G., Wurzer, H., Mushahwar, I.K. 2000. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *J. Gen.Virol.* 81, 2885–2890. doi: 10.1099/0022-1317-81-12-2885.
- Xing, L. Li, T.C., Mayazaki, N., Simon, M.N., Wall, J.S., Moore, M., Wang, C.Y., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., Cheng, R.H. 2010. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J. Biol. Chem.* 285; 33175–33183.
- Xu, K., Guo, S., Zhao, T., Zhu, H., Jiao, H., Shi, Q., Pang, F., Li, Y., Li, G., Peng, D., Nie, X., Cheng, Y., Wu, K., Du, L., Cui, K., Zhang, W., Wang, F. 2016a. Transcriptome Analysis of HepG2 Cells Expressing ORF3 from Swine Hepatitis E Virus to Determine the Effects of ORF3 on Host Cells. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2016/1648030.

- Xu, L., Zhou, X., Wang, W., Wang, Y., Yin, Y., Laan, L.J., Sprengers, D., Metselaar, H.J., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q. 2016b. IFN regulatory factor 1 restricts hepatitis E virus replication by activating STAT1 to induce antiviral IFN-stimulated genes. *30(10)*; 3352-3367.
- Yamada, K. Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., Tanaka, T., Okamoto H. 2009. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J. Gen. Virol.* 90; 1880–1891.
- Yamashita, T. Mori Y., Miyazaki, N., Cheng, R.H., Yoshimura, M., Unno, H., Shima, R., Moriishi, K., Tsukihara, T., Li, T.C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y. 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106; 12986–12991.
- Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y., Feng, Z. 2016. Distinct entry mechanisms for nonenveloped and quasi-enveloped hepatitis E viruses. *J. Virol.* 90; 4232–4242.
- Zaaijer, H. L. 2015. No artifact, hepatitis E is emerging. *Hepatology* 62; 654.
- Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Panda, S. K., Jameel, S. 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J. Virol.* 71; 9045–9053.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., Lim, W.A. 2003. The structure and function of proline recognition domains. *Sci.STKE*. doi: 10.1126/stke.2003.179.re8.
- Zarubin, T., Han, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15; 11-18.
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Lehner, M., Denk, H., Baribault, H., Eshkind, L.G., Franke, W.W. 2000. Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am J Pathol.* 156(4); 1263–1274.
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Fickert, P., Lackner, C., Trauner, M., Denk, H. 2004. The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J Pathol.* 204(4); 367–376.
- Zhang, H.Y., Chen, D.S., Wu, Y.Q., He, Q.G., Chen, H.C. and Liu, Z.F. 2011. Both swine and human cells are capable to support the replication of swine hepatitis E virus type 4 in vitro. *Vir. Res.* 258; 289-293.
- Zhang, L., Jiao, S., Yang, Z., Xu, L., Liu, L., Feng, Q., Zhang, X., Hou, Y., He, S., Saldanha, J., Wang, S., Wang, B. 2017. Prevalence of hepatitis E virus infection among blood donors in mainland China: a meta-analysis. *Transfusion* 57; 248–257.
- Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T.J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., Fan, J., Ma, H., Li, M., Song, A., Wang Y. 2009. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med. Virol.* 81; 1371–1379.
- Zhao, Q., Zhou, E. M., Dong, S. W., Qiu, H. K., Zhang, L., Hu, S. B., Zhao, F.F., Jiang, S.J., Sun, Y.N. 2010. Analysis of avian hepatitis E virus from chickens, China. *Emerg. Infect. Dis.* 16; 1469–1472.
- Zhou, X., Wang, Y., Metselaar, H.J., Janssen, H.L., Peppelenbosch, M.P., Pan, Q.J. 2014. Rapamycin and everolimus facilitate hepatitis E virus replication: revealing a basal defense mechanism of PI3K-PKB-mTOR pathway. *Hepatol.* 61(4); 746-54.
- Ziemer, C., Bonner, J., Cole, D., Vinjé, J., Constantini, V., Goyal, S., Gramer, M., Mackie, R., Meng, X.J., Myers, G., Saif, L.J. 2010. Fate and transport of zoonotic, bacterial, viral, and parasitic pathogens during swine manure treatment, storage, and land application. *J. Anim. Sci.* 88; (Suppl. S13) E84–E94.
- Zuckerman, J. 2003. Hepatitis E and the traveler. *Travel Med. Infect. Dis.* 1; 73–76.

## 10. ANEXOS

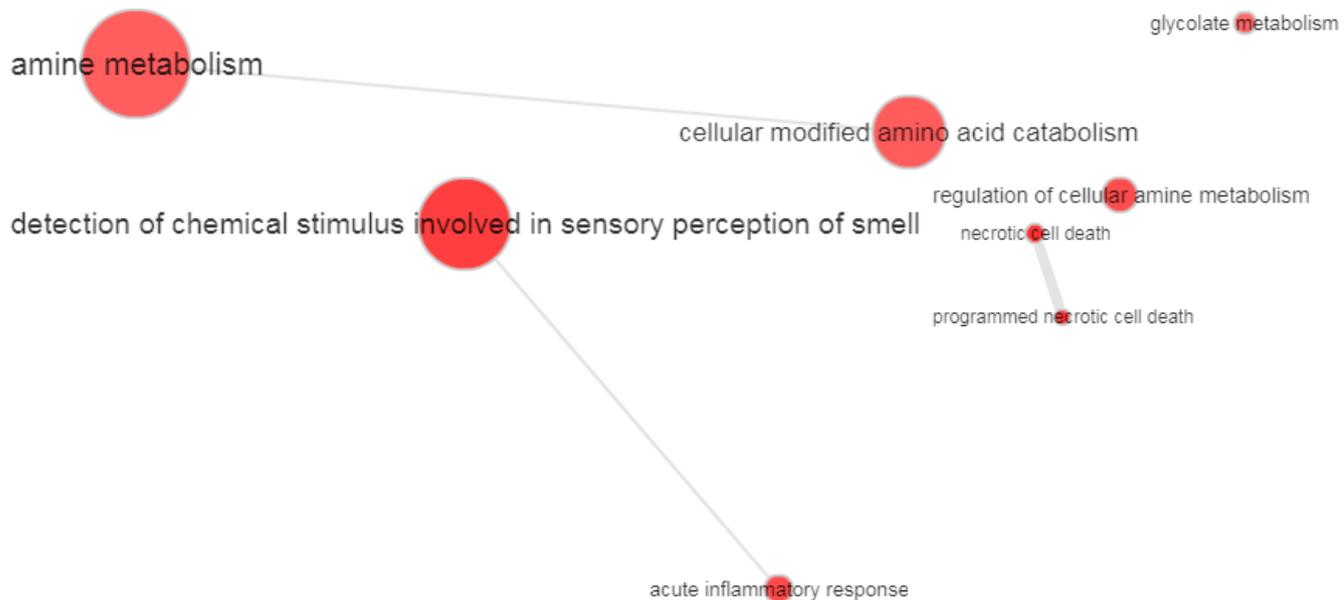
### 10.1. ANEXO I: Gráfico de escalamiento multidimensional (MDS) de las réplicas.



**Figura 1-Anexo I. Gráfico de análisis multidimensional.**

Se observó que no existieron replicas atípicas (*outliers*).

## 10.2. ANEXO II: Gráficos de ontología de genes.



**Figura 1-Anexo II. Gráfico representando GO para la categoría de procesos biológicos correspondiente a los DGE-UP.**

El color de las burbujas indica el p-valor obtenido para los términos enriquecidos de GO (cuanto más rojo, menor es el p-valor) y el tamaño de las burbujas representa la frecuencia del término GO con respecto a la base de datos GOA (Gene Ontology Annotation-European Bioinformatics Institute). Los términos GO con alta similitud se encuentran unidos por ángulos, donde el grosor de las líneas indica el grado de similitud, además, los nodos similares se observan más cercanos entre sí.

Rango de p-valores obtenidos por el programa GOrilla:  $9,92 \times 10^{-5}$  -  $9,41 \times 10^{-4}$ .

Realizado con el programa REVIGO.



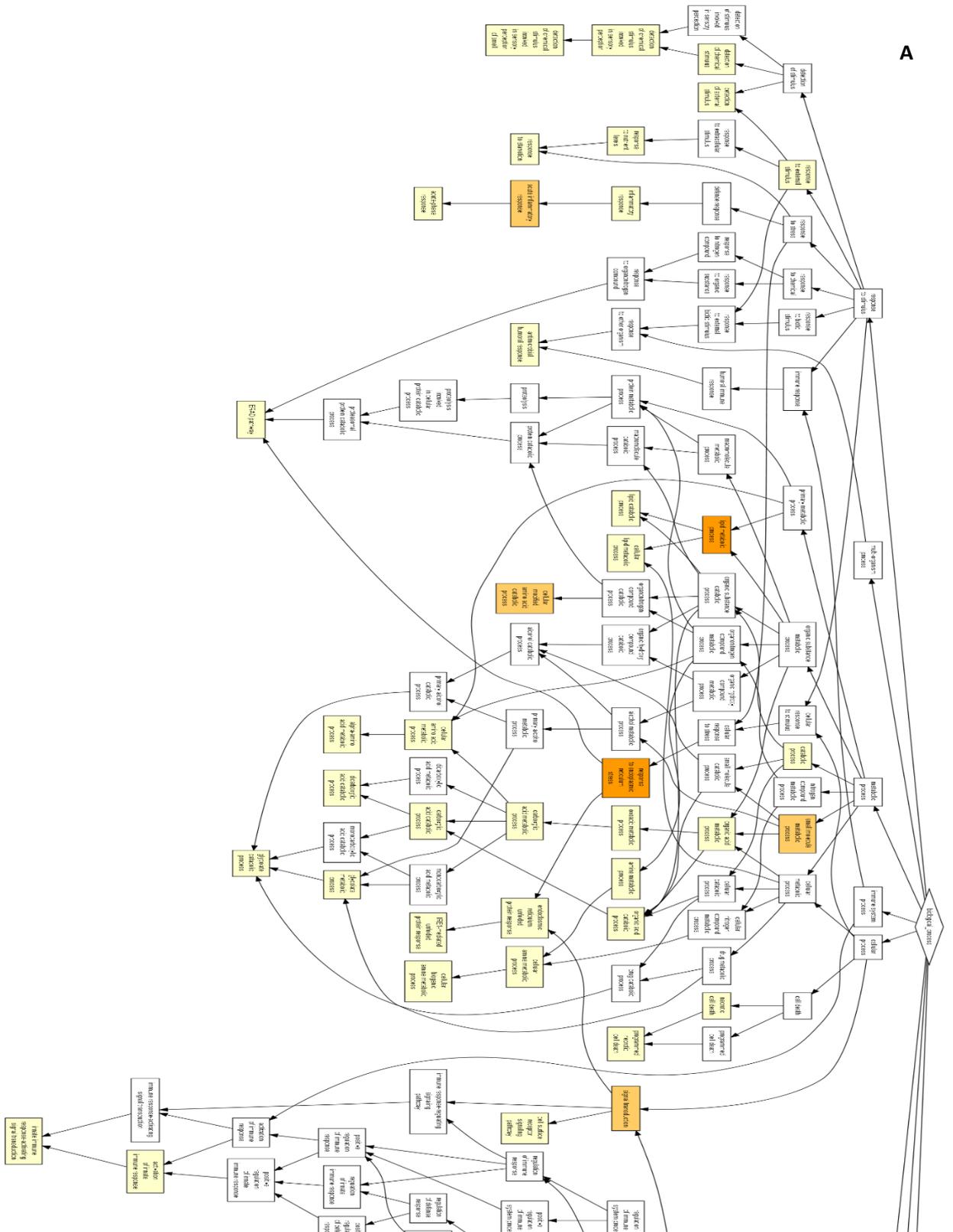
**Figura 2-Anexo II. Gráfico representando GO para la categoría de procesos biológicos correspondiente a los DGE-DOWN.**

El color de las burbujas indica el p-valor obtenido para los términos enriquecidos de GO (cuanto más rojo, menor es el p-valor) y el tamaño de las burbujas representa la frecuencia del término GO con respecto a la base de datos GOA (Gene Ontology Annotation-European Bioinformatics Institute). Los términos GO con alta similitud se encuentran unidos por ángulos, donde el grosor de las líneas indica el grado de similitud, además, los nodos similares se observan más cercanos entre sí.

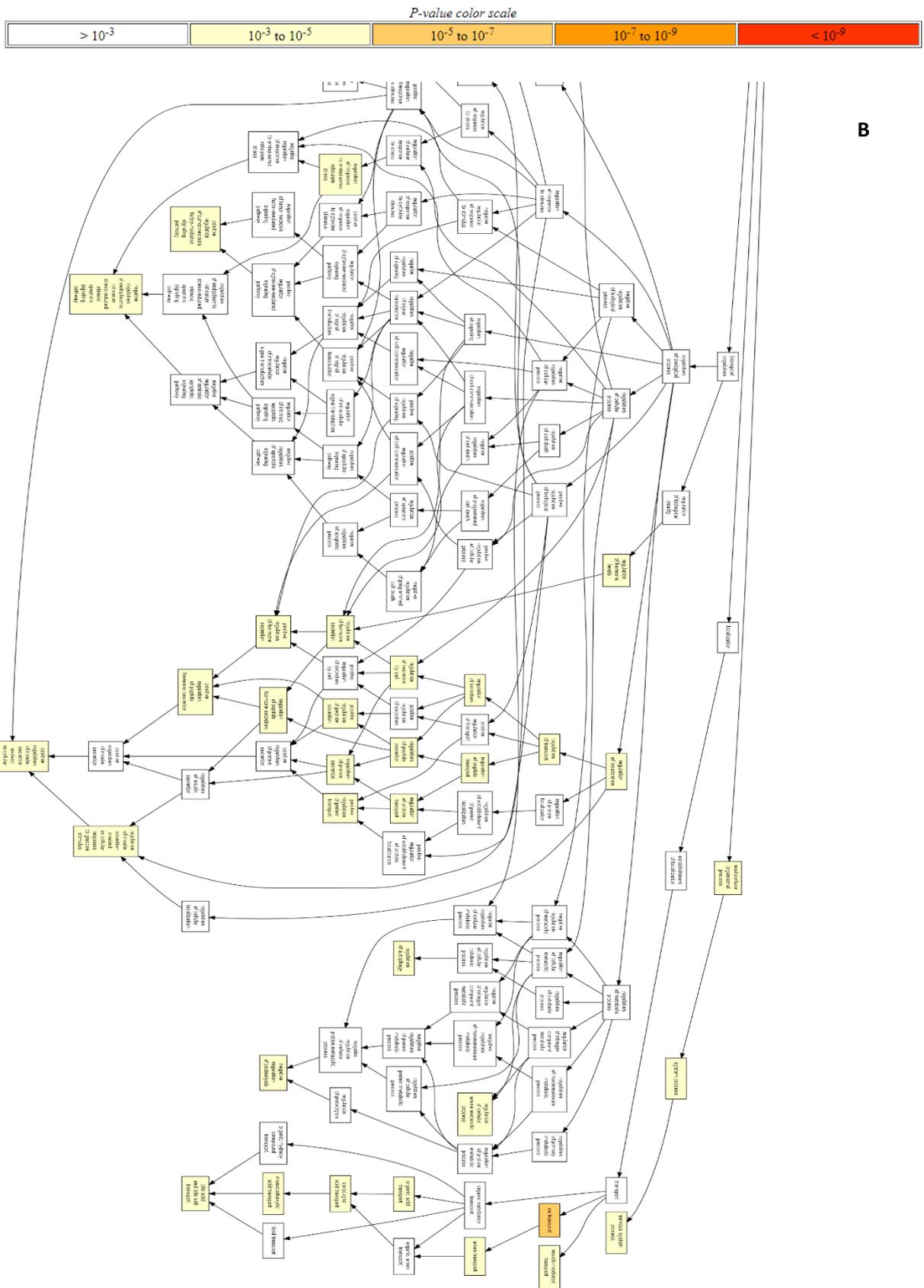
Rango de p-valores obtenidos por el programa GOrilla:  $1,87 \times 10^{-15}$  -  $9,28 \times 10^{-4}$ .

Realizado con el programa REVIGO.

P-value color scale



A

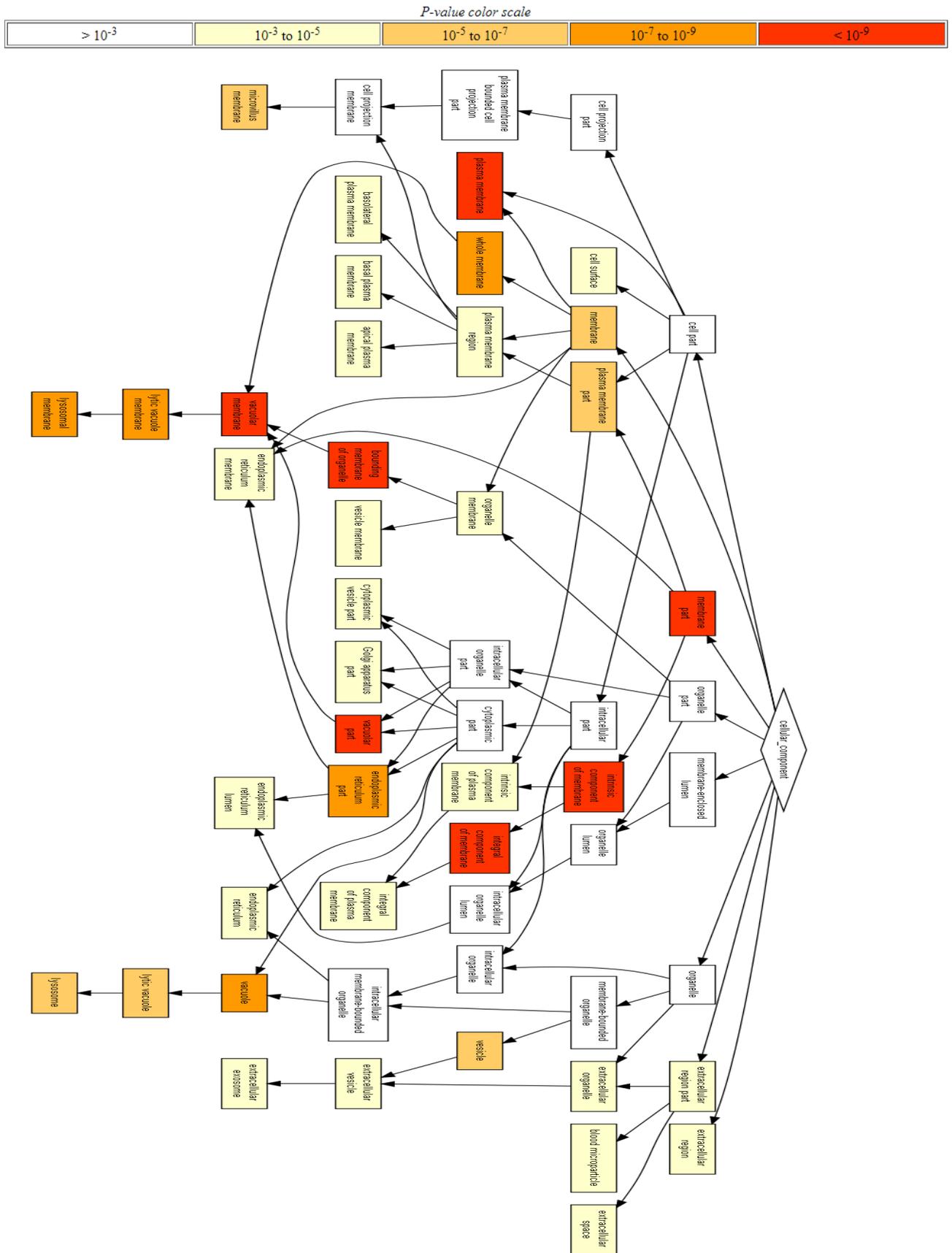


B

**Figura 3A, B-Anexo II. Representación DAG para la categoría de procesos biológicos correspondientes a los DGE.**

Se visualizan los términos GO enriquecidos con un código de colores reflejando su grado de enriquecimiento indicado por su p-valor. Realizado con el programa GOrilla.





**Figura 5-Anexo II. Representación DAG para la categoría de componentes celulares correspondientes a los DGE.**

Se visualizan los términos GO enriquecidos con un código de colores reflejando el grado de enriquecimiento indicado por su p-valor.

### 10.3. ANEXO III: Lista de DGE-UP y DGE-DOWN.

**Tabla 1-Anexo III. Lista de los 10 genes con mayor sobre-expresión para las células A549 infectadas.**

Se indican el ID del gen, la expresión relativa, FDR (p-valor ajustado-tasa de descubrimiento falso) y su descripción.

Gen ID	Expresión relative (Fold change)	FDR	Descripción	Símbolo del gen
ENSG00000172164.13	71	1,327E-02	syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 1)	SNTB1
ENSG00000006747.14	67	5,976E-04	scinderin	SCIN
ENSG00000173175.14	60	5,976E-04	adenylate cyclase 5	ADCY5
ENSG00000107099.15	53	5,976E-04	dedicator of cytokinesis 8	DOCK8
ENSG00000198203.9	46	5,976E-04	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	SULT1C2
ENSG00000129946.10	46	5,976E-04	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 2	SHC2
ENSG00000135842.16	43	5,976E-04	family with sequence similarity 129, member A	FAM129A
ENSG00000109846.7	41	5,976E-04	crystallin, alpha B	CRYAB
ENSG00000174951.10	33	5,976E-04	fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, H blood group)	FUT1
ENSG00000170959.14	33	5,976E-04	doublecortin domain containing 1	DCDC1

**Tabla 2-Anexo III. Lista de los 10 genes con mayor sub-expresión para las células A549 infectadas.** Se indican el ID del gen, la expresión relativa, FDR (p-valor ajustado-tasa de descubrimiento falso) y su descripción.

Gen ID	Expresión relativa (Fold change)	FDR	Descripción	Símbolo del gen
ENSG00000140379.7	0,037	5,976E-04	BCL2-related protein A1	BCL2A1
ENSG00000164619.8	0,056	4,295E-02	BMP binding endothelial regulator	BMPER
ENSG00000144583.4	0,057	5,976E-04	membrane-associated ring finger (C3HC4) 4, E3 ubiquitin protein ligase	MARCH4
ENSG00000169071.14	0,059	1,727E-02	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2	ROR2
ENSG00000140465.13	0,071	2,843E-03	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1
ENSG00000180537.12	0,072	5,976E-04	ring finger protein 182	RNF182
ENSG00000187800.13	0,078	5,976E-04	platelet endothelial aggregation receptor 1	PEAR1
ENSG00000108691.9	0,081	5,976E-04	chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2
ENSG00000107984.9	0,081	5,976E-04	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	DKK1
ENSG00000165480.15	0,082	5,976E-04	spindle and kinetochore associated complex subunit 3	SKA3