



Tesis para optar al título de Magíster en Ciencias  
Biológicas

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y ESTUDIOS  
FILODINÁMICOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C  
EN URUGUAY

Autor: Lic. Matías CASTELLS BAUER

Tutor: Dr. Humberto Rodney COLINA MUÑOZ

Co-tutor: Dr. Juan CRISTINA GHERALDI

Laboratorio de Virología Molecular

Regional Norte – Salto

CENUR Noroeste

Universidad de la República

Salto, Uruguay

2014



A Daniel y María Inés.

A Candelaria, Felipe, Agustín y Alfonso.

A Macarena.

A Federica y Pedro.

A mi familia, toda.

“Trabajar alegre y pacíficamente,  
sabiendo que los pensamientos y los esfuerzos  
traen inevitablemente buenos resultados”

James Allen

“En el fondo, los científicos somos gente con suerte:  
podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida”

Lee Smolin

“Cuanto más atrás puedas mirar, más adelante verás”

Winston Churchill

# Agradecimientos

A mis padres, porque no sólo me dieron la vida sino que me dan todo en la misma.

A mis hermanos, porque sin ellos mi vida no sería lo que es.

A mi familia, toda, por el orgullo que me demuestran cada día por mi esfuerzo y mis ganas de seguir formándome siempre.

A mi novia, por su apoyo incondicional a pesar de la distancia que a veces debemos soportar, y estar siempre dispuesta a escucharme y darme consejos desde su punto de vista para mejorar la presentación del trabajo.

A Rodney, por estar siempre dispuesto, por su apoyo, por formarme como científico, porque le debo prácticamente todo lo que he aprendido a él, y por encima de todo, por ser un tutor ejemplar.

A Juan, por aceptar ser mi co-tutor, y estar siempre dispuesto a ayudarme.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, que hizo posible la realización de esta tesis a través del apoyo económico mediante una beca de posgrado nacional.

A mis compañeros de laboratorio, Matías, Fernando, Leticia, Andrés y Luciana por estar siempre alegrándome los días de trabajo y ayudando en todo lo que preciso.

A María José, por bancarme todo este tiempo, no solo dentro del laboratorio sino principalmente fuera del mismo.

A Gonzalo por sus consejos y por brindarme secuencias utilizadas en la tesis.

A la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos por las muestras brindadas.

Al fútbol, por ayudarme a liberar presiones y distraerme, tanto al practicarlo día a día así como también al verlo.

A mis amigos de la carrera, Álvaro, Gabriel, Néstor, Santiago, y todos aquellos que conocí y me han ayudado a lo largo de la misma.

A mis compañeros de Regional Norte, Ana, Julio, Luis, Oscar y todos los que me han ayudado de alguna forma a lo largo de esta tesis.

A mis amigos, por estar siempre.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA.

A la Regional Norte, por permitirme la realización de la tesis en la misma.

A todos los que de una forma u otra han hecho posible la realización de esta tesis.

## Resumen

El virus de la hepatitis C afecta aproximadamente 170 millones de personas en el mundo y mueren por año 350 mil personas por enfermedades relacionadas al mismo. En Uruguay hay unas 14 mil personas infectadas con el virus. El VHC se clasifica hasta el momento en 7 genotipos y 67 subtipos distintos, y, si bien el VHC es un virus pandémico, los diferentes genotipos y subtipos se distribuyen siguiendo un patrón geográfico de circulación donde los genotipos 1 al 3 tienen una distribución global.

La región Okamoto de la NS5B es una pequeña región altamente conservada, muy utilizada para realizar estudios de filogenia, filodinámica y filogeografía. Los estudios tanto filodinámicos como filogeográficos son importantes para entender la evolución y dinámica viral. Para estos estudios se utilizó el método coalescente con el modelo de Skyline Bayesiano para estimar la distribución posterior del tamaño efectivo de la población a través del tiempo.

Esta tesis genera aportes sin precedentes en el Uruguay. El presente es un estudio epidemiológico, filodinámico y evolutivo, que aporta datos de nuestro país en ese sentido. En cuanto a la epidemiología, esta tesis aporta secuencias del gen parcial NS5B. Se determinó que los subtipos circulantes en Uruguay entre los años 2005 y 2011, fueron 1a (52,1%), 3a (24,2%), 1b (16,4%), 2c (5,4%) y 2b (1,8%). Por otra parte, se detectaron múltiples ingresos del virus al país para los 3 subtipos predominantes (1a, 3a y 1b), y los subtipos 1a y el 3a mostraron clústeres de dispersión local del virus, mientras que el subtipo 1b no mostró una posible dispersión local. La dispersión de los clústeres locales Uru-1a y Uru-3a así como también la de ambos subtipos en general (1a y 3a) se encuentra relativamente controlada. Por último, los subtipos 1a y 3a tienen una larga historia dentro del país, cuyos ingresos se remontan a mediados del siglo XX.

## Palabras clave

Virus de la hepatitis C, filodinámica, epidemiología, Uruguay.

# Tabla de contenido

Agradecimientos .....	III
Resumen .....	V
Palabras clave .....	VI
Lista de tablas y figuras.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XIII
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Enfermedad .....	1
1.1.1. Epidemiología de VHC .....	1
1.1.2. Patogénesis de VHC.....	3
1.1.3. Transmisión del VHC .....	5
1.1.4. Tratamiento de VHC .....	6
1.1.5. Co-infección VHC-VIH .....	11
1.2. El Virus de la Hepatitis C .....	14
1.2.1. Clasificación.....	14
1.2.2. Morfología .....	16
1.2.3. Estructura y organización del genoma.....	16
1.2.4. Ciclo replicativo del VHC.....	24
1.2.5. Variabilidad Genética de VHC.....	27
1.2.6. Genotipos .....	29
1.2.7. Distribución geográfica de cada genotipo .....	32
1.2.8. Mutación .....	33
1.2.9. Recombinación.....	36
1.2.10. Origen y evolución del VHC .....	38

1.3. Relevancia .....	45
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>46</b>
2.1. Objetivo general.....	46
2.2. Objetivos específicos .....	46
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>47</b>
3.1. Obtención de las muestras.....	47
3.2. Procesamiento de las muestras.....	47
3.2.1 Extracción del ARN viral.....	47
3.2.2 Transcripción reversa .....	47
3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	48
3.2.4. Visualización de los productos de PCR.....	50
3.2.5. Purificación de los productos de PCR.....	50
3.2.6. Secuenciación de los productos de PCR.....	50
3.3. Análisis de las secuencias.....	51
3.3.1. Edición de las secuencias.....	51
3.3.2. Secuencias de referencia .....	51
3.3.3. Alineamiento de las secuencias.....	51
3.3.4. Análisis filogenéticos.....	52
3.3.5. Análisis de estirpes recombinantes.....	52
3.3.6. Análisis de coalescencia .....	53
<b>4. Resultados .....</b>	<b>55</b>
4.1. Optimización de la PCR para la región NS5B.....	55
4.2. Muestras amplificadas y secuenciadas de la región NS5B .....	57
4.3. Comparación de dos métodos de extracción .....	57

4.4. Determinación de los genotipos y subtipos de VHC circulantes en Uruguay.....	58
4.5. Estudios de recombinación genética .....	63
4.6. Entradas del VHC a Uruguay.....	65
4.6.1. Subtipo 1a.....	65
4.6.2. Subtipo 3a.....	66
4.6.3. Subtipo 1b.....	69
4.7. Reconstrucción demográfica de los clústeres locales de los subtipos 1a y 3a.....	70
4.7.1. Clúster Uru-1a del subtipo 1a.....	70
4.7.2. Clúster Uru-3a del subtipo 3a.....	72
4.8. Reconstrucción histórica evolutiva de los subtipos 1a y 3a.....	73
4.8.1. Subtipo 1a.....	73
4.8.2. Subtipo 3a.....	75
<b>5. Discusión .....</b>	<b>76</b>
5.1. Optimización de la PCR para la región NS5B del VHC.....	76
5.2. Muestras amplificadas y secuenciadas de la región NS5B .....	76
5.3. Comparación de dos métodos de extracción .....	76
5.4. Determinación de los genotipos y subtipos del VHC circulantes en Uruguay.....	77
5.5. Estudios de recombinación genética .....	79
5.6. Entradas del VHC a Uruguay.....	79
5.6.1. Subtipo 1a.....	80
5.6.2. Subtipo 3a.....	81
5.6.3. Subtipo 1b.....	82

5.7. Reconstrucción demográfica de los clústeres locales de los subtipos 1a y 3a.....	82
5.7.1. Clúster Uru-1a del subtipo 1a.....	82
5.7.2. Clúster Uru-3a del subtipo 3a.....	84
5.8. Reconstrucción histórica evolutiva de los subtipos 1a y 3a.....	85
5.8.1. Subtipo 1a.....	85
5.8.2. Subtipo 3a.....	87
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>88</b>
<b>8. Perspectivas .....</b>	<b>90</b>
<b>9. Anexo.....</b>	<b>91</b>
<b>10. Manuscrito relacionado con esta tesis.....</b>	<b>93</b>
<b>11. Bibliografía .....</b>	<b>94</b>

# Lista de tablas y figuras

Figura 1.1. Prevalencia del VHC y distribución de sus genotipos en el mundo.....	3
Figura 1.2. La familia <i>Flaviviridae</i> .....	15
Figura 1.3. Árbol filogenético de la familia <i>Flaviviridae</i> .....	15
Figura 1.4. Genoma del VHC.....	17
Figura 1.5. Estructura del genoma y expresión de la poliproteína de VHC.....	24
Figura 1.6. Ciclo de replicación del VHC.....	27
Figura 1.7. Genotipos y subtipos del VHC.....	31
Figura 1.8. Relación entre las tasas de mutación en diferentes tipos de virus y el tamaño del genoma.....	35
Figura 1.9. Relación entre la tasa de error y el tamaño del genoma para diferentes sistemas genéticos, incluyendo los virus.....	35
Tabla 3.1. Cebadores utilizados para la amplificación de la región NS5B.....	48
Figura 4.1. Optimización de la PCR de la región parcial de la NS5B del genoma.....	55
Figura 4.2. Comparación de la eficiencia de dos métodos de extracción.....	57
Figura 4.3. Genotipificación de las muestras positivas para VHC.....	60
Figura 4.4. Árbol filogenético de ML del genotipo 1 del VHC .....	61
Figura 4.5. Árbol filogenético de ML del genotipo 2 del VHC.....	61
Figura 4.6. Árbol filogenético de ML del genotipo 3 del VHC.....	61
Tabla 4.1. Distribución de subtipos del VHC por año.....	62
Figura 4.7. Epidemiología del VHC en Uruguay.....	62
Figura 4.8. Gráfico de similitud de estirpes del VHC uruguayas del subtipo 1a.....	63
Figura 4.9. Gráfico de similitud de estirpes del VHC uruguayas del subtipo 1b.....	64
Figura 4.10. Gráfico de similitud de estirpes del VHC uruguayas del subtipo 3a.....	64
Figura 4.11. Árbol filogenético de ML del subtipo 1a del VHC.....	66
Figura 4.12. Árbol filogenético de ML del subtipo 3a del VHC.....	68
Figura 4.13. Árbol filogenético de ML del subtipo 1b del VHC.....	69
Figura 4.14. BSP del clúster local Uru-1a, del subtipo 1a utilizando la “tasa lenta” como <i>prior</i> .....	71
Figura 4.15. BSP del clúster local Uru-1a, del subtipo 1a utilizando la “tasa rápida” como <i>prior</i> .....	71
Figura 4.16. BSP del clúster local Uru-3a, del subtipo 3a.....	72
Figura 4.17. BSP del subtipo 1a utilizando la “tasa rápida” como <i>prior</i> .....	74

Figura 4.18. BSP del subtipo 1a utilizando la “tasa lenta” como <i>prior</i> .....	74
Figura 4.19. BSP del subtipo 3a.....	75
Figura 9.1. BSP del subtipo 1a utilizando la “tasa rápida” como <i>prior</i> .....	91
Figura 9.2. BSP del subtipo 1a utilizando la “tasa lenta” como <i>prior</i> .....	91
Figura 9.3. BSP del clúster local del subtipo 3a.....	92
Figura 9.4. Gráfico de subtipos circulantes por año.....	92

# Lista de abreviaturas

aa: Aminoácidos  
AAD: Antivirales de acción directa  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia  
AEPSM: Asociación Española Primera de Socorros Mutuos  
AIC: Criterio de información de Akaike  
aLRT: Test aproximado de la razón de verosimilitud  
ApAd: ARN polimerasa dependiente de ARN  
ARF: Marco alternativo de lectura  
ARFPs: Proteínas del marco alternativo de lectura  
ARN(-): Ácido ribonucleico de sentido negativo  
ARN(+): Ácido ribonucleico de sentido positivo  
ARN: Ácido ribonucleico  
ARNdc: Ácido ribonucleico doble cadena  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
BOC: Boceprevir  
BSP: *Skyline plot* bayesiano  
CHC: Carcinoma hepatocelular  
DLSP: Dirección de Laboratorios de Salud Pública  
dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato  
EASL: Asociación Europea para el Estudio del Hígado  
ER: Retículo endoplasmático  
ESLD: Enfermedad del hígado en etapa final  
ESS: Tamaño efectivo de muestreo  
HAART: Terapia antirretroviral altamente activa  
HPD: Densidad posterior más alta  
HVR: Región hipervariable  
ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus  
IgVR: Región variable intergenotípica  
INF: Interferón  
IP: Inhibidor de proteasa

IRES: Sitio interno de entrada del ribosoma  
JND: Junta Nacional de Drogas  
kb: kilobases  
kDa: kiloDalton  
LD: Gotas de lípidos  
LDL: Lipoproteína de baja densidad  
MCMC: Montecarlo vía cadenas de Markov  
Mg: Magnesio  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio  
ML: Máxima verosimilitud  
Mn: Manganeseo  
MRCA: Ancestro común más reciente  
MW: Red membranosa  
NCR: Región no codificante  
NEI: Número efectivo de infecciones  
nm: Nanómetros  
nt: Nucleótidos  
°C: Grados Celsius  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
ORF: Marco abierto de lectura  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
peg: Pegilado  
RBV: Ribavirina  
RT-PCR: Retrotranscripción y posterior reacción en cadena de la polimerasa  
RVS: Respuesta virológica sostenida  
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida  
SND: Secretaría Nacional de Drogas  
SOF: Sofosbuvir  
TH: Temperatura de hibridación  
tMRCA: Tiempo del ancestro común más reciente  
TVR: Telaprevir  
UDI: Usuarios de drogas inyectables  
VHA: Virus de la hepatitis A

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

# 1. Introducción

## **1.1. Enfermedad**

Hepatitis es un término general que significa inflamación del hígado y puede ser causada por diversos mecanismos, incluyendo agentes infecciosos, siendo los virus los principales causantes. Las hepatitis virales son causadas principalmente por al menos cinco virus; llamados virus de la hepatitis A, B, C, D y E. Estos cinco tipos son de gran interés debido a la importancia de la enfermedad y muerte que causan y el potencial para generar brotes y propagación epidémica. Particularmente, los tipos B y C llevan a una enfermedad crónica en cientos de millones de personas y, en conjunto, son la mayor causa de cirrosis y cáncer de hígado de la población mundial (WHO, 2003).

La primera demostración de que la mayoría de los casos de hepatitis asociadas a transfusiones no eran causados ni por el virus de la hepatitis A (VHA) ni el virus de la hepatitis B (VHB) (tampoco estaban implicados Citomegalovirus ni Epstein-Barr), fue en el año 1975 (Alter et al., 1975; Feinstone et al., 1975). Esta nueva enfermedad fue llamada en un principio hepatitis no A no B y el presunto agente etiológico fue llamado virus de la hepatitis no A no B. En el año 1989, mediante metodología de biología molecular de clonado y secuenciación se identificó el virus que causaba esta enfermedad, llamándolo virus de la hepatitis C (VHC), y la enfermedad Hepatitis C (Choo et al., 1989).

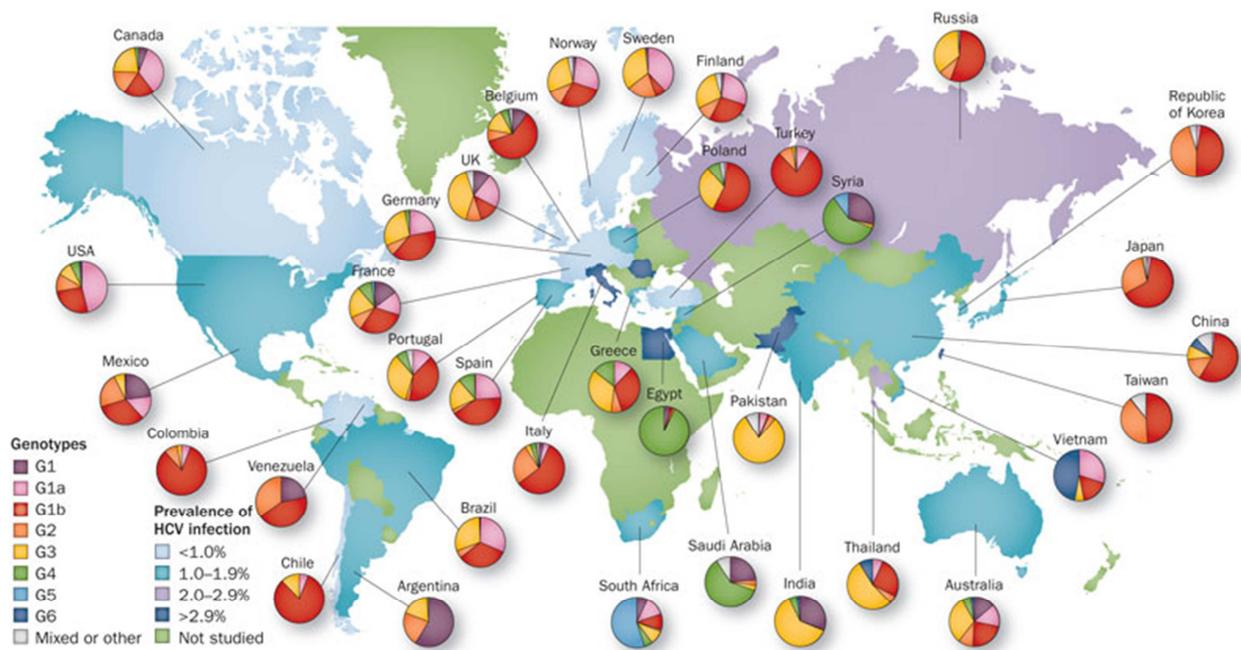
### **1.1.1. Epidemiología de VHC**

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

Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la prevalencia del virus estima que aproximadamente el 3% de la población mundial se encuentra infectada con el virus, afectando entonces entre 150-170 millones de personas. Además se estima que cada año se infectan entre 3 y 4 millones de personas y mueren, también por año, más de 350 mil personas (Sharma y Feld et al., 2014). Las muertes asociadas al VHC se deben principalmente a cirrosis o carcinoma hepatocelular (CHC), con 211 mil y 155 mil muertes por año respectivamente (Perz et al., 2006).

La prevalencia del VHC estimada, varía según la región geográfica siendo 5,3% para África, 4,6% para el este del Mediterráneo, 1,03% para Europa, 2,15% para el sudeste asiático y 3,9% para el oeste del Pacífico, existiendo variaciones notorias entre los diferentes países de estas regiones (Sy y Jamal, 2006). Existen 14 millones de personas crónicamente infectadas en América, 400 mil en Oceanía, 16 millones en el Este Medio, 17,5 millones en Europa, 28 millones en África y 83 millones en Asia (Lavanchy, 2011). La región Latinoamericana tiene una baja prevalencia en comparación con otras regiones del mundo, con una prevalencia estimada de alrededor de 8 millones (1,3%) de personas infectadas, variando entre los diferentes países y entre regiones de un mismo país (Szabo et al., 2012; Méndez-Sánchez et al., 2010) (figura 1.1).

En Uruguay no existen datos sobre la prevalencia de la infección por VHC en la población general. De todas formas se cuenta con datos de seroprevalencia en la población donadora de sangre, a través de los bancos de sangre donde se realiza el tamizaje y se estima en 0,43% (DLSP, 2002), pero puede aumentar a 10,1% en usuarios de drogas (Osimani et al., 2005) y 8,8% en usuarios de drogas no inyectables (Caiaffa et al., 2011).



**Figura 1.1. Prevalencia del VHC y distribución de sus genotipos en el mundo.** Se muestra la prevalencia de la infección de VHC en el mundo, así como también los genotipos circulantes, para aquellos países en los cuales se ha estudiado (Hajarizadeh et al., 2013).

### 1.1.2. Patogénesis de VHC

VHC infecta preferentemente células hepáticas, pero a pesar de ser este el sitio principal de replicación viral, existen evidencias de reservorios extra-hepáticos dentro de los cuales se encuentran los linfocitos, células epiteliales del intestino y sistema nervioso central. La baja densidad de flotación de la partícula viral le permite interactuar con lipoproteínas del suero. Esta interacción cercana con lípidos plantea la hipótesis de que al menos una porción de virus circulantes es internalizado en lipoproteínas del hospedero para formar una partícula “lipoviral”, lo que le permitiría conseguir un camuflaje para escapar a los anticuerpos neutralizantes.

En el 80% de los casos el virus genera una infección crónica, que puede desencadenar cirrosis (20%) y hepatocarcinoma (1-4%) (Rosen y Gretch, 1999; Mindikoglu et al., 2009).

La hepatitis C aguda puede comenzar de forma gradual o instantánea, pero tiene un curso limitado, rara vez dura más de uno o dos meses con un

máximo de seis meses. El daño celular hepático en el caso de la hepatitis C aguda es muy pequeño y rara vez causa daños que coloquen en riesgo la vida. El tiempo de incubación es de 6 a 10 semanas. Generalmente las personas que contraen la enfermedad aguda no presentan síntomas, suele aparecer de forma insidiosa, aunque pueden aparecer síntomas típicos de una hepatitis aguda como anorexia, malestar abdominal, hepatomegalia, náuseas, vómitos, fiebre, astenia o letargo, mialgia e ictericia (Orland et al., 2001). Alrededor del 20% de los pacientes eliminan el virus y a su vez aquellos pacientes que presentan síntomas, particularmente ictericia, son más propensos a eliminarlo. También existen factores genéticos del paciente como el gen IL28B que puede predecir la eliminación del virus así como también la respuesta al tratamiento con interferón (Sharma y Feld, 2014).

Generalmente la hepatitis C crónica es más grave, pero los pacientes que la sufren pueden experimentar diversos grados de severidad. Ésta persiste por períodos prolongados de tiempo. La misma se clasifica, en base a su gravedad, como hepatitis crónica persistente, que suele ser leve y no progresiva o lentamente progresiva, causando un daño limitado en el hígado y la hepatitis crónica activa, que implica gran daño hepático y de células más allá del tracto portal.

Aunque es ampliamente aceptado que aproximadamente el 80% de las personas infectadas no eliminan el virus y progresan a la infección crónica, existe gran incertidumbre en el pronóstico de la enfermedad ya que algunas personas infectadas se recuperan completamente; otros permanecen con viremia de VHC sin evidencia bioquímica de daño hepático; algunos parecen tener una forma estática de la hepatitis crónica caracterizada por niveles persistentemente elevados de aminotransferasas sin síntomas manifiestos o avance de la enfermedad; algunos pacientes progresan en un período difícil de definir a fibrosis histológica y cirrosis; otros tienen cirrosis estable a largo plazo identificada sólo a través de la biopsia de hígado; algunos desarrollan cirrosis progresiva que culmina en insuficiencia hepática; y, por último, algunos

desarrollan carcinoma hepatocelular. Las incertidumbres se encuentran en las frecuencias relativas y las tasas de desarrollo de estas diversas secuelas (Bostan y Mahmood, 2010).

Las secuelas producidas por el VHC son la principal causa de trasplante de hígado en los países occidentales. Algunos de los factores que pueden aumentar la severidad y/o disminuir el tiempo de progresión de la enfermedad son una viremia alta, la infección con el genotipo 1, la transfusión como vía de transmisión, deficiencias en el sistema inmune, el exceso en el consumo de alcohol, coinfección con otros virus como el VHB o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el grado de variabilidad genética viral, la edad superior a los 40 años y el sexo masculino (Bostan y Mahmood, 2010; Baldo et al., 2008; Sanyal, 2010).

### **1.1.3. Transmisión del VHC**

Las principales vías de transmisión en todo el mundo son: transfusiones, uso de drogas inyectables y procedimientos de inyección inseguros. Además otras vías de transmisión o factores de riesgo son: procedimientos relacionados con el cuidado de la salud o accidentes laborales en el personal de la salud expuesto a sangre, realización de tatuajes o perforaciones inseguras, infección con VIH, infección con VHB, vertical de madre a hijo y a través de relaciones sexuales sin uso de preservativo (Zaltron et al., 2012; El-Shabrawi y Kamal, 2013; Alter, 2011).

Las diferentes vías de transmisión varían según la región, pero principalmente según el estado de desarrollo del país. Los países desarrollados tienen como principal vía de transmisión el uso de drogas inyectables principalmente a través del uso compartido de jeringas pero también por diferentes factores de riesgo asociados a personas con este hábito, como por ejemplo infección con VIH, relaciones sexuales sin uso de preservativo (mayoritariamente en hombres que tienen relaciones con hombres), tatuajes o

perforaciones, y también por el uso de drogas vía nasal (El-Shabrawi y Kamal, 2013; Zaltron et al., 2012). Actualmente, la transmisión a través de transfusiones es infrecuente debido al tamizaje por inmunoensayo enzimático y detección de ácido nucleico en la sangre utilizada y los cuidados adecuados en los procedimientos y materiales utilizados en el área de la salud (Shepard et al., 2005).

Por otro lado, en los países en desarrollo, las inyecciones terapéuticas y transfusiones de sangre sin el tamizaje adecuado tienden a ser las principales vías de transmisión, especialmente en países donde los controles en la salud son escasos o nulos, como sucede en algunas regiones de África donde las condiciones no son las adecuadas y hasta se llegan a reutilizar jeringas (El-Shabrawi y Kamal, 2013; Shepard et al., 2005).

#### **1.1.4. Tratamiento de VHC**

El objetivo de la terapia es la erradicación de la infección por VHC con el fin de evitar las complicaciones de hígado relacionadas con el virus y enfermedades extrahepáticas, incluyendo necroinflamación hepática, fibrosis, cirrosis, CHC y la muerte.

El punto final de la terapia es la respuesta virológica sostenida (RVS), definida por ARN de VHC indetectable 24 semanas después de finalizar el tratamiento, según la evaluación de un método molecular sensible con un límite inferior de detección <15 UI/ml (RVS24). Estudios de seguimiento a largo plazo han demostrado que una RVS corresponde a una cura definitiva de la infección por VHC en más de 99% de los casos. La validez de la utilización de ARN del VHC indetectable a las 12 semanas después del final del tratamiento (RVS12) ha sido aceptada por los organismos reguladores en los EE.UU. y Europa, dado que la concordancia con la RVS24 es del 99%. Los pacientes con cirrosis siguen corriendo el riesgo de complicaciones que amenazan la vida, aunque a

una tasa más baja, incluso después de la infección viral se ha erradicado (EASL, 2014).

Hasta 2011, la combinación de interferón alfa pegilado (INF- $\alpha$ -peg) y ribavirina (RVB) era el tratamiento aprobado para la hepatitis C crónica. Con este régimen, los pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC tuvieron tasas de RVS de aproximadamente el 40% en América del Norte y el 50% en Europa Occidental. Las tasas de RVS más altas se lograron en pacientes infectados con los genotipos 2, 3, 5 y 6 (hasta aproximadamente 80%, y mejor para el genotipo 2 que para los genotipos 3, 5 y 6) y tasas de RVS intermedias en aquellos con genotipo 4. En 2011, telaprevir (TVR) y boceprevir (BOC) fueron autorizadas para su uso en pacientes con el genotipo 1. Estos dos fármacos son la primera generación de antivirales de acción directa (AAD), ambos dirigidos a la serin-proteasa NS3/4A de VHC, llamados inhibidores de proteasa (IP). Tanto TVR como BOC deben ser administrados en combinación con INF- $\alpha$ -peg/RBV.

Estos regímenes de terapia triple han demostrado ser eficaces para el tratamiento antirretroviral de pacientes con y sin tratamiento previo, incluyendo aquellos con respuesta nula a la terapia dual INF- $\alpha$ -peg/RBV (EASL, 2014).

#### 1.1.4.1. INF- $\alpha$ -peg

Los interferones son glicoproteínas de la clase de las citocinas. Reciben su nombre debido a su capacidad para interferir en la replicación de una amplia variedad de virus de ARN y ADN en las células hospedadoras. Se unen a receptores en la superficie de las células infectadas, activando diferentes vías de señalización en las que participan diversas proteínas antivirales (como la PKR).

El interferón alfa es un tipo de interferón con 14 isoformas importantes en la respuesta antiviral. Además el INF- $\alpha$ -peg se encuentra unido covalentemente a polietilenglicol retardando de esta forma la eliminación del

fármaco de manera que se consiguen niveles más constantes del mismo en sangre con dosis menos frecuentes. Además el INF- $\alpha$ -peg produce simultáneamente una activación de la respuesta inmunitaria del hospedero.

#### 1.1.4.2. Ribavirina

La RBV es un nucleósido sintético, que actúa como antiviral, de varias maneras, siendo la principal la mutagénesis letal (Vignuzzi et al., 2005; Ortega-Prieto et al., 2013).

#### 1.1.4.3. Terapia INF- $\alpha$ -peg y RBV

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

El tratamiento anti-VHC en los pacientes con cirrosis es menos efectivo que en pacientes no cirróticos. La erradicación viral reduce el riesgo de complicaciones hepáticas y aumenta supervivencia en pacientes no cirróticos. Sobre la base de datos de eficacia y tolerabilidad, la terapia tiene un efecto significativo en los pacientes con cirrosis compensada, mientras que los pacientes descompensados necesitan ponderar los riesgos versus los beneficios del tratamiento (Vezali et al., 2010).

Las guías actuales recomiendan que los pacientes con genotipos 2 y 3, se traten con INF- $\alpha$ -peg y dosis bajas de RBV durante 24 semanas, lo que resulta en una respuesta virológica sostenida de aproximadamente el 80%. Teniendo en cuenta estas altas tasas de respuesta, varios ensayos recientes han evaluado si el tratamiento más corto (12-16 semanas) podría ser rentable

en estos pacientes (Petta y Craxì, 2011). El genotipo 4 ha sido considerado como difícil de tratar basado en la baja RVS, a partir de datos obtenidos basados en regímenes convencionales con INF- $\alpha$ -peg. El tratamiento con INF- $\alpha$ -peg/RBV aumenta más del 60% la tasa de respuesta virológica sostenida para este genotipo (Kamal, 2011).

El genotipo 1 es tratado con INF- $\alpha$ -peg/RBV obteniendo baja RVS, por lo tanto la detección temprana de pacientes que no responden al tratamiento de VHC limita la exposición innecesaria a los tratamientos y sus efectos secundarios. Un algoritmo que combina anticuerpos basales contra la proteína NS4A y una PCR cuantitativa durante el tratamiento identifica pacientes no respondedores a una combinación de INF- $\alpha$ -peg/RBV después de 1 semana de tratamiento. La decisión de interrumpir la terapia a pacientes crónicos con genotipo 1 tratados con INF- $\alpha$ -peg/RBV puede realizarse con confianza después de 4 semanas de tratamiento basada en la ausencia de anticuerpos basales contra la proteína NS4A y una cantidad de ARN viral mayor de 100.000 UI / ml (Orlent et al., 2010).

#### 1.1.4.4 Triple terapia

Los pacientes infectados con el genotipo 1 de VHC que no lograron erradicar el virus en un tratamiento previo con INF- $\alpha$ -peg/RBV deben ser considerados para el tratamiento con la triple terapia basada en IP. La terapia triple aumenta las tasas de RVS de 29 a 88%, dependiendo del tipo de falta de respuesta anterior y del estado de la enfermedad hepática. Un re-tratamiento con INF- $\alpha$ -peg/RBV, sin la adición de un IP, se asocia con bajas tasas de RVS. En general, las mismas contraindicaciones se aplican a la triple terapia TVR o BOC e INF- $\alpha$ -peg/RBV como a la terapia dual con INF- $\alpha$ -peg/RBV. En los pacientes con cirrosis compensada, el tratamiento debe realizarse con especial cuidado, ya que la incidencia de efectos secundarios (especialmente trastornos hematológicos e infecciones graves) es significativamente mayor en

la triple terapia frente a la terapia dual INF- $\alpha$ -peg/RBV, sobre todo cuando la albúmina sérica es <3,5 g/dl o las plaquetas <100.000 antes de iniciar el tratamiento (EASL, 2014).

El tratamiento estándar aprobado por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado para el cuidado y erradicación del virus en una hepatitis C crónica es la combinación de INF- $\alpha$ -peg/RBV y TVR o BOC para el genotipo 1 y la combinación de INF- $\alpha$ -peg/RBV por los genotipos 2, 3, 4, 5 y 6 (EASL, 2014).

#### 1.1.4.5 Futuro del tratamiento

Se ha avanzado mucho sobre los nuevos blancos para el tratamiento de la enfermedad, ya que se ha descrito la emergencia de mutantes resistentes a la RBV en pacientes sometidos a esta terapia. En todos los casos la mutación consiste en un único cambio en la posición 415 de la polimerasa viral de fenilalanina a tirosina, lo que estaría confirmando el efecto de la RBV a nivel de la replicación viral (Young et al., 2003). Además, la enfermedad hepática asociada a VHC es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal, en terapia de reemplazo renal, y después del trasplante renal, donde la terapia actual no puede ser utilizada debido a que puede llevar al rechazo del órgano trasplantado (Burra et al., 2014).

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

Existen otros AAD en diferentes etapas de desarrollo clínico, algunos de ellos orientados hacia el genotipo 1, así como también a otros genotipos. Algunos fármacos en investigación incluyen inhibidores de segunda generación de la serin-proteasa NS3/4A, nucleósidos/nucleótidos y no nucleósidos

inhibidores de la ARN polimerasa dependiente de ARN (ApAd), e inhibidores de la proteína NS5A. Además, incluyen el estudio de drogas antivirales dirigidas al hospedero, tales como los inhibidores de la ciclofilina, que dirige funciones de la célula huésped involucradas en el ciclo replicativo del VHC (EASL, 2014).

Nuevas estrategias terapéuticas apuntan hacia una mayor eficacia, la actividad pan-genotípica, duración del tratamiento de corta duración, una administración más sencilla y una mejor tolerabilidad y adherencia de los pacientes. Es muy probable que regímenes libres de INF (o reducido al mínimo) con o sin ribavirina, que se están evaluando en ensayos clínicos, entrarán en la práctica clínica en los próximos años (EASL, 2014).

Dentro de estas nuevas estrategias, el Sofosbuvir (SOF) es el primer compuesto para entrar en el mercado con regímenes de combinación libres de IFN. El SOF pertenece a los inhibidores de nucleótidos de la polimerasa viral y actúa como un terminador de cadena durante el proceso de replicación del VHC, exhibiendo actividad antiviral pan-genotípica con una elevada barrera a la resistencia. Tiene una gran RVS al ser administrado junto a RBV principalmente contra el genotipo 2. De todas formas aún se espera mejorar la RVS para el resto de los genotipos que son más difíciles de tratar, para los cuales se intentaría combinar diferentes clases de AAD, siendo necesarias más investigaciones sobre las interacciones droga-droga y posibles efectos secundarios (Degasperi y Aghemo, 2014). Dentro de los casos de terapia combinada de AAD libres de INF tenemos la terapia con SOF y ABT-450 que ha mostrado resultados prometedores (Zeng et al., 2013).

#### **1.1.5. Co-infección VHC-VIH**

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

La coinfección de VHC y VIH ha tomado mayor importancia desde la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa y la mejora dramática en la esperanza de vida del paciente infectado con VIH, así como también el impacto del VHC sobre la mortalidad y el desarrollo del CHC (Mohsen et al., 2002).

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

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

Sin embargo, incluso estos datos pueden subestimar la verdadera prevalencia del VHC entre pacientes VIH positivos ya que al menos el 4% de los pacientes coinfectados no tienen anticuerpos anti-VHC detectables, cuyos títulos han disminuido aún en presencia de viremia de VHC, como resultado de la inmunosupresión (Mohsen et al., 2002).

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

La enfermedad hepática asociada a VHC, incluyendo fibrosis, cirrosis y la enfermedad en fase terminal del hígado (EFTH), se acelera en personas infectadas por el VIH. La progresión a cirrosis es tres veces superior en pacientes coinfectados que en mono infectados y aproximadamente el 33%

progresa a cirrosis en menos de 20 años (Kim y Lauer, 2007; Operskalski y Kovacs, 2011).

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

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

Existen guías para el tratamiento de VHC en pacientes coinfectados pero no hay consenso en cuanto a los factores clave que podrían definir el inicio y duración del tratamiento, incluyendo la etapa de la infección con VIH, la carga viral y genotipo del VHC, el grado de fibrosis hepática y la preparación del paciente a tolerar y adherirse al tratamiento (Operskalski y Kovacs, 2011).

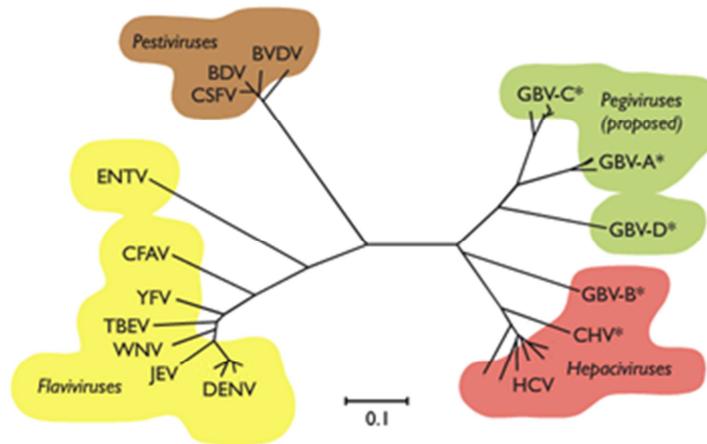
## 1.2. El Virus de la Hepatitis C

### 1.2.1. Clasificación

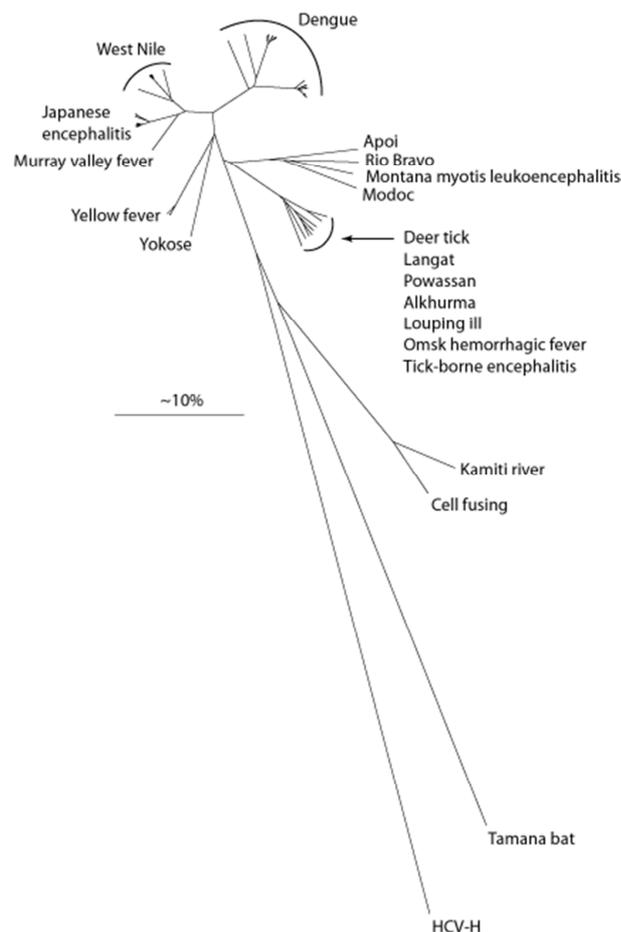
El VHC es miembro del género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. La estructura y organización del VHC se asemeja de forma más cercana a la de los *Flavivirus* y los *Pestivirus* pero a su vez difiere de la mayoría de los miembros de esta familia, los cuales son transmitidos por vectores, en algunos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

Los virus de ARN simple cadena de polaridad positiva se encuentran clasificados en 3 superfamilias basado en la relación evolutiva de sus ApAd, y la familia *Flaviviridae* pertenece a la superfamilia 2. El nombre de la familia *Flaviviridae* proviene del latín *flavus*, que significa amarillo. Este nombre se debe al virus de la fiebre amarilla, primer virus humano descubierto y uno de los principales miembros de la familia. Los *Flaviviridae* se dividen en 4 géneros llamados *Pestivirus*, *Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus* (figura 1.2). Algunos de los principales virus miembros del género *Pestivirus* son los virus de la diarrea viral bovina 1 y 2, dentro del género *Flavivirus* se encuentra el ya mencionado virus de la fiebre amarilla, los virus del dengue 1-5, el virus de la encefalitis japonesa, el virus del oeste del Nilo y dentro del nuevo género *Pegivirus* (el cual se encuentra aún en proceso de confirmación por parte de los taxonomistas) encontramos los virus GB A, C y D (Lindenbach et al., 2013).

Dentro del género *Hepacivirus* encontramos además del VHC, otros miembros que se encuentran en proceso de confirmación taxonómica como los casos del virus GB B y el hepacivirus canino; siendo este género el que posee mayor distancia genética respecto al resto de la familia (Lindenbach et al., 2013) (figura 1.3).



**Figura 1.2. La familia *Flaviviridae*.** Árbol filogenético, realizado con el método de Neighbor-joining, de las ApAd. Se pueden apreciar los 4 géneros dentro de la familia con sus virus más relevantes. En amarillo el género *Flavivirus*, en marrón el género *Pestivirus*, en rojo el género *Hepacivirus* y por último en verde el nuevo género propuesto como *Pegivirus* (Modificado de Lindenbach et al., 2013).



**Figura 1.3. Árbol filogenético de la familia *Flaviviridae*.** Árbol Neighbor-joining de un alineamiento de genomas completos con eliminación de gaps. Se puede apreciar la distancia genética entre VHC y el resto de los miembros de la familia (Tomado de la base de datos LANL, [www.hcv.lanl.gov](http://www.hcv.lanl.gov)).

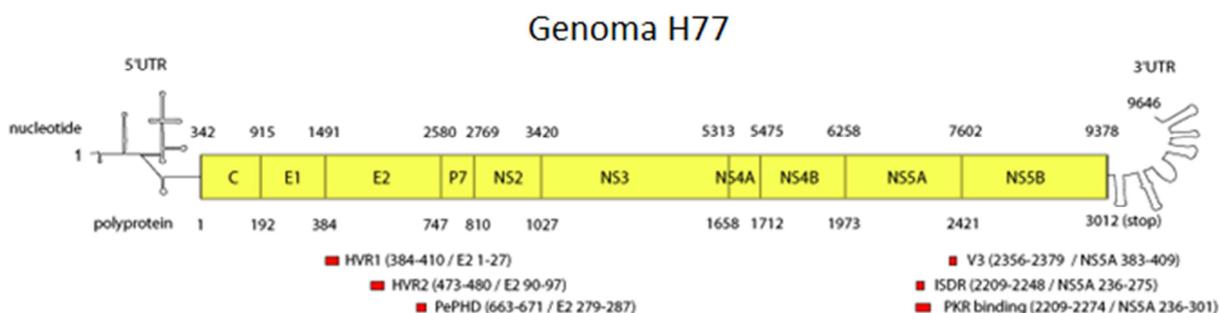
### **1.2.2. Morfología**

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

### **1.2.3. Estructura y organización del genoma**

El genoma del VHC está constituido por una única molécula de ARN de aproximadamente 9,6 kb con polaridad positiva y un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica una poliproteína de unos 3.000 aminoácidos (aa) aproximadamente variando según el aislado y el genotipo. El ORF está flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR) en los extremos 5' y 3' respectivamente. La poliproteína precursora es co-traduccionalmente y post-traduccionalmente procesada por proteasas celulares y virales a nivel de la membrana del retículo endoplásmico para producir 10 proteínas maduras, divididas desde el extremo 5' al 3' en 3 estructurales, core, E1 y E2, una proteína, p7, que separa las proteínas estructurales de las no estructurales y 6 proteínas no estructurales, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Lindenbach et al., 2013) (figura 1.4).

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



**Figura 1.4. Genoma del VHC.** Esquema del genoma completo de referencia de VHC. En amarillo se muestra el marco abierto de lectura con sus proteínas, estructurales y no estructurales. En ambos extremos se muestran las regiones no codificantes con sus respectivas estructuras secundarias. En la parte superior se indican las posiciones nucleotídicas del ARN y abajo las posiciones aminoacídicas de la poliproteína. (Modificado de LANL, [www.hcv.lanl.gov](http://www.hcv.lanl.gov)).

### 1.2.3.1. Regiones no codificantes (NCR)

El ORF está flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR) en los extremos 5' y 3' de 341 y aproximadamente 230 nucleótidos respectivamente. Ambas regiones tienen estructuras de ARN altamente conservadas esenciales para la traducción del ARN viral y la replicación del genoma (Krekulová et al., 2006).

El extremo 5' NCR se compone de cuatro dominios altamente estructurados y contiene el sitio interno de entrada ribosomal (IRES) que se une a la subunidad 40S ribosomal e inicia la traducción del ARN viral y la síntesis de la poliproteína de manera cap-independiente a través de múltiples interacciones que generan complejos binarios muy estables sin la utilización de factores de iniciación canónicos celulares (Krekulová et al., 2006).

La región 3'NCR consiste en estructuras estables tallo-bucle y un tracto interno poli (U) (Bostan y Mahmood, 2010). Esta región aumenta la eficiencia de traducción del genoma viral y se cree que sirve como cebador para la síntesis del ARN (Krekulová et al., 2006).

### 1.2.3.2. Proteínas estructurales

La proteína básica altamente conservada core, componente principal de la nucleocápside de VHC, forma un complejo ribonucleoproteico con el genoma viral. La secuencia del genoma que codifica para esta proteína está altamente conservada incluso dentro de los diferentes genotipos de VHC (Krekulová et al., 2006). La proteína core existe en 2 o 3 formas con una masa molar de 21 kDa, 19 kDa y 16 kDa (Lo et al. 1995).

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

#### 1.2.3.3. Proteínas no estructurales

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

Hacia el extremo 3' encontramos la región que codifica para las restantes 6 proteínas no estructurales: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (figura 1.5).

La NS2 es una proteína de membrana que contiene tres dominios transmembrana N-terminal y un dominio cisteín-proteasa C-terminal. El plegado del dominio cisteín-proteasa requiere la homodimerización para formar una única enzima con dos sitios activos. El único sustrato que se conoce de esta

proteasa es la unión NS2/3. Mientras NS2 es prescindible para la replicación del ARN de replicones subgenómicos, se requiere la actividad proteasa de la NS2 para el procesamiento de la poliproteína y la replicación del ARN de longitud completa (Lindenbach, 2013).

La NS3 es una proteína multifuncional de 70 kDa, tiene un dominio serín-proteasa en el tercio N-terminal y en los dos tercios C-terminal un dominio NTPasa y ARN helicasa. La escisión entre NS2 y NS3 se produce por la proteasa NS2 como se mencionó anteriormente, mientras que la proteasa NS3-4A es responsable del procesamiento en los sitios de escisión *downstream*. El procesamiento de la poliproteína mediado por la proteasa NS3-4A sigue un orden preferencial. La primera división se produce en *cis* en el sitio de NS3/NS4A. Eventos de procesamiento posteriores pueden ser mediados en *trans*, con un procesamiento rápido en el sitio NS5A/NS5B para producir un NS4A-5A intermediario. La escisión mediada por NS3-4A a continuación, se produce entre NS4A y NS4B, para producir un precursor relativamente estable de NS4B-5A, y, finalmente, entre NS4B y NS5A. La función NTPasa/ARN helicasa de la NS3 es esencial para la replicación del ARN del VHC y también tiene un rol en el ensamblaje de partículas virales al unirse a la proteína core. Sin embargo, su función precisa viene siendo difícil de dilucidar (Morikawa et al. 2011; Lindenbach, 2013).

La NS4A es una proteína de 54 aa siendo la proteína no estructural más pequeña. La función principal es actuar como cofactor de la NS3, con la cual forma un complejo no covalente. La porción central de NS4A es requerida para el plegamiento apropiado de NS3. La porción hidrófoba N-terminal de NS4A forma una hélice transmembrana necesaria para la asociación de membrana integral del complejo NS3-4A, mientras que la porción ácida C-terminal se ha demostrado que interactúa con otros componentes para contribuir a la replicación del ARN y el ensamblaje de las partículas virales (Morikawa et al. 2011). La NS4A es importante también en la hiperfosforilación de la NS5A (Lindenbach et al., 2007).

La NS4B es una proteína integral de membrana con cuatro segmentos transmembrana en su región central. La parte N-terminal comprende dos alfa hélices anfipáticas de las cuales la segunda tiene el potencial de atravesar la bicapa de la membrana. La región C-terminal comprende, aparentemente, una alfa hélice altamente conservada, una alfa hélice anfipática asociada a la membrana y dos sitios de palmitilación. NS4B interactúa con otras proteínas no estructurales virales y puede unirse al ARN viral. Además, se encontró que alberga una actividad NTPasa (Gouttenoire et al., 2010). Por último, NS4B tiene un papel en el ensamblaje viral pero aún no está claro si actúa de forma directa o indirecta (Lindenbach, 2013).

NS5A es una fosfoproteína de unión al ARN que desempeña múltiples funciones en el ciclo replicativo del virus. NS5A es una zinc metaloproteasa organizada en tres dominios, el dominio I, que se pliega en una estructura inusual y media la homodimerización, el dominio II, el cual es conservado y probablemente se encuentra desplegado en su forma nativa y el dominio III, que es menos conservado y tolera grandes inserciones y deleciones y dos regiones de baja complejidad que separan a estos dominios. NS5A juega un papel esencial en el ensamblaje de las partículas virales, en gran parte a través de los factores determinantes en el dominio III. Específicamente, el ensamblaje del virus requiere la fosforilación de un residuo de serina en el dominio III por la caseína quinasa II $\alpha$  (Tellinghuisen et al., 2008). Por otro lado, los datos genéticos y bioquímicos indican que el dominio III codifica determinantes para la asociación transitoria o débil con el complejo p7-NS2. De manera similar a NS3, mutaciones en la NS5A que mejoran la replicación del ARN, disminuye la tasa de ensamblaje del virus, lo que sugiere que la NS5A puede contribuir al cambio entre la replicación y el ensamblaje viral (Lindenbach, 2013).

NS5B es la ApAd que replica el genoma viral. Ésta también ha sido implicada en el ensamblaje y maduración del virus mediante interacciones con p7 y NS2 (Gouklani et al., 2012). Es una proteína hidrófila de 68 kDa (591 aa) y contiene el motivo GDD, que es común a todas las ApAd virales. La

actividad bioquímica de ApAd es dependiente de cationes divalentes ( $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ ), pH cercano al neutro y una muy baja concentración de sales. La tasa estimada de polimerización es de 150-200 nucleótidos por minuto y no depende de la concentración de polimerasa. Como se mencionó anteriormente la presencia de cationes  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  es esencial para la actividad óptima de ApAd, ya que actúan como cofactores. En presencia de  $Mn^{2+}$  la actividad ApAd es 20 veces mayor que en la presencia de iones  $Mg^{2+}$  (Krekulová et al., 2006).

La NS5B se encuentra anclada al retículo endoplasmático por su hélice transmembrana C-terminal, con el dominio polimerasa en el lado citosólico. Ningún dominio metil-transferasa (MTasa) se encuentra dentro de la proteína NS5B del VHC, de acuerdo con una estrategia de traducción de ARN viral que implica un sitio de entrada interno del ribosoma tanto para *Hepacivirus* como para *Pestivirus* (Caillet-Saguy et al., 2014).

La estructura cristalina de NS5B de VHC fue la primera estructura completa de una ApAd. Se confirmó que la arquitectura general de las polimerasas se conserva en todas las ApAd virales. Esta estructura se asemeja a una mano derecha con tres subdominios denominados, dedos, palma y pulgar. En la estructura de NS5B de VHC además se encuentran otros tres elementos estructurales especiales. Primero, NS5B alberga una extensión de los dedos llamada yema de los dedos que une los dominios dedos y pulgar en la parte posterior de la ApAd, dejando sólo un estrecho túnel para el acceso de nucleótidos entrantes al sitio catalítico. Una segunda característica de la estructura es un bucle  $\beta$  que se inserta en el pulgar y que sobresale hacia el sitio activo. Este bucle  $\beta$ , también llamado bucle iniciador o bucle cebador, así como el cierre y el volumen del pulgar parecerían evitar la salida del extremo 5' de la cadena de ARN cebador en modelos de elongación ternarios de tipo polimerasa-plantilla-cebador. El bucle  $\beta$  también está presente en la polimerasa de *Flavivirus* y de *Pestivirus*, pero no en otras ApAd virales de estructura conocida. Este bucle  $\beta$  así como el extremo C-terminal son esenciales para la síntesis de ARN *de novo*. Ambas estructuras están dirigidas al sitio activo y

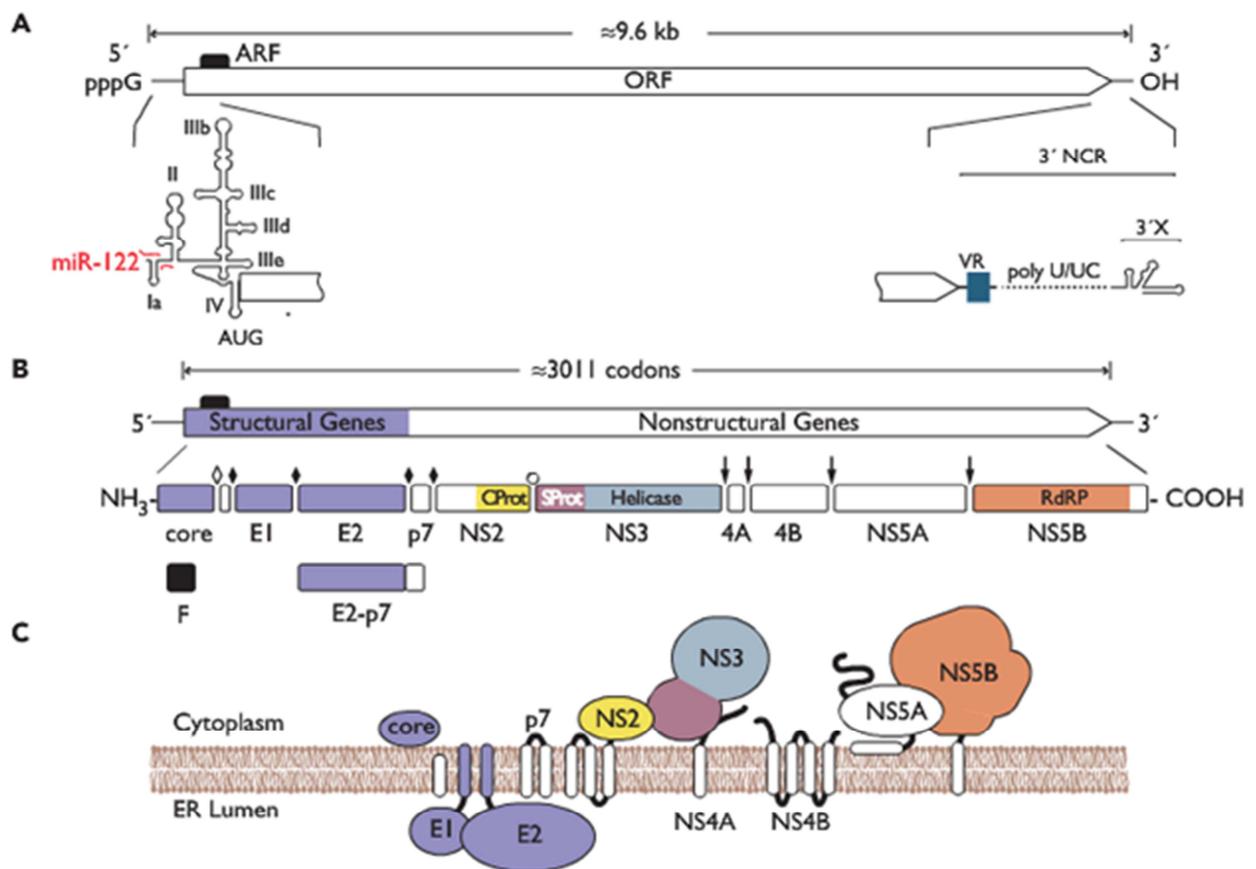
constituyen la plataforma en la que el primer nucleótido debe colocarse. Una vez que se añade el primer nucleótido, estos dos dominios deben ser reubicados para proporcionar espacio suficiente para alojar el ARN de doble cadena (ARNdc). Esta reubicación implica una compleja reorganización estructural en la polimerasa y por lo tanto se piensa que es el paso más crítico durante la replicación del ARN. Estas conversiones entre conformaciones abiertas y cerradas son importantes en el ciclo catalítico de algunas polimerasas de ácido nucleico como la transcriptasa reversa del VIH o la propia NS5B de VHC, entre otras (López-Jiménez et al., 2014). Por último, la tercera sorpresa en la estructura de la polimerasa es el posicionamiento de unos 40 residuos *downstream* del dominio de la polimerasa que conectan este dominio y el anclaje transmembrana *in vivo* y que por esta razón se denomina enlazador. Este enlazador siempre se organiza como un largo bucle alrededor del pulgar que obstruye la parte frontal de la NS5B mediante el establecimiento de contactos específicos con el bucle  $\beta$ . Con esta ubicación, el enlazador impide la salida del extremo 3' de la cadena de ARN molde y también contribuye a mantener el pulgar en una conformación cerrada (Caillet-Saguy et al., 2014).

Por último es importante mencionar la región Okamoto de la NS5B (del nucleótido 8282 al 8610 en referencia a la secuencia H77 con número de acceso AF009606), una pequeña región altamente conservada muy utilizada para realizar estudios de: filogenia, filodinámica y filogeografía; por su capacidad para representar toda la diversidad genética de NS5B, la cual es a su vez también representativa de la variabilidad genética del genoma completo viral (Hraber et al., 2006).

#### 1.2.3.4. Marco alternativo de lectura (proteína F)

VHC tiene un marco de lectura alternativo (ARF) que se superpone con el gen de la proteína core. El marco de lectura superpuesto distingue VHC de

todos sus parientes virales conocidos, con la posible excepción del GBV-B. El ARF se expresa durante infecciones naturales por VHC y estimula las respuestas inmunitarias específicas. Al igual que varios genes esenciales en otros virus (por ejemplo, la polimerasa del VIH), el ARF carece de un codón de inicio AUG dentro del marco, lo que sugiere que su expresión implica eventos inusuales a nivel de la traducción. Los estudios *in vitro* indican que el cambio del marco por los ribosomas puede ser uno de varios procesos que pueden llevar a la traducción de la ARF. El cambio de marco produce proteínas quiméricas que tienen segmentos codificados en el gen core unidos covalentemente a los aminoácidos codificados en el ARF. Las funciones de las proteínas del marco alternativo de lectura (ARFPs) en el ciclo replicativo del VHC no se conocen aún. Hay una posibilidad significativa de que las ARFPs puedan ser responsables de algunos de los efectos atribuidos a la proteína core, dado que la mayoría de los estudios encaminados a definir la función de esta última han empleado materiales que pueden contener una combinación de la proteína núcleo y ARFPs. Los efectos observados de la proteína core incluyen la inducción de cáncer de hígado, la transformación de las células, y las alteraciones de la respuesta inmune. Se considera también la posible utilidad de ARFPs en las vacunas (Branch et al., 2005; Cristina et al., 2005).



**Figura 1.5. Estructura del genoma y expresión de la poliproteína de VHC.** **A.** Estructura del genoma de VHC. Se describen: marco abierto de lectura (ORF), marco alternativo de lectura (ARF) y las dos regiones no codificantes del ARN con sus estructuras (5' NCR y 3' NCR). **B.** Procesamiento de la poliproteína y productos del clivaje. Arriba, se observa el genoma viral, en violeta los genes estructurales y en blanco los genes no estructurales. Abajo, las proteínas maduras generadas. Se indican los sitios de clivaje (↓) para proteasas del hospedero, (★) para la serín-proteasa viral y (⊙) para la cisteín-proteasa viral. **C.** Topología de la poliproteína en la membrana. Se muestra la orientación propuesta de las proteínas virales en la membrana. Las proteínas están aproximadamente a escala (según la cantidad de aminoácidos) y ordenadas desde el extremo 5' al 3' respecto al ORF genómico viral. (Modificado de Lindenbach et al., 2013).

#### 1.2.4. Ciclo replicativo del VHC

**Unión y entrada a la célula:** El primer paso en el ciclo de vida de un virus es la unión de la partícula infecciosa a la célula hospedera, que requiere la interacción entre un receptor de la superficie celular y una proteína de unión en la superficie de la partícula viral. CD81 fue identificado como receptor de VHC en base a su fuerte interacción con E2 (proteína de unión de VHC), así como con las partículas virales *in vitro*. El VHC también puede entrar en la célula por unión a receptores de la lipoproteína de baja densidad (LDL). E1

está involucrada en la fusión de membranas. E2 actúa también como una chaperona para E1, la cual en ausencia de E2 forma agregados mal plegados (Bostan y Mahmood, 2010). Después de la unión inicial del VHC a sus receptores SRB1 y CD81, la partícula viral interacciona con las proteínas de unión CLDN1 y OCLN y finalmente entra en las células por endocitosis mediada por receptor (figura 1.6, paso 1). Posteriormente el genoma de ARN viral se libera en el citoplasma (Bartenschlager et al., 2013).

**Traducción y procesamiento de la poliproteína:** Una vez dentro del citoplasma, el ARN genómico viral se traduce directamente ya que es reconocido como ARNm debido a que tiene la misma polaridad que un ARNm celular. La traducción del ARN viral no está mediada por un mecanismo cap-dependiente sino por la iniciación interna de la traducción a través del IRES. Dirigida por el IRES, la poliproteína se traduce en el retículo endoplasmático rugoso y se escinde co- y post-traduccionalmente en las proteínas maduras (figura 1.6, paso 2), tanto por proteasas de la célula huésped así como por dos proteasas virales (Bostan y Mahmood, 2010). Las proteínas virales, en conjunción con factores de la célula huésped, inducen la formación de un compartimento membranoso denominada red membranosa (MW) compuesta de vesículas simples, dobles y multi membranosas, así como gotas de lípidos (LD) (Bartenschlager et al., 2013) (figura 1.6, paso 3).

**Replicación del ARN:** La replicación del ARN se produce en un sitio no especificado dentro de la red membranosa y a través de una copia de sentido negativo de ARN (ARN(-)) que sirve como plantilla para la producción de cantidades en exceso de ARN de sentido positivo (ARN(+)) para la progenie (Bartenschlager et al., 2013) (figura 1.6, paso 4). La polimerasa viral cataliza la síntesis tanto de la hebra negativa como de la positiva. Secuencias en el extremo 3' se pueden plegar intramolecularmente y formar una horquilla que permite hibridar y generar un extremo 3' que funciona como cebador y es utilizado para la elongación. Utilizando las altas concentraciones de GTP o ATP, la polimerasa puede sintetizar un cebador de ARN. Otros factores virales y

celulares son necesarios, como la helicasa NS3 que elimina estructuras estables en el molde de ARN y facilita la replicación o la fosfoproteína NS5A que está implicada en la regulación de la replicación del ARN. Además, un componente celular, denominado PTB, interactúa con las secuencias en el extremo 3'. La gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa se une a la secuencia poli (U) en el extremo 3'. Otras proteínas celulares involucradas en la replicación son las llamadas p87 y p130. Proteínas de otros virus también podrían potenciar la replicación al activar la transcripción de genes celulares (Bostan y Mahmood, 2010).

**Ensamblaje y liberación del virus:** El ensamblado de las partículas virales se inicia probablemente en las proximidades del ER y las LD, donde se acumulan la proteína core y el ARN viral. La formación de partículas puede ser iniciada por proteínas core que interactúan con el genoma de ARN. Dicha interacción, no sólo puede promover una encapsidación selectiva del genoma de cadena positiva sino que también parece reprimir la traducción a través del IRES, lo que sugiere un potencial mecanismo para cambiar de traducción/replicación a ensamblado. La nucleocápside viral adquiere su envoltura (E1 y E2) por gemación a través de las membranas del RE (figura 1.6, paso 5) y en este caso el virus es exportado a través de la vía secretora constitutiva (figura 1.6, paso 6) (Bostan y Mahmood, 2010; Bartenschlager et al., 2013).

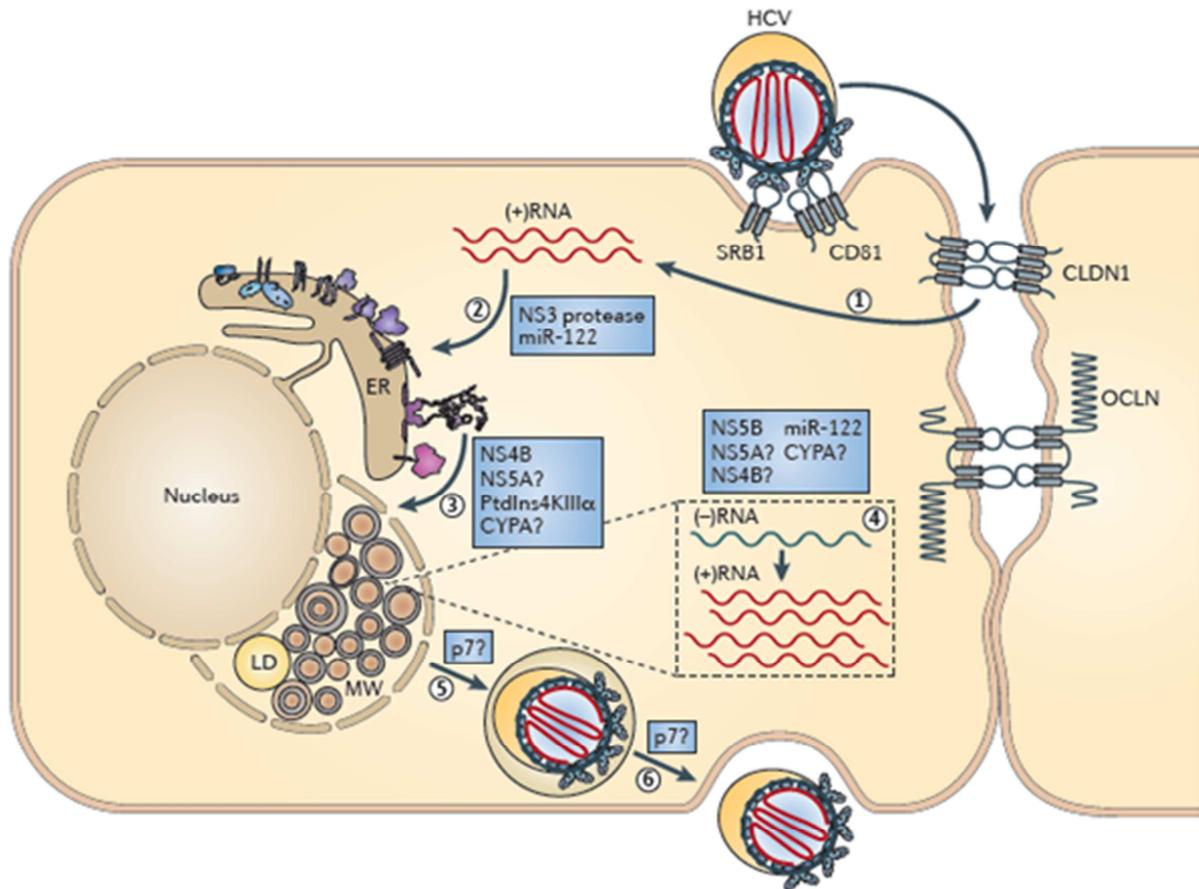


Figura 1.6. Ciclo de replicación del VHC. Se describen los pasos del ciclo de acuerdo a Bartenschlager y colaboradores (2013).

### 1.2.5. Variabilidad Genética de VHC

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

La región del core está relativamente bien conservada, con similitud de secuencias de nucleótidos que van desde 81% (máxima diversidad) y el 88%

(mínima diversidad) entre las estirpes de diferentes genotipos. La región amino-terminal de E2 constituye una región hipervariable. El segmento de 28 aminoácidos de esta región presenta más del 50% de variación en las distintas estirpes. Regiones muy variables son también la hipervariable 2 de E2 al igual que la NS5A, E1 y E2. Por otro lado, regiones conservadas son 5'NCR, NS5B y NS3.

Una tasa de mutación de aproximadamente  $1,4 \times 10^{-3}$  sustituciones de bases por nucleótido por año ha sido estimada para todo el genoma (Cuthbert, 1994; Simmonds, 2004). La tasa de mutación de la mayoría de los virus de ARN varía de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  sustituciones por sitio por año, que se considera un reflejo de la falta de capacidad de corrección de errores de sus ApAd. La expectativa de la teoría neutral acerca de que la diversificación se produce a un ritmo constante en el tiempo está implícita en los intentos de utilizar esta tasa para calcular los tiempos de propagación del VHC. De todas formas, evidencia tanto de evolución "darwiniana" como de evolución neutral es encontrada en las secuencias del VHC. Un posible ejemplo de cambio adaptativo en el VHC es la rápida evolución de la región hipervariable de la glicoproteína de la envoltura E2 para impedir el reconocimiento por los anticuerpos inducidos por la infección. Por otra parte, la deriva 'neutral' de la secuencia, sin duda, representa gran parte de la diversidad genética que se observa entre las poblaciones geográficamente o epidemiológicamente separadas del VHC. Este proceso de divergencia resultante de la fijación de cambios neutrales en la secuencia no altera el fenotipo de los virus en gran medida (Cuthbert, 1994; Simmonds, 2004).

A pesar de la diferencia de secuencia, mayor al 30% que se observa entre los genotipos del VHC, cada uno conserva un ciclo de replicación similar en el huésped humano. De hecho, su capacidad compartida de establecer infecciones persistentes en los seres humanos con títulos de alta infectividad en la sangre y causar una infección lentamente progresiva y asintomática en gran parte son factores clave en la transmisión. Esta falta de innovación

fenotípica durante un período muy largo de evolución divergente demuestra, tal vez, cómo la evolución del VHC está conformada y limitada en su totalidad por su adaptación a las células que infecta. Al igual que otros virus de ARN, el genoma del VHC en un paciente individual es una población mixta de un importante número de estirpes altamente relacionadas entre sí a nivel filogenético, las cuales son denominadas quasiespecies, con una secuencia consenso dominante para la mayoría de las estirpes (Cuthbert, 1994; Simmonds, 2004).

### **1.2.6. Genotipos**

En la última actualización realizada este año (2014) con genomas completos o casi completos, se resolvieron problemas de nomenclatura para la designación de genotipos y se determinó el uso de un criterio consenso, creando así, una clasificación de VHC en 7 genotipos y 67 subtipos distintos confirmados (Smith et al., 2014). Quedan por resolver aún 22 secuencias de genomas completos las cuales permanecen sin un subtipo asignado. Además se desarrolló una página web controlada por el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV) que mantiene y actualiza regularmente tablas con las estirpes de referencia, sus números de acceso y alineamientos anotados. La página web donde se puede encontrar dicha información es [http://talk.ictvonline.org/ictv\\_wikis/w/sg\\_flavi/default.aspx](http://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/w/sg_flavi/default.aspx). Además, el Grupo de Estudio de Flaviviridae pide a todos aquellos que necesiten chequear o proponer nuevos genotipos o subtipos de VHC que se contacten con ellos para la publicación de nuevos genotipos o subtipos para así evitar que aparezcan en la literatura problemas de nomenclatura (Smith et al., 2014).

Esta recomendación es importante de llevar a cabo debido al número creciente de nuevas secuencias de genomas completos de VHC que pasó de 238 en 2005 a más de 1300 en la actualidad, las más de 225 mil secuencias parciales disponibles en Genbank, además del retraso en la publicación de las

mismas, lo cual podía llevar a identificar dos secuencias distintas con el mismo nuevo subtipo.

Los análisis filogenéticos de secuencias con más del 95% de la región codificante revelaron entonces los 7 principales grupos filogenéticos correspondientes a los genotipos 1-7. Dentro de estos genotipos, el agrupamiento de los diferentes subtipos que los constituyen tiene un soporte de 100% de réplicas de bootstrap (Smith et al., 2014) (figura 1.7).

Basado entonces en el criterio consenso, los subtipos confirmados requieren la secuencia del genoma completo, que tenga diferencia en al menos el 15% de las posiciones nucleotídicas y se cuente con secuencias de al menos otras dos estirpes para la región core/E1 (con más del 90% de la secuencia correspondiente a la posición 869-1292 del genoma de referencia H77, número de acceso AF009606) y la región NS5B (más de 90% de la secuencia correspondiente a la posición 8276-8615 también de H77, número de acceso AF009606) (Smith et al., 2014).



### 1.2.7. Distribución geográfica de cada genotipo

Si bien VHC es un virus pandémico, los genotipos y subtipos se distribuyen siguiendo un patrón geográfico de circulación. Los genotipos 1 al 3 tienen una distribución global. Los genotipos 4 y 5 se encuentran principalmente en África, y el genotipo 6 se distribuye en Asia (figura 1.1). Las áreas endémicas para los genotipos específicos se encuentran en África Occidental (genotipos 1 y 2), África Centro-Oeste (genotipo 4), el subcontinente indio (genotipo 3), África Central (genotipo 4) y el sudeste de Asia (genotipo 6). No se ha encontrado un área endémica para el genotipo 5, a excepción de un pueblo en el centro de Francia, donde la infección con VHC 5a de la población local se asoció a vivir en una zona rural llamada Vic-le-Comte (Abergel et al., 2007).

Cuando se encuentra una diversidad limitada de los subtipos de VHC en una zona geográfica determinada, ésta puede atribuirse a la reciente introducción de VHC en la población, como se ha documentado para Canadá o Australia. La epidemiología molecular del genotipo 2 apunta a África occidental y central, principalmente a lo largo de la costa atlántica, como su lugar de origen endémico. Se ha encontrado una propagación hacia el este desde la costa de África Occidental a Camerún, que tuvo lugar a lo largo de varios siglos (Markov et al., 2009; Lavanchy, 2011).

Análisis con reloj molecular datan al ancestro común de VHC en Guinea-Bissau, en torno a 1470. Aislados de Madagascar y Martinica sugieren que la trata de esclavos histórica y la posible exposición a VHC parenteral durante las campañas de salud pública llevadas a cabo durante la época colonial pueden haber desempeñado un papel en la difusión de los genotipos 2a y 2c (Markov et al., 2009).

La distribución geográfica de los genotipos del VHC y la tasa de variación genética son consistentes con la distribución global de VHC, y son compatibles con una larga historia de infección en la mayoría de las

poblaciones del mundo, precediendo, en muchos lugares geográficos, la era de la medicina moderna por muchos siglos (Lavanchy, 2011).

### **1.2.8. Mutación**

A nivel de ADN y ARN, hay dos tipos principales de cambios mutacionales puntuales: sustituciones de bases y adiciones o deleciones de bases. Las sustituciones de bases son aquellas mutaciones en las que una base es reemplazada por otra. A su vez, éstas se pueden dividir en dos subtipos: transiciones y transversiones. Una transición es la sustitución de una base a otra base de la misma categoría química (purina sustituida por purina o pirimidina sustituida por pirimidina). Una transversión es la sustitución de una base de una categoría química por una base de la otra (pirimidina sustituida por purina o viceversa).

La generación de mutaciones mediante la adición o deleción de nucleótidos a la cadena naciente de ADN o ARN constituye uno de los principales mecanismos generadores de variabilidad genética viral.

Las mutaciones puntuales pueden ocurrir en regiones codificantes y/o también en regiones reguladoras.

La mutación puntual en una región codificante, puede generar alteraciones en la expresión génica y/o la función de su producto, como consecuencia directa de dos aspectos del código genético: la degeneración del código y la existencia de codones de terminación.

Al igual que las mutaciones sin sentido, las adiciones o deleciones de una sola base tienen consecuencias sobre la secuencia del polipéptido que se extienden mucho más allá del sitio de la propia mutación. Debido a que la secuencia de ARNm es "leída" por el aparato traduccional en grupos de tres bases (codones), la adición o pérdida de una sola base cambia el marco de lectura a partir de la ubicación de la misma y se extiende hasta el extremo carboxi-terminal de la proteína. Por lo tanto, las mutaciones que afectan el

marco de lectura generalmente exhiben pérdida de la estructura y de la función normal de la proteína.

A nivel de ARN, hay secuencias funcionales importantes, particularmente en el caso de VHC la región no codificante 5' NCR donde se encuentra el IRES, esencial para que ocurra la traducción del único ORF, y el extremo 3'NCR el cual posee funciones en la traducción y síntesis del ARN.

En general, las consecuencias funcionales de cualquier mutación puntual (sustitución, adición o delección) en estas regiones, dependen de su ubicación y de si se interrumpe un sitio funcional o no. Las mutaciones que interrumpen estos sitios tienen el potencial de cambiar el patrón de expresión de un gen en términos de la cantidad de producto expresado en un momento determinado o en respuesta a ciertas señales celulares o extracelulares. Es importante mencionar que mutaciones “en sitios reguladores” afectarán la tasa de síntesis proteica, pero no alterarán la estructura de la misma.

Finalmente es importante destacar que las mutaciones además, se clasifican como inducidas o espontáneas. Las mutaciones inducidas se definen como las que surgen después del tratamiento con mutágenos o agentes ambientales que se sabe que aumentan la tasa de mutación. Las mutaciones espontáneas son aquellas que surgen ante la ausencia de tratamiento con algún mutágeno conocido y representan la "tasa de fondo" de mutación y son probablemente la fuente última de variación genética natural que se observa en las poblaciones.

La frecuencia a la que se producen mutaciones espontáneas varía según el organismo, siendo de hasta  $10^{-3}$  para el caso de algunos virus de ARN. Esto se debe principalmente a que las ApAd de éstos no tienen la función de corrección de errores (Griffiths et al., 1999; Holmes, 2013) (figuras 1.8 y 1.9).

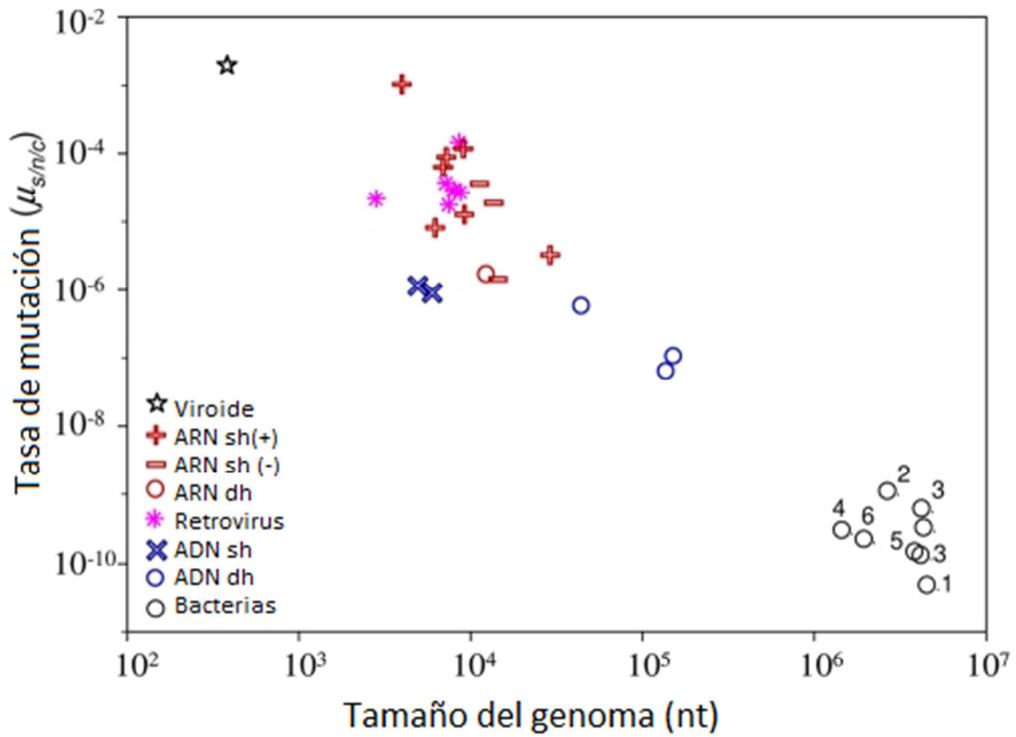


Figura 1.8. Relación entre las tasas de mutación en diferentes tipos de virus y el tamaño del genoma. Se muestran también valores comparables de algunas bacterias y viroides. La tasa de mutación está indicada como el número de sustituciones por sitio por generación, en una célula infectada (Modificado de Sanjuán et al., 2010).

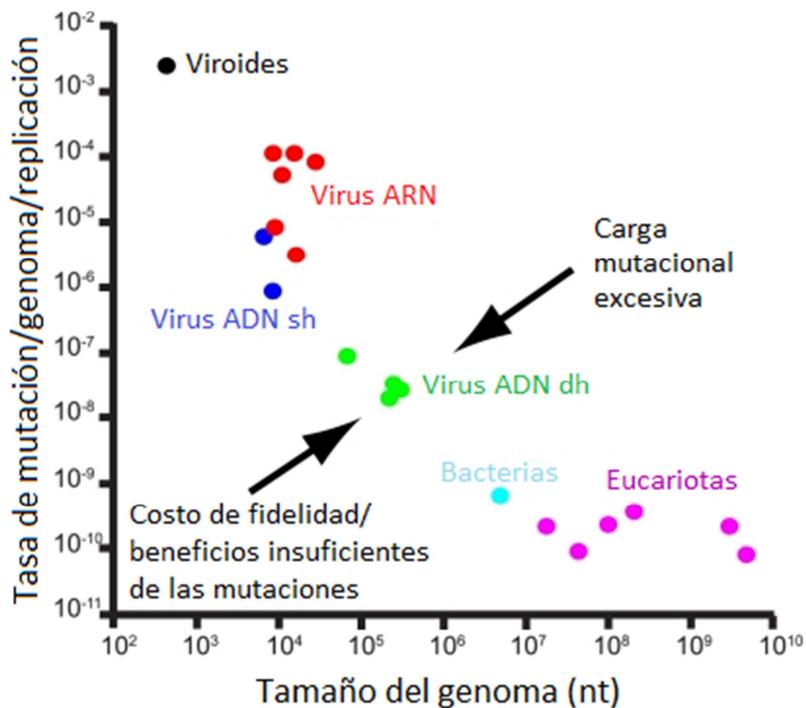


Figura 1.9. Relación entre la tasa de error y el tamaño del genoma para diferentes sistemas genéticos, incluyendo los virus. También se muestran las fuerzas evolutivas que pueden ser responsables de la estrecha banda de tasas de errores observados y los tamaños de genoma (Modificado de Holmes, 2011).

### 1.2.9. Recombinación

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

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

Una amplia gama de genotipos circula en los principales grupos de riesgo para el VHC en los países occidentales, incluyendo 1a y 3a en los usuarios de drogas inyectables (UDI) y 1b, 2a, 2b, 2c y 4a en toda la zona Mediterránea, aumentando las chances de generarse eventos de recombinación.

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

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

A pesar del número de estudios que se han llevado a cabo para investigar este problema, la verdadera frecuencia de recombinación del VHC puede ser considerablemente subestimada. Por ejemplo, la recombinación no se detecta fácilmente entre variantes dentro del mismo subtipo, intra-subtipo, (por ejemplo, entre dos cepas infectantes subtipo 1a en un UDI). Del mismo modo, es difícil documentar recombinantes inter-subtipo (o intra-genotipo) donde VHC es muy diverso, como por ejemplo dentro del genotipo 2 en el oeste de África,

porque en estas regiones, no existe un catálogo completo de variantes de secuencias dentro del cual observar los eventos de recombinación (Simmonds, 2004).

La existencia de recombinación generalizada es una limitación considerable cuando se usan ensayos de genotipado que se basan en regiones individuales del genoma, como la 5' NCR, core o NS5B. Sólo la genotipificación basada en las regiones del genoma que determinan la susceptibilidad al IFN sería capaz de predecir la respuesta al tratamiento, que es una de las principales aplicaciones de los ensayos de genotipificación (Simmonds, 2004).

#### **1.2.10. Origen y evolución del VHC**

Un tema central en la genética de poblaciones es entender cómo evoluciona una población bajo un conjunto de condiciones dadas. La evolución es un proceso hacia adelante en el sentido de que una población cambia sus características con el tiempo. En consecuencia, los enfoques prospectivos dominaron el campo de la genética de poblaciones en el pasado. Sin embargo, empíricamente las características de una población natural son generalmente analizadas tomando muestras de la población. Cuestiones biológicas interesantes que surgen de una muestra son en su mayoría retrospectivas, como la historia de la población que dio origen a la muestra, o los mecanismos evolutivos responsables de las características observadas. La rápida acumulación de datos de secuencias de ADN desde 1980 ha transformado la corriente principal de la investigación de la genética de poblaciones de prospectiva a retrospectiva, o sea, de la demostración de principios a la inferencia de eventos que sucedieron en el pasado. El modelo más ampliamente estudiado es el neutral de Wright-Fisher, que supone que las secuencias en una población en una generación dada son una muestra aleatoria (con reemplazo) de los de la generación anterior y que todas las mutaciones en cuestión son selectivamente neutrales (Fu y Li, 1999).

Para inferir el pasado a partir de un muestreo tomado de una población presente, se requería un nuevo enfoque, por lo que surge de esa necesidad, la teoría coalescente. La esencia de esta teoría es comenzar el estudio con un muestreo, y rastrear hacia atrás en el tiempo para identificar los eventos que ocurrieron en el pasado, desde el ancestro común más reciente de dicha muestra.

La mayoría de los métodos actuales se basan en la teoría coalescente, un proceso estocástico que describe cómo los procesos genéticos de la población determinan la forma de la genealogía de las secuencias de genes incluidos en la muestra. Métodos de inferencia basados en el coalescente permiten que parámetros genéticos de la población sean calculados directamente a partir de datos de secuencias de genes.

El modelo coalescente de tamaño poblacional variable, permite la inferencia de dinámicas de población pasadas a partir de secuencias contemporáneas o a partir de secuencias muestreadas a diferentes tiempos (Griffiths y Tavaré, 1994).

Los métodos coalescentes para inferir historias demográficas requieren un modelo demográfico, que es simplemente una función matemática utilizada para describir el cambio en el tamaño efectivo de la población a través del tiempo. Cada modelo demográfico tiene uno o más parámetros demográficos. Los modelos demográficos más comúnmente utilizados son el tamaño constante, el crecimiento exponencial, el crecimiento logístico y el crecimiento de expansión. Además, combinar estos modelos por tramos permite una serie de modelos más complejos. La dinámica de las poblaciones pasadas se reconstruye mediante la estimación de los parámetros demográficos, típicamente por máxima verosimilitud o métodos bayesianos.

El modelo demográfico que mejor se ajusta a las secuencias de genes en estudio generalmente no se conoce de antemano. Aunque es posible comparar el ajuste de diferentes modelos demográficos utilizando técnicas de selección de modelo estándar, este es un proceso que consume mucho tiempo

y no hay ninguna garantía de que alguno de los modelos comparados se ajuste adecuadamente a los datos. El uso de un modelo demográfico incorrecto dará lugar a estimaciones sesgadas e inválidas de la historia demográfica. Además, un modelo demográfico incorrecto podría dar lugar a sesgos en otros parámetros estimados por el modelo evolutivo. Con el fin de hacer frente a estas preocupaciones, se desarrolló un modelo flexible llamado *skyline plot* (Pybus, Rambaut y Harvey 2000). El *skyline plot* es un modelo por tramos constantes del tamaño de la población que pueden adaptarse a una amplia gama de escenarios demográficos. Ha demostrado además ser útil como herramienta de selección para indicar el modelo demográfico más adecuado para un conjunto de datos determinado (Pybus y Rambaut, 2002). Este modelo produce cierto ruido, por lo cual se desarrolló un modelo para reducirlo llamado *skyline plot* generalizado (Strimmer y Pybus, 2001), el cual utiliza el criterio de información de Akaike (Akaike, 1974) para reducir el número de parámetros empleados.

El *skyline plot* bayesiano (BSP, por sus siglas en inglés) utiliza procedimientos de muestreo Monte Carlo vía cadenas de Markov (MCMC), para estimar una distribución posterior del tamaño efectivo de la población a través del tiempo, directamente de una muestra de secuencias de genes, dado cualquier modelo de sustitución de nucleótidos especificado. A diferencia de los métodos anteriores, el BSP incluye intervalos de credibilidad para el tamaño efectivo de la población estimado en cada punto en el tiempo, hasta el ancestro común más reciente de las secuencias. Estos intervalos de credibilidad representan la incertidumbre filogenética y coalescente. El procedimiento MCMC muestrea eficientemente la distribución de *skyline plot* generalizado dados los datos de secuencia y combina estos *plots* para generar una distribución posterior del tamaño efectivo de la población a través del tiempo. De esta forma se puede co-estimar la tasa de evolución, los parámetros del modelo de sustitución, la filogenia, y la dinámica de poblaciones ancestrales dentro de un único análisis (Drummond et al., 2005).

Este tipo de análisis puede realizarse en patógenos que pueden persistir en sus hospederos a través de muchos mecanismos, evolucionando constantemente durante la infección. Dos virus importantes de este tipo, son el VIH y VHC. Sus períodos infecciosos son largos, del orden de años, lo que significa que se pueden observar los patrones filodinámicos tanto intra- como inter-huésped. Para estos virus, las dinámicas inter-huésped son relativamente lentas, debido a que el tiempo entre los eventos de transmisión es por lo general de meses o incluso años. Por lo tanto, se ve una tendencia epidemiológica que cambia de forma relativamente lenta, en lugar de los valles profundos y las epidemias recurrentes de infecciones agudas como el caso del virus de influenza. La estructura filogenética de VIH y VHC a nivel poblacional no está determinada por la selección ejercida por el sistema inmune; en su lugar, refleja la historia demográfica y espacial de la transmisión (Grenfell et al., 2004).

En lo que refiere estrictamente a VHC, se han realizado diversos estudios tanto filodinámicos como filogeográficos para diferentes subtipos así como también para diferentes regiones del mundo, o mismo para regiones dentro de un mismo país. Esto se debe a la importancia que tiene este tipo de análisis, para entender la evolución y dinámica viral.

En el año 2001 se estimó que la tasa de sustitución de VHC en la región NS5B es de entre  $5,0 \times 10^{-4}$  y  $7,0 \times 10^{-4}$  sustituciones/sitio/año (Pybus et al., 2001), sin embargo 8 años más tarde una nueva estimación fue realizada obteniéndose una tasa de sustitución más rápida de  $7,0 \times 10^{-4}$  –  $1,4 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año para el subtipo 1a y  $4,2 \times 10^{-4}$  –  $2,0 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año para el subtipo 1b (Magiorkinis et al., 2009). Además de sugerir que la tasa de evolución del VHC es más rápida que la sugerida previamente, se menciona que la propagación mundial del VHC coincidió con el uso generalizado de sangre transfundida y productos sanguíneos y con la expansión del consumo de drogas por vía intravenosa, pero se desaceleró con anterioridad a la aplicación de la detección de anti-VHC en los bancos de

sangre. Las diferencias en las vías de transmisión asociadas con los subtipos 1a y 1b proporcionarían una explicación de la expansión relativamente más temprana de 1b. A su vez los datos de ese trabajo muestran que la vía más plausible de dispersión de VHC fue desde los países desarrollados a los países en desarrollo (Magiorkinis et al., 2009).

Como fue mencionado anteriormente muchos estudios se han realizado sobre el VHC en lo que refiere a la filodinámica y filogeografía, sin embargo es relevante destacar aquellos que se han realizado en la región sudamericana, principalmente los países fronterizos con Uruguay; Argentina y Brasil.

En el año 2010, se analizaron un total de 231 secuencias del gen NS5B (subtipo 1a = 89, subtipo 1b = 56 y subtipo 3a = 86) aisladas en Brasil entre 1995 y 2007. Los resultados de este trabajo revelan importantes variaciones en el patrón de transmisión del VHC entre los subtipos. La transmisión del subtipo 1a se caracteriza por la difusión de un linaje de Brasil con un intercambio de virus aleatorio entre las diferentes regiones geográficas, pero no entre las poblaciones de UDI y no UDI. La transmisión del subtipo 1b se caracteriza por la difusión simultánea de múltiples linajes de VHC con un intercambio de virus restringido entre las regiones de países y grupos de riesgo. La transmisión del subtipo 3a se caracteriza por la difusión simultánea de múltiples linajes de VHC y mezcla filogenética al azar por grupo de riesgo y ubicación geográfica. Además se indica que los principales clados brasileños de VHC probablemente comenzaron a circular en el país durante la segunda mitad del siglo 20 y muestran historias de epidemia similares que se caracterizan por una primera fase de expansión exponencial y luego la reducción de las tasas de crecimiento desde 1980 hasta 1995. Esto sugiere que la expansión del VHC puede haber sido controlada efectivamente en Brasil (Lampe et al., 2010).

En el año 2011 en Argentina se realizó un trabajo sobre el subtipo 2c, un subtipo con baja prevalencia en el mencionado país. Sin embargo, este subtipo es el más frecuente en la provincia central de Córdoba. Además, en Cruz del Eje, una pequeña ciudad rural de esta provincia, se encontró una

prevalencia de infección por VHC del 5%, siendo el 90% de las muestras clasificadas como subtipo 2c. En otras poblaciones de la provincia de Córdoba, con menor prevalencia de VHC, se registró que el 50% de las muestras pertenecían al subtipo 2c. El análisis de coalescencia para las muestras de Cruz del Eje, otros lugares de Córdoba y Francia dio un tiempo para el ancestro común más reciente de unos 140 años, mientras que su reconstrucción demográfica mostró una fase “lag” en la población viral hasta 1880 y luego un crecimiento exponencial hasta 1940. También se obtuvieron estos resultados cuando cada zona geográfica se analizó por separado, lo que sugiere que el VHC-2c entró en la provincia Córdoba durante el proceso de migración, principalmente de Europa, lo que es compatible con la historia de Argentina de principios del siglo 20. Este resultado también sugiere que la propagación del subtipo 2c se produjo en Europa y América del Sur casi simultáneamente, posiblemente como resultado de los avances en la tecnología de la medicina de la primera mitad del siglo 20 (Ré et al., 2011).

Otro trabajo realizado en Argentina en el año 2012, con 42 pacientes de la ciudad de Mar del Plata. Los subtipos detectados fueron 1a (n=32), 3a (n=8) y 1b (n=2). La historia demográfica del subtipo 1a inferida de los datos de secuencia mostró un crecimiento exponencial en la década del 90. El período de expansión viral se ve retrasado en comparación con lo observado para el mismo genotipo en otros países en los que la transmisión se asoció con los UDI. Además, el análisis filogeográfico del subtipo 1a mostró una asociación estadísticamente significativa entre la ubicación de las muestras y la filogenia, que puede ser el resultado de la transmisión local de VHC en la ciudad. El análisis molecular ha ayudado en la descripción del contexto epidemiológico complejo de una ciudad turística (Culasso et al., 2012).

En otro trabajo realizado en Brasil, se analizaron un total de 676 secuencias del gen NS5B del VHC de los subtipos 1a (n=321), 1b (n=170) y 3a (n=185). También se analizaron 22 secuencias de variantes genéticas menores, incluidos el genotipo 2 (n=13), el genotipo 4 (n=6) y el subtipo 5a (n=3). Los

análisis revelaron que la epidemia de VHC brasileña se debió a múltiples introducciones y transmisión autóctona de los subtipos 1a, 1b, 3a y los genotipos 2, 4 y 5 del VHC. La epidemia brasileña del subtipo 1a se debe principalmente a la difusión de un clado mayor, mientras que las epidemias de los subtipos de VHC brasileños 1b y 3a se caracterizan por la difusión simultánea de varios linajes VHC independientes. Algunos linajes brasileños de VHC de los subtipos 1a, 1b, 2b y 3a tuvieron éxito en establecerse y difundirse a través de varias regiones del país. Estos resultados demuestran la existencia de múltiples introducciones y propagación local tanto de variantes genéticas de VHC prevalentes como de las menos comunes en Brasil e identifican algunos de los principales clados de VHC brasileños con difusión a nivel nacional. Este estudio también sugiere que la diversidad de VHC observada en Brasil ha sido moldeada tanto por la migración viral frecuente entre las regiones y la difusión viral *in situ* (Lampe et al., 2013).

Por último cabe destacar un estudio realizado por Pickett y colaboradores (2011) donde evidencian la diversificación en dos clados del subtipo 1a. En este trabajo se examinaron secuencias de genomas completos del subtipo 1a de todo el mundo para identificar posiciones que contribuyeran a la diversidad genotípica y fenotípica. Las reconstrucciones filogenéticas mostraron dos clados existentes dentro del subtipo 1a, cada clado con una topología de árbol tipo estrella y sin clara correlación entre el tiempo o el lugar de aislamiento y la filogenia. La identificación de sitios filogenéticamente informativos a nivel de nucleótidos reveló posiciones que no sólo contribuyen a la diferenciación en dos clados, sino que se encuentran en o próximos a los codones asociadas con la resistencia a inhibidores de la proteasa (NS3, Q41) o inhibidores de la polimerasa (NS5B, S368). Análisis de mutaciones de sustitución sinónimas/no sinónimas, revelaron que la mayoría de las mutaciones de nucleótidos produjo aminoácidos sinónimos, lo que indica la presencia de presión selectiva purificadora a lo largo de la poliproteína con regiones de selección positiva también detectadas. A pesar de esa evidencia de

divergencia, ciertas características del subtipo 1a se conservaron, incluyendo la longitud de la ARFP, y un sitio-específico de fosforilación en la proteína NS5A (S349). Este análisis sugiere que pueden existir diferencias específicas de cepa en el desarrollo de resistencia del virus a los antivirales, las cuales son dependientes de la variación genética que separa estos dos clados (Pickett et al., 2011).

### **1.3. Relevancia**

Esta tesis genera aportes sin precedentes en el Uruguay. Es un estudio epidemiológico, filodinámico y evolutivo, aportando datos de nuestro país en ese sentido. En cuanto a la epidemiología, esta tesis aporta secuencias del gen parcial NS5B, las cuales se obtuvieron en Uruguay para los subtipos 1a, 1b, 3a, 2b y 2c entre los años 2005 y 2011. Estas secuencias, junto con aislados de otros países del mundo se utilizaron en los análisis filogenéticos para determinar el grado de variabilidad genética de VHC que circula en Uruguay, e identificar grupos VHC uruguayo-específicos y determinar las posibles entradas de VHC a Uruguay. Por último, se utilizó un método basado en el coalescente bayesiano para investigar la evolución y la historia de la población de un linaje del subtipo 1a uruguayo-específico y uno del subtipo 3a también uruguayo-específico y para estudiar la historia evolutiva de los subtipos 1a y 3a circulantes en nuestro país.

## 2. Objetivos

### **2.1. Objetivo general**

Estudiar la variabilidad genética y reconstruir la historia evolutiva de VHC en Uruguay.

### **2.2. Objetivos específicos**

1- Optimizar métodos moleculares para la amplificación y secuenciación de la región NS5B del genoma de VHC.

2- Determinar los genotipos y subtipos circulantes en Uruguay a partir de un banco de muestras obtenidas entre los años 2005 y 2011.

3- Determinar la existencia de eventos de recombinación en estirpes del VHC de pacientes infectados.

4- Realizar estudios de filodinámica mediante la identificación y estudio de clados locales y regionales del VHC.

5- Realizar estudios de coalescencia y reconstruir la historia evolutiva en secuencias provenientes de estirpes pertenecientes a los subtipos 1a y 3a.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1. Obtención de las muestras

Se obtuvieron 253 sueros positivos por RT-PCR para VHC por el sistema comercial Roche®, cedidos por el Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos (AEPSM) colectados entre los años 2005 y 2011. Las muestras se conservaron a -20 °C. Las mismas fueron obtenidas dentro del marco de un proyecto colaborativo entre la AESPM, el Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de Ciencias y el Laboratorio de Virología Molecular de la Regional Norte. Este muestreo es elevado considerando la población del país, de aproximadamente 3,2 millones de personas (<http://www.ine.gub.uy/censos2011/index.html>), teniendo en cuenta además la estimación del 0,43% de población infectada.

### 3.2. Procesamiento de las muestras

#### 3.2.1 Extracción del ARN viral

El ARN viral se obtuvo utilizando el sistema comercial *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Applied Science™) y *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™), de acuerdo con instrucciones suministradas por los fabricantes. El ARN extraído fue almacenado a -20 °C hasta el momento de su análisis.

#### 3.2.2 Transcripción reversa

La síntesis de ADNc se realizó por el método de hexámeros al azar.

La reacción de transcripción reversa se realizó utilizando la enzima comercial *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen™) o la *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific™), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 10 µl del ARN obtenido de la extracción. El volumen final de la RT fue de 50 µl conteniendo además de los 10 µl de ARN; buffer de reacción 1x; 0,5 mM de cada dNTP; 0,01 M de DTT; 100 U de *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen™) o 200 U *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific™); 2 ng/µL (en el caso de *SuperScript® II*) o 4 ng/µL (en el caso de *RevertAid*) de hexámeros al azar; H<sub>2</sub>O (libre de RNAsa) para volumen final de 50 µL. La reacción se inició con la desnaturalización del ARN durante 5 minutos a 95 °C. Luego fue agregada la mezcla de reacción; se incubó a 25 °C durante 10 minutos y luego a 42 °C durante 50 minutos. Posteriormente se procedió a la inactivación de la reacción calentando a 70 °C durante 15 minutos.

### 3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Un fragmento parcial del gen NS5B fue amplificado por PCR semi-anidada utilizando la *Taq DNA polymerase (recombinant)* (Thermo Scientific™) o la *Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific™). Los fragmentos esperados son de 449 pares de base (pb) y de 386 pb, para la primera y segunda ronda de amplificación respectivamente. La banda esperada de 449 pb comprende la región entre el nucleótido 8256 al 8704, mientras que banda de 386 pb comprende la región entre el nucleótido 8256 al 8641 (posiciones referidas a la secuencia de referencia H77, número de acceso AF009606).

Se utilizaron oligonucleótidos descritos previamente por Cantaloube y colaboradores (2005).

Nombre del cebador	Secuencia	Sentido	Comienzo	Final	Ronda
NS5-1	TATGAYACCCGYTGCTTTGAC	Directo	8256	8276	Primera/Segunda
NS5-2	GAGGAGCAAGATGTTATCAGCTC	Reverso	8682	8704	Primera
NS5-3	GAATACCTGGTCATAGCCTCCG	Reverso	8620	8641	Segunda

**Tabla 3.1. Cebadores utilizados para la amplificación de la región NS5B.** En la tabla se muestran los cebadores utilizados y la posición de los mismos en la región del genoma. Las posiciones están referidas a la secuencia de referencia H77 (Número de acceso: AF009606).

En todos los experimentos se utilizaron controles negativos (sueros negativos para VHC) y controles positivos (sueros positivos para VHC), para validar cada estudio. Además se trabajó en el laboratorio con dos zonas definidas, una de pre-amplificación y otra post-amplificación.

Las condiciones de amplificación fueron optimizadas para nuestro laboratorio.

Las mezclas de reacción para las PCR fueron preparadas en un volumen final de 25  $\mu$ L conteniendo: buffer de reacción 1x; 2,0 mM de  $MgCl_2$ ; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4  $\mu$ M de cada cebador específico; 1,5 U de la enzima *Taq DNA Polymerase (recombinant)* (Thermo Scientific™) o de la *Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific™) y  $H_2O$  libre de ARNasas, volumen suficiente para 25  $\mu$ L. A los 20  $\mu$ L de la mezcla de reacción se le adicionaron 5  $\mu$ L de ADNc.

Para la optimización de la PCR se utilizó un gradiente de temperaturas en el entorno a la calculada teóricamente para los cebadores. Para la optimización de la primera ronda de amplificación de la región NS5B, las condiciones del ciclo de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 95 °C durante 5 minutos.

Luego 35 ciclos de amplificación:

Desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos.

Hibridación desde 50 °C a 55 °C durante 45 segundos.

Extensión a 72 °C durante 45 segundos.

Por último, una extensión final a 72 °C durante 10 minutos y luego 4 °C para mantener los tubos hasta retirarlos para seguir con el siguiente paso.

Para la optimización de la segunda ronda de amplificación de la región NS5B, las condiciones del ciclo de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 95 °C durante 5 minutos.

Luego 35 ciclos de amplificación:

Desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos.

Hibridación a 55 °C durante 45 segundos.

Extensión a 72 °C durante 45 segundos.

Por último, una extensión final a 72 °C durante 10 minutos y luego 4 °C para mantener los tubos hasta retirarlos para seguir con el siguiente paso.

#### **3.2.4. Visualización de los productos de PCR**

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y teñidos con GoodView™ (SBS). Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados con un procesador de imágenes.

#### **3.2.5. Purificación de los productos de PCR**

Cuando el gel no mostraba bandas inespecíficas, las muestras positivas fueron purificadas utilizando los kits comerciales *AxyPrep PCR Clean-up Kit* (AXYGEN®) y *ISOLATE PCR and Gel Kit* (BIOLINE®). Por otra parte, cuando se visualizaron bandas inespecíficas las muestras positivas fueron purificadas utilizando los kits comerciales *AxyPrep™ DNA Gel Extraction kit* (AXYGEN®) y *ISOLATE PCR and Gel Kit* (BIOLINE®). En todos los casos se siguieron los protocolos suministrados por los fabricantes.

#### **3.2.6. Secuenciación de los productos de PCR**

Los productos purificados se enviaron para su secuenciación directa al Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. La misma fue realizada bidireccionalmente, utilizando los cebadores del segundo round de PCR.

### 3.3. Análisis de las secuencias

#### 3.3.1. Edición de las secuencias

Los cromatogramas recibidos fueron corregidos y editados utilizando las secuencias de ambas cadenas de cada muestra para generar una secuencia consenso. Para esto fue utilizado el programa SeqMan de Lasergene® (DNASTAR®) (Swindell y Plasterer, 1997).

#### 3.3.2. Secuencias de referencia

Las secuencias de referencia de los genotipos, utilizadas en este estudio para genotipificar y subtipificar fueron obtenidas de la base de datos de Los Alamos HCV (Kuiken et al., 2005; 2008).

Además se utilizaron 3 set de datos de 582 secuencias del subtipo 1a, 330 secuencias del subtipo 1b y 306 secuencias del subtipo 3a para realizar los análisis filogenéticos. Estos set de datos para cada subtipo tienen secuencias representativas de diferentes regiones geográficas (Lampe et al., 2013), y fueron cedidos por el Dr. Gonzalo Bello del Laboratorio AIDS & Inmunología Molecular, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Río de Janeiro, Brasil.

#### 3.3.3. Alineamiento de las secuencias

Las secuencias editadas fueron utilizadas para generar los distintos alineamientos, según los objetivos planteados. Además, se utilizaron los diferentes set de datos para poder generar los alineamientos que luego fueron utilizados para realizar los distintos análisis tanto filogenéticos como de coalescencia. Éstas fueron alineadas y preparadas con el paquete de *software* MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Se generó un alineamiento de secuencias nucleotídicas con una longitud de 331 bases, correspondiente a la posición 8297-8627 en referencia con la secuencia H77 (Número de acceso AF009606), para la región NS5B.

### **3.3.4. Análisis filogenéticos**

En primer lugar se determinó el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba a nuestros datos, utilizando el programa jModelTest (Posada, 2008). Se evaluó mediante el criterio de información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974). Las filogenias fueron reconstruidas usando el método de máxima verosimilitud (ML) y el modelo de sustitución nucleotídica determinado previamente para cada alineamiento, utilizando el programa PhyML (Guindon et al., 2010). El soporte estadístico utilizado para evaluar las ramas de los árboles fue el test de razón de verosimilitud aproximado (aLRT) basado en el procedimiento de tipo Shimodaira-Hasegawa (SH). Los árboles generados fueron visualizados y editados con el programa FigTree v1.4.

### **3.3.5. Análisis de estirpes recombinantes**

Para determinar la existencia de eventos de recombinación se utilizó el programa Simplot (Lole et al., 1999). Se utilizaron las secuencias de la región NS5B obtenidas en este estudio para cada subtipo por vez, y las secuencias de referencia para todos los subtipos de VHC.

El programa Simplot calcula y grafica el porcentaje de similitud de una secuencia problema con un panel de secuencias utilizando un sistema de ventana móvil, la cual se mueve a lo largo de la secuencia de a pasos. En el caso del subtipo 1a, se utilizó como secuencia problema una de las secuencias de referencia para el subtipo 1a y se comparó con todas las secuencias del subtipo 1a obtenidas y el resto de las secuencias de referencia y a modo de confirmación se utilizó luego una secuencia de referencia del subtipo 1b, también con todas las secuencias del subtipo 1a obtenidas y el resto de las secuencias de referencia. En el caso del subtipo 1b, se realizó a la inversa, primero se utilizó una secuencia de referencia para el subtipo 1b como secuencia problema con todas las secuencias del subtipo 1b obtenidas y el resto de las secuencias de referencia, y luego una secuencia de referencia del

subtipo 1a, también con todas las secuencias del subtipo 1b obtenidas y el resto de las secuencias de referencia. Por último, las secuencias 3a obtenidas se analizaron utilizando como secuencia problema una secuencia 3a de referencia y el resto de las secuencias de referencia.

En todos los casos se usó una ventana móvil de 200 nt moviéndose a lo largo de la secuencia en pasos de 10 nt.

### 3.3.6. Análisis de coalescencia

La reconstrucción de la demografía de los clústeres uruguayos fue realizada utilizando el paquete BEAST v1.7.5 (Drummond et al., 2012). La preparación de los datos fue realizada en el programa BEAUti v1.7.5. Se utilizaron como datos previos para los análisis del subtipo 1a, dos valores distintos publicados previamente para la tasa de sustitución de  $5,00 \times 10^{-4}$  –  $7,00 \times 10^{-4}$  sustituciones/sitio/año (Pybus et al., 2001) y  $7,00 \times 10^{-4}$  –  $1,40 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año (Magiorkinis et al., 2009), mientras que para el subtipo 3a, se utilizó en los análisis una tasa de evolución también previamente publicada de  $1,04 \times 10^{-3}$  –  $1,48 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año (Zehender et al., 2013). Para todos los análisis se utilizó como *prior* de árbol coalescente el *Bayesian Skyline* (Drummond et al., 2005). Además, el modelo de reloj molecular utilizado en todos los análisis, fue el reloj relajado lognormal (no correlacionado) y el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba a nuestros datos previamente seleccionado mediante el programa jModelTest. El largo de la cadena MCMC fue de  $1 \times 10^8$  generaciones. Cada combinación de datos fue corrida en el programa BEAST v1.7.5 y los resultados fueron luego visualizados con el programa Tracer v1.5 descartando como calentamiento el 10% inicial de la corrida. Los valores del número efectivo de muestreo (ESS, por sus siglas en inglés) fueron chequeados a fin de evaluar la convergencia del análisis, aceptando solamente valores mayores a 200 para todos los parámetros. Uno de los parámetros de mayor importancia calculado en este análisis fue el tiempo del ancestro común más reciente (tMRCA, por sus siglas

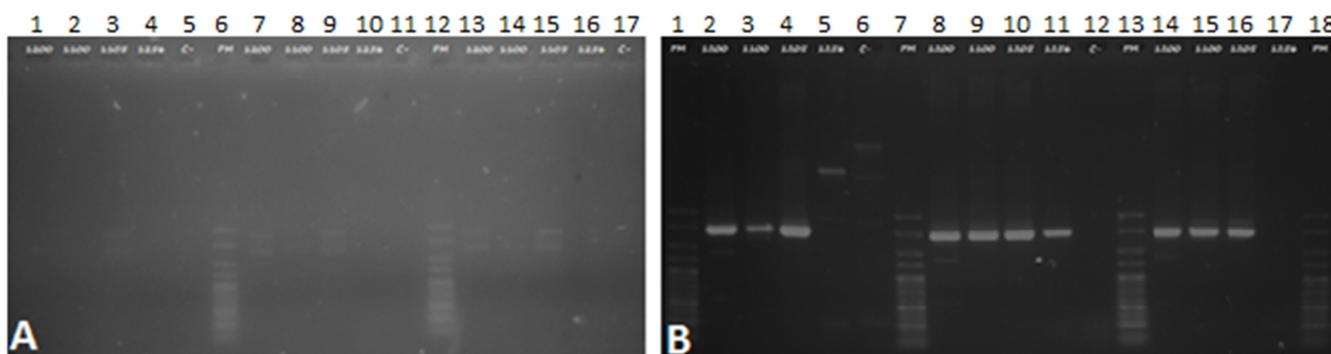
en inglés). El número efectivo de infecciones fue representado gráficamente con el Tracer v1.5.

Por otra parte, los árboles generados en cada corrida fueron anotados con el programa TreeAnnotator v1.7.5 y luego de anotados, visualizados y editados con el programa FigTree v1.4.

## 4. Resultados

### 4.1. Optimización de la PCR para la región NS5B

El primer resultado obtenido en el presente estudio fue la optimización de la PCR para la región parcial de la NS5B del genoma del VHC.



**Figura 4.1. Optimización de la PCR de la región parcial de la NS5B del genoma.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **A)** Primera ronda de amplificación. Se utilizaron 4 muestras de control (1200, 1100, 1105 y 1256) y un control negativo (C-) para cada temperatura. Carriles 6 y 12 peso molecular (PM), carriles 1-5, temperatura de hibridación (TH) de 50 °C, 7-11 a una TH de 52,5 °C y del 13-17 a una TH de 55 °C. **B)** Segunda ronda de amplificación. Se utilizaron las 4 muestras de control (1200, 1100, 1105 y 1256) y un control negativo (C-) provenientes de la primera ronda de amplificación (A). Carriles 1, 7, 13 y 18 peso molecular (PM), carriles 2-6 (correspondiente a carriles 1-5 de la primera ronda), 8-12 (a los carriles 7-11 de la primera ronda) y carriles 14-17 (a los carriles 13-16 de la primera ronda). La TH fue de 55°C en todos los casos.

La optimización de la PCR se realizó antes de iniciar la amplificación de las muestras obtenidas de la AEPSM entre los años 2005 y 2011, para adaptar el protocolo de Cantaloube y colaboradores (2005) a las condiciones del Laboratorio de Virología Molecular, Regional Norte.

En la figura 4.1 se pueden observar los resultados obtenidos correspondientes a la primera y segunda ronda de amplificación. Como primer resultado vemos que la amplificación en la primera ronda no fue eficiente, sin embargo, las temperaturas de hibridación (TH) más óptimas fueron a 52,5 °C y 55 °C.

Para confirmar la TH a la cual se logró mejor eficiencia y especificidad, se procedió a la realización de la segunda ronda de amplificación, a una TH

de 55 °C (figura 4.1 B). En la misma se puede observar que todas las muestras que provenían de la primera ronda de amplificación a una TH de 52,5 °C amplificaron (carriles 8-11), mientras que para el resto de las TH no se alcanzó la amplificación de todas las muestras (carriles 2-5 y 13-16).

Las condiciones finales optimizadas del ciclo de amplificación para la primera ronda de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 95 °C durante 5 minutos.

Luego 35 ciclos de amplificación:

Desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos.

Hibridación a 52,5 °C durante 45 segundos.

Extensión a 72 °C durante 45 segundos.

Por último, una extensión final a 72 °C durante 10 minutos y luego 4 °C para mantener los tubos hasta retirarlos para seguir con el siguiente paso.

Las condiciones finales optimizadas del ciclo de amplificación para la segunda ronda de amplificación fueron las siguientes:

Incubación a 95 °C durante 5 minutos.

Luego 35 ciclos de amplificación:

Desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos.

Hibridación a 55 °C durante 45 segundos.

Extensión a 72 °C durante 45 segundos.

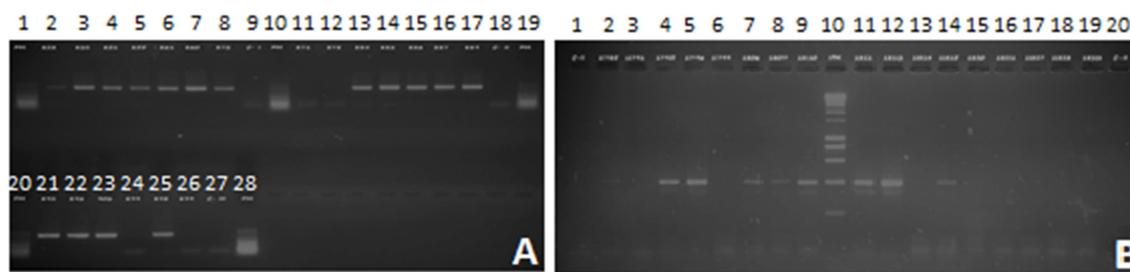
Por último, una extensión final a 72 C durante 10 minutos y luego 4 °C para mantener los tubos hasta retirarlos para seguir con el siguiente paso.

## 4.2. Muestras amplificadas y secuenciadas de la región NS5B

Se logró amplificar y secuenciar efectivamente 165 muestras de un total de 253 muestras provenientes de pacientes uruguayos positivos para el VHC cedidas por la AEPSM. El porcentaje de amplificación y secuenciación fue de 65,2%.

## 4.3. Comparación de dos métodos de extracción

De la comparación de los dos métodos de extracción de ARN utilizados en muestras de suero, surge un resultado secundario a este estudio.



**Figura 4.2. Comparación de la eficiencia de dos métodos de extracción.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Extracciones utilizando dos métodos de extracción diferentes. **A)** *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Applied Science™). Carriles 1, 10, 19, 20 y 28 marcador de peso molecular, carriles 2-8, 11-17 y 21-26 muestras y carriles 9, 18 y 27 control negativo. **B)** *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™). Carril 10 marcador de peso molecular, carriles 2-9 y 11-19 muestras

En la figura 4.2 se pueden apreciar algunos geles tanto de amplificaciones luego de extracción por el sistema comercial *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Applied Science™) así como también por el método de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™). Los resultados indicaron que luego de la extracción por el kit comercial se obtuvo un total de 90 muestras positivas de 112 muestras extraídas (80,4%), mientras que por el método de *TRIzol®* se obtuvieron 78 muestras positivas de un total de 139 muestras extraídas (56,1%). Es importante mencionar que todas las muestras analizadas eran positivas por PCR para VHC (datos brindados por la AEPSM). También es importante mencionar que la comparación no fue realizada intra-muestra.

#### 4.4. Determinación de los genotipos y subtipos de VHC circulantes en Uruguay

Utilizando secuencias de la región NS5B de los genomas de referencia para todos los genotipos y subtipos y las secuencias obtenidas para esta misma región en el presente estudio, se realizó el alineamiento de las mismas para poder determinar, en primer lugar, el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba a nuestros datos. Mediante el uso del programa jModelTest, se obtuvo que el modelo que mejor se ajustó fue el GTR +  $G_4$  + I en base al AIC. Utilizando este modelo de sustitución de nucleótidos y aLRT como soporte para evaluar el soporte de los grupos o clados, se realizó el análisis filogenético de ML en el que 86 muestras (52,1%) agruparon con las secuencias de referencia 1a, 40 (24,2%) agruparon con las secuencias de referencia 3a, 27 (16,4%) agruparon con las secuencias de referencia 1b, 9 (5,4%) lo hicieron con las secuencias de referencia 2c y 3 (1,8%) con las de referencia 2b (figuras 4.3 y 4.7).

Se observaron 5 muestras positivas en el año 2005, 16 muestras positivas en el año 2006, 31 muestras positivas en el año 2007, 25 muestras positivas en el año 2008, 20 muestras positivas en el año 2009, 36 muestras positivas en el año 2010 y 32 muestras positivas en el año 2011. En todos los años se refiere a positividad total sin discriminación de genotipos. Es importante mencionar que el muestreo va desde el 17 de marzo de 2005 hasta el 30 de agosto de 2011 (tabla 4.1). En la figura 9.4 del anexo se muestra un gráfico con los subtipos circulantes por año y el total de estirpes circulantes por año, así como también la variación de los mismos a lo largo del tiempo.

En las figuras 4.4, 4.5 y 4.6 se muestran los valores de aLRT, del árbol filogenético, para las ramas o nodos que determinan los subtipos con los cuales se agruparon las secuencias uruguayas obtenidas en este estudio. Se observan valores de soporte estadísticamente significativos. En el caso del

subtipo 1a el valor de aLRT que lo agrupa es de 0,88 (87,6%), para el subtipo 1b es de 0,97 (97,4%), el valor de aLRT que separa el subtipo 2b del resto de los subtipos del genotipo 2 es 0,88 (88,5%), el subtipo 2c se agrupa con un apoyo de 0,96 (96,0%), mientras que el subtipo 3a tuvo un soporte estadístico de 0,99 (99,4%).

A su vez, los valores de soporte estadístico aLRT para los diferentes genotipos fue de 0,95 para el genotipo 1, 1,00 para el genotipo 2, 0,98 para el genotipo 3, 0,98 para el genotipo 4 y 0,96 para el genotipo 6. Los genotipos 5 y 7 tienen tan solo una secuencia cada uno. De todas formas el genotipo 5 se agrupa con un apoyo de aLRT de 0,92 con los genotipos 1, 2 y 6, quedando por fuera de los 3 genotipos y el genotipo 7 se agrupa con el mismo apoyo estadístico de 0,92 pero con los genotipos 3 y 4, quedando separado de ambos genotipos (datos no mostrados).





<b>Año</b>	<b>1a</b>	<b>1b</b>	<b>2b</b>	<b>2c</b>	<b>3a</b>	<b>Total por año</b>
<b>2005</b>	1	2	0	0	2	<b>5</b>
<b>2006</b>	10	2	0	2	2	<b>16</b>
<b>2007</b>	12	9	1	2	7	<b>31</b>
<b>2008</b>	12	4	1	2	6	<b>25</b>
<b>2009</b>	13	3	0	0	4	<b>20</b>
<b>2010</b>	18	5	0	0	13	<b>36</b>
<b>2011</b>	20	2	1	3	6	<b>32</b>
<b>Total por subtipo</b>	<b>86</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>40</b>	<b>165</b>

Tabla 4.1. Distribución de subtipos del VHC por año. Se muestran los diferentes subtipos identificados por año, el total de positivos y secuencias por año obtenidos para cada subtipo, y el total acumulado por año y subtipo.

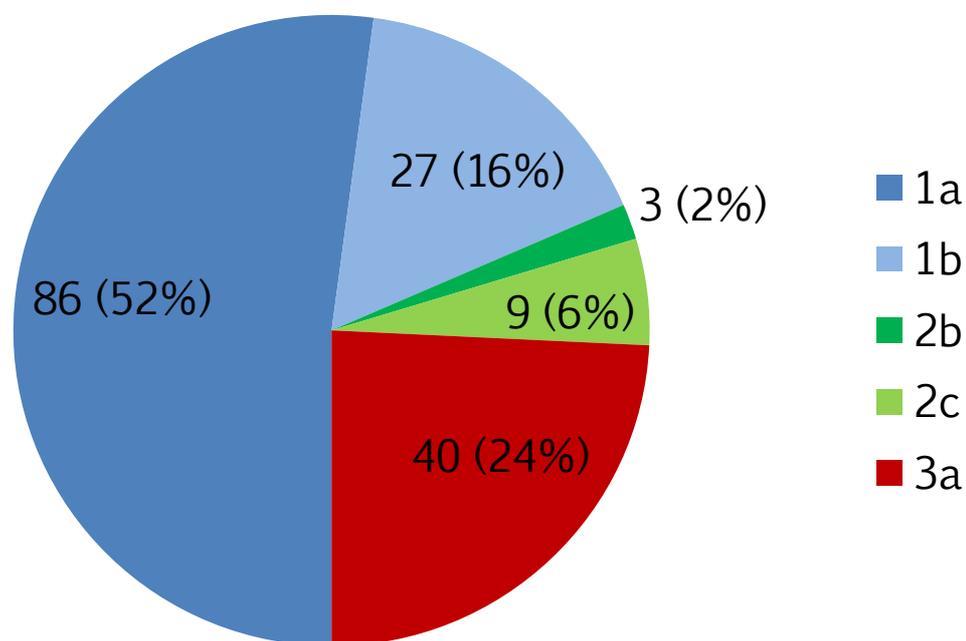
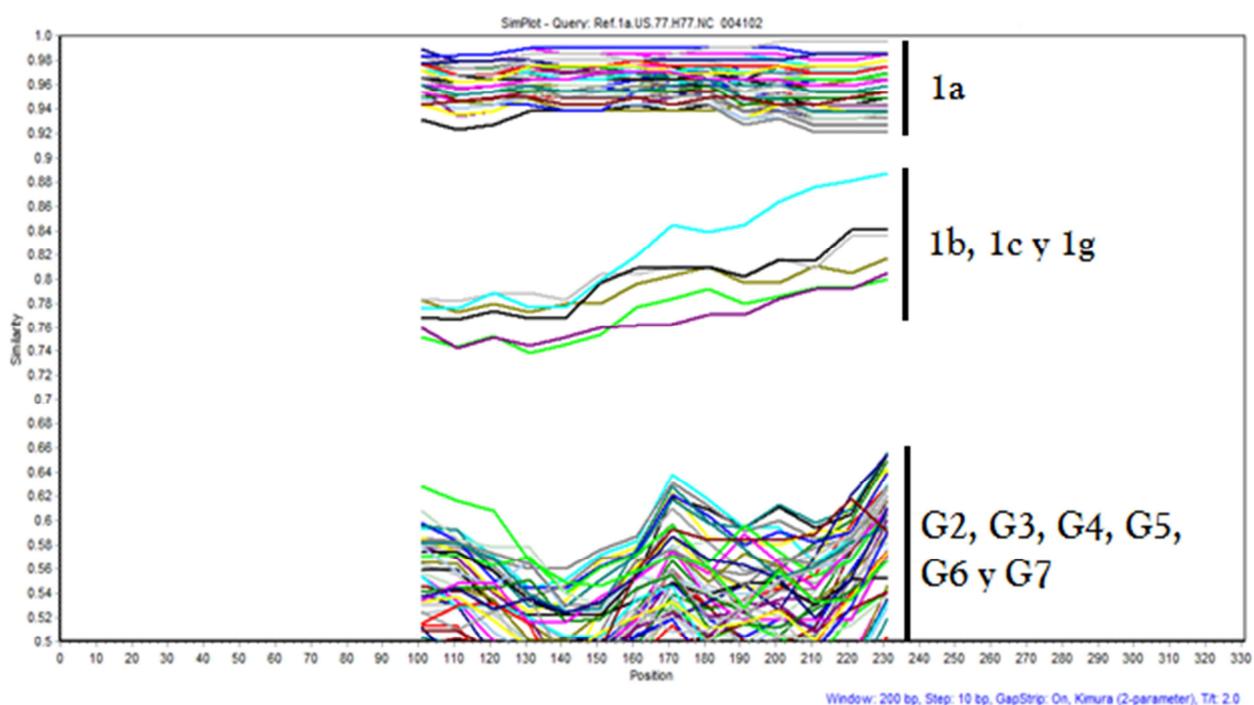


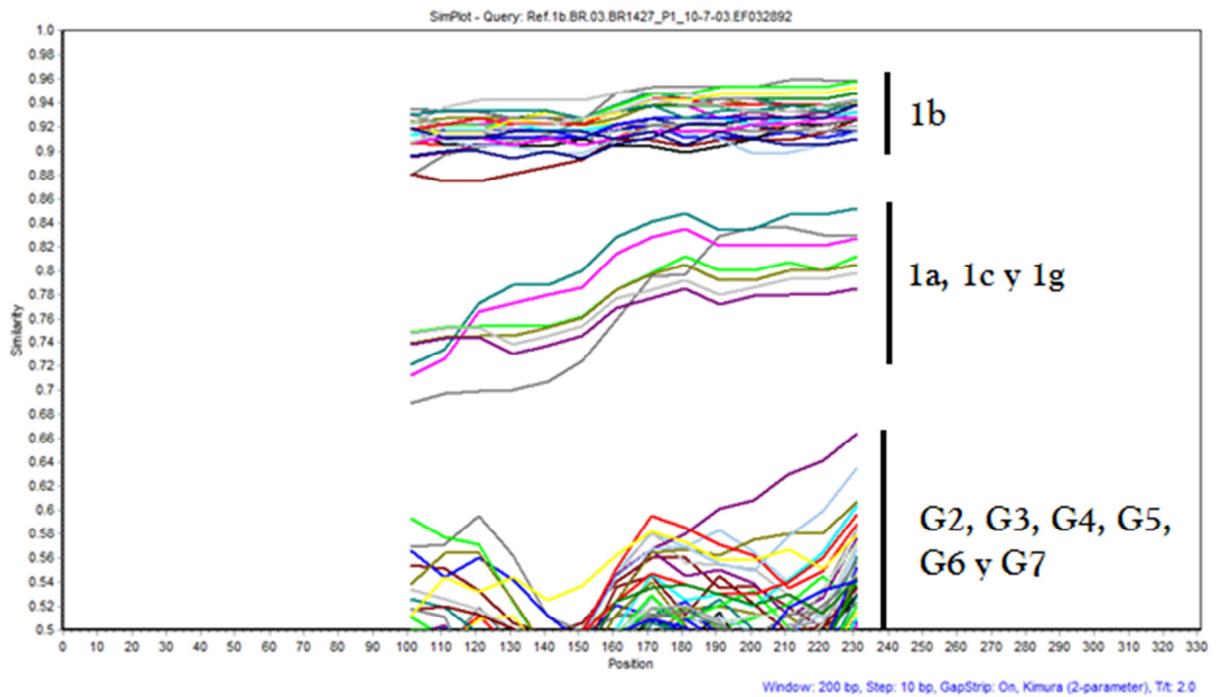
Figura 4.7. Epidemiología del VHC en Uruguay. Gráfico descriptivo de los subtipos identificados y el respectivo porcentaje para cada uno respecto al total de positivos.

## 4.5. Estudios de recombinación genética

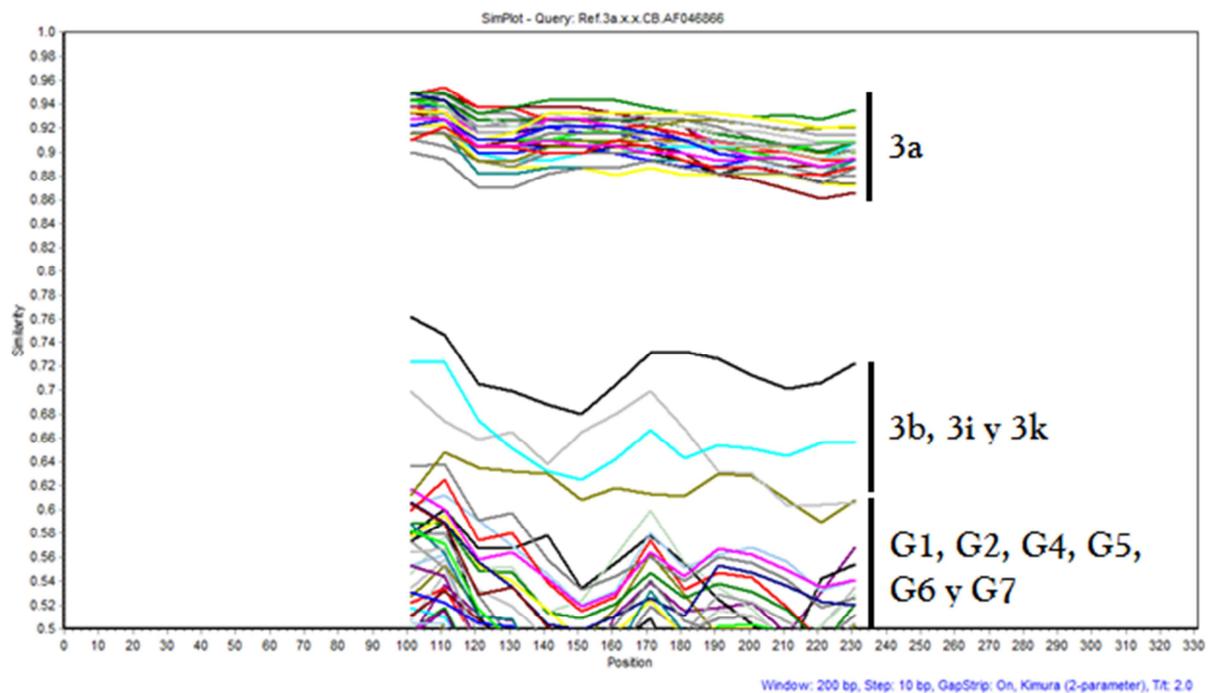
Se estudiaron los posibles eventos de recombinación genética en el VHC para cada subtipo. Además, se analizaron para evitar que la ocurrencia de la misma interfiera en los análisis de coalescencia es que se realizaron estos estudios. Se estudió para todas las secuencias obtenidas en el marco de esta tesis, para cada subtipo por separado (figuras 4.8, 4.9, 4.10). Se muestran en las figuras solamente los gráficos de SimPlot obtenidos para los 3 subtipos predominantes. No fue detectada ninguna secuencia recombinante en los subtipos estudiados.



**Figura 4.8. Gráfico de similitud de estirpes del VHC uruguayas del subtipo 1a.** Se muestra la similitud nucleotídica en función de la posición del genoma, obtenida con el programa SimPlot para las secuencias del subtipo 1a utilizando una secuencia de referencia del subtipo 1a. La ventana utilizada fue de 200 nt y los pasos fueron de 10 nt.



**Figura 4.9.** Gráfico de similitud de estirpes del VHC uruguayas del subtipo 1b. Se muestra la similitud nucleotídica en función de la posición del genoma, obtenida con el programa SimPlot para las secuencias del subtipo 1b utilizando una secuencia de referencia del subtipo 1b. La ventana utilizada fue de 200 nt y los pasos fueron de 10 nt.



**Figura 4.10.** Gráfico de similitud de estirpes del VHC uruguayas del subtipo 3a. Se muestra la similitud nucleotídica en función de la posición del genoma, obtenida con el programa SimPlot para las secuencias del subtipo 3a utilizando una secuencia de referencia del subtipo 3a. La ventana utilizada fue de 200 nt y los pasos fueron de 10 nt.

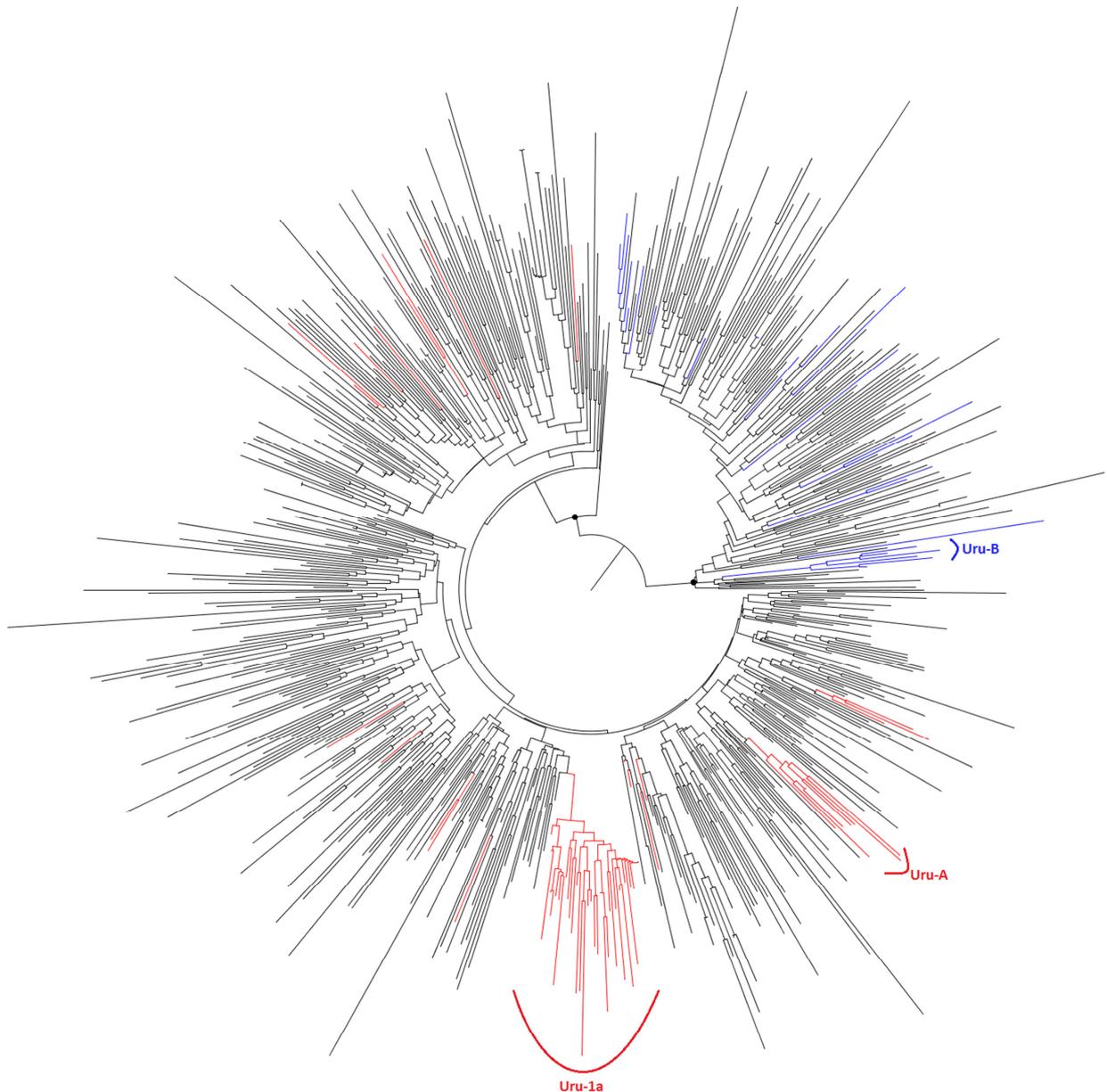
## 4.6. Entradas del VHC a Uruguay

Con el fin de evaluar si el virus entró al país una única vez y luego se dispersó localmente o si en realidad se han producido múltiples entradas como ocurrió en los países fronterizos, se analizaron nuestras secuencias junto con secuencias previamente publicadas (Lampe et al., 2013), para cada subtipo por separado, focalizando los estudios para los 3 subtipos predominantes en Uruguay, 1a, 1b y 3a. En los 3 casos se analizó el alineamiento en búsqueda del modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustaba a los datos utilizando el jModelTest y el AIC. En todos los casos el modelo que mejor se ajusta a los datos es el GTR +  $G_4$  + I. Con este modelo, el aLRT como soporte estadístico para las ramas del árbol y el método de ML, se realizaron los diferentes análisis filogenéticos para cada subtipo.

### 4.6.1. Subtipo 1a

En primer lugar se analizó el subtipo 1a de VHC (figura 4.11), el cual según lo reportado por Pickett y colaboradores (2011) se separa en dos clados distintos denominados clado 1 y clado 2. Estos estudios revelaron múltiples introducciones independientes de VHC dentro de la población uruguaya. Además el análisis filogenético indicó que el subtipo 1a presenta una gran variabilidad de secuencias, pertenecientes tanto al clado 1 como al clado 2. La distribución de las secuencias entre los dos clados fue de 72% ( $n = 63$ ) para el clado 1 y el 28% ( $n = 24$ ) para el clado 2. Un clúster local de 35 secuencias denominado Uru-1a correspondiente al 40% del total de las secuencias del subtipo 1a de Uruguay fue hallado en el clado 1. Excluyendo el clúster Uru-1a, las secuencias uruguayas se agruparon en múltiples linajes separados, presentando la mayoría de éstos un tamaño pequeño ( $n \leq 2$ ) pertenecientes tanto al clado 1 como al clado 2. La mayoría de los linajes se conformaron con solamente una secuencia de Uruguay, con la excepción de dos linajes con más de 5 secuencias denominados Uru-A y Uru-B,

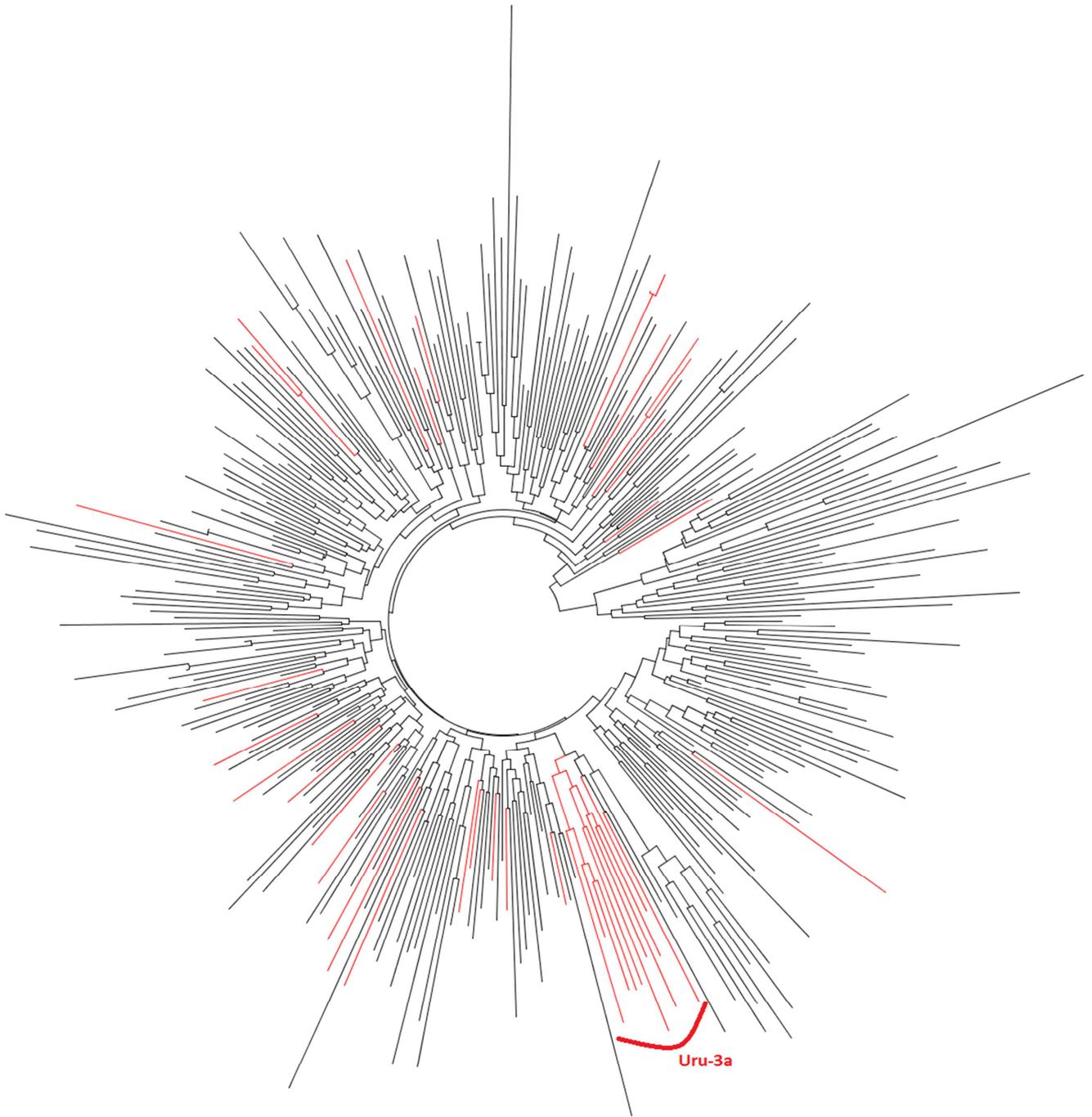
pertenecientes al clado 1 y 2, respectivamente. En suma, observamos la existencia del clúster Uru-1a y el linaje Uru-A que pertenecen al clado 1 así como otras 20 secuencias uruguayas repartidas en 15 linajes distintos, y el linaje Uru-B que pertenece al clado 2, al igual que otras 18 secuencias repartidas en 11 linajes diferentes.



**Figura 4.11. Árbol filogenético de ML del subtipo 1a del VHC.** Árbol filogenético de ML realizado con el set de datos de secuencias 1a de Uruguay y del resto del mundo. En rojo se representan las secuencias uruguayas pertenecientes al clado 1 y en azul las secuencias uruguayas pertenecientes al clado 2. Se muestra en arco rojo y con el nombre Uru-1a el clúster monofilético uruguayo. Se muestran en arcos rojo y azul los clústeres monofiléticos minoritarios uruguayos pertenecientes al clado 1 y 2 respectivamente, llamados Uru-A y Uru-B. Los puntos negros identifican los nodos que separan los dos clados del subtipo 1a identificados por Pickett y colaboradores (2013).

#### 4.6.2. Subtipo 3a

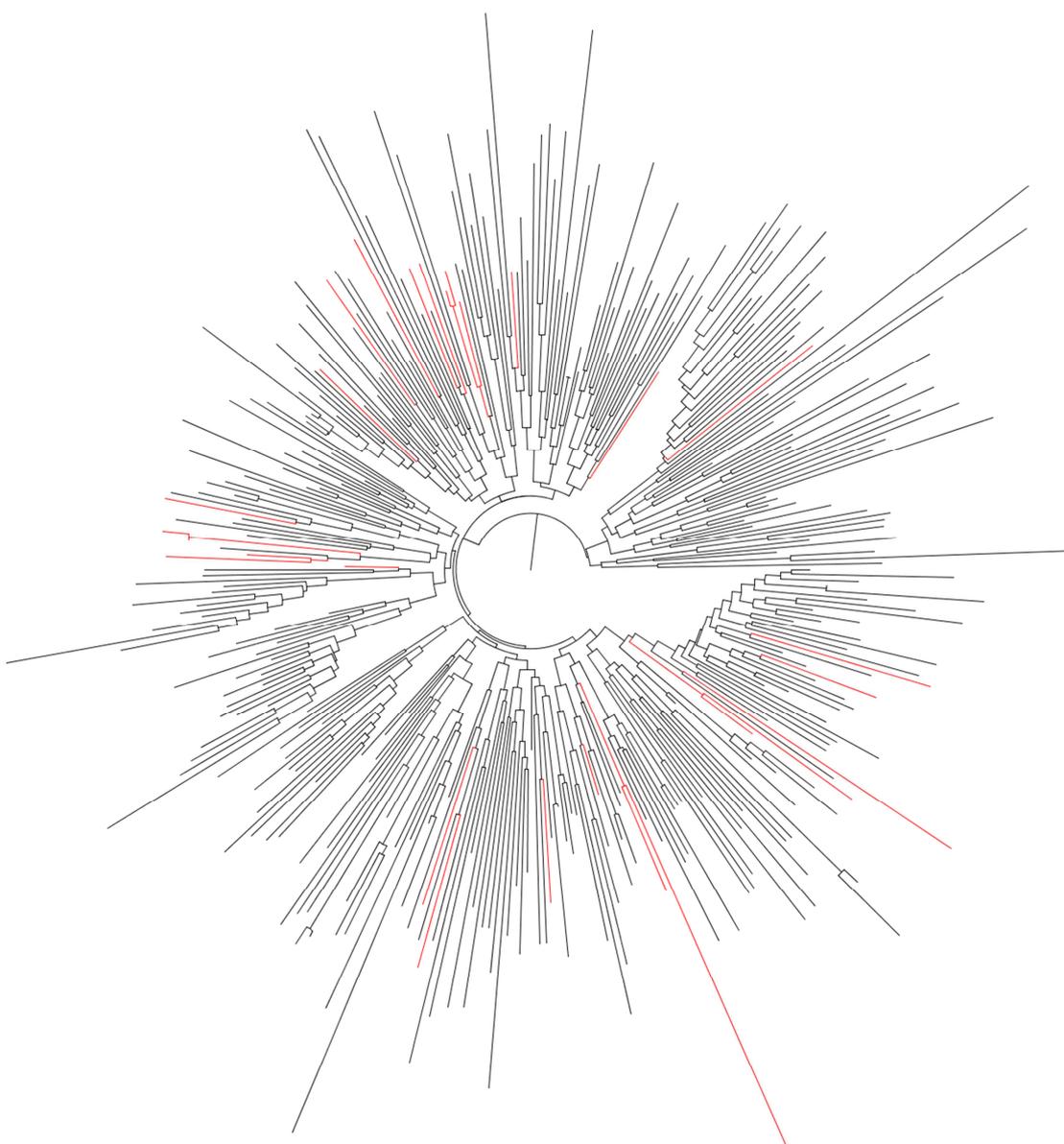
Las secuencias del subtipo 3a mostraron un patrón similar al del subtipo 1a con un clúster local y múltiples linajes. Las secuencias uruguayas del subtipo 3a se agruparon por separado en varios linajes con no más de 2 secuencias de nuestro país junto con secuencias de otros países, con la excepción de un grupo parafilético conformado por 11 secuencias uruguayas denominado Uru-3a. Este grupo local es más pequeño que Uru-1a (el mayor clúster local del subtipo 1a), pero es significativo dentro del subtipo 3a ya que son 11 secuencias de 40, representando el 27,5% del total de las secuencias uruguayas del subtipo 3a. A su vez, dentro de este clúster parafilético, se aprecian 9 secuencias formando un clúster monofilético uruguayo. Por otro lado observamos linajes independientes, donde encontramos 29 secuencias divididas en 25 linajes distintos (figura 4.12).



**Figura 4.12. Árbol filogenético de ML del subtipo 3a del VHC.** Árbol filogenético de ML realizado con el set de datos de secuencias 3a de Uruguay y del resto del mundo. En rojo se representan las secuencias uruguayas. Se muestra en arco rojo y con el nombre Uru-3a el clúster parafilético uruguayo.

### 4.6.3. Subtipo 1b

Por su parte, el subtipo 1b muestra solamente un patrón de múltiples linajes separados sin dispersión local o si existe es muy limitada. En el análisis filogenético se diferenciaron 19 linajes, con secuencias de Uruguay agrupadas con secuencias de todo el mundo. Casi todos estos linajes (13 de 19) están compuestos tan solo por una secuencia uruguaya, cinco linajes con dos secuencias uruguayas y uno con cuatro secuencias uruguayas. No se encontró ningún clúster de dispersión local para el subtipo 1b (figura 4.13).



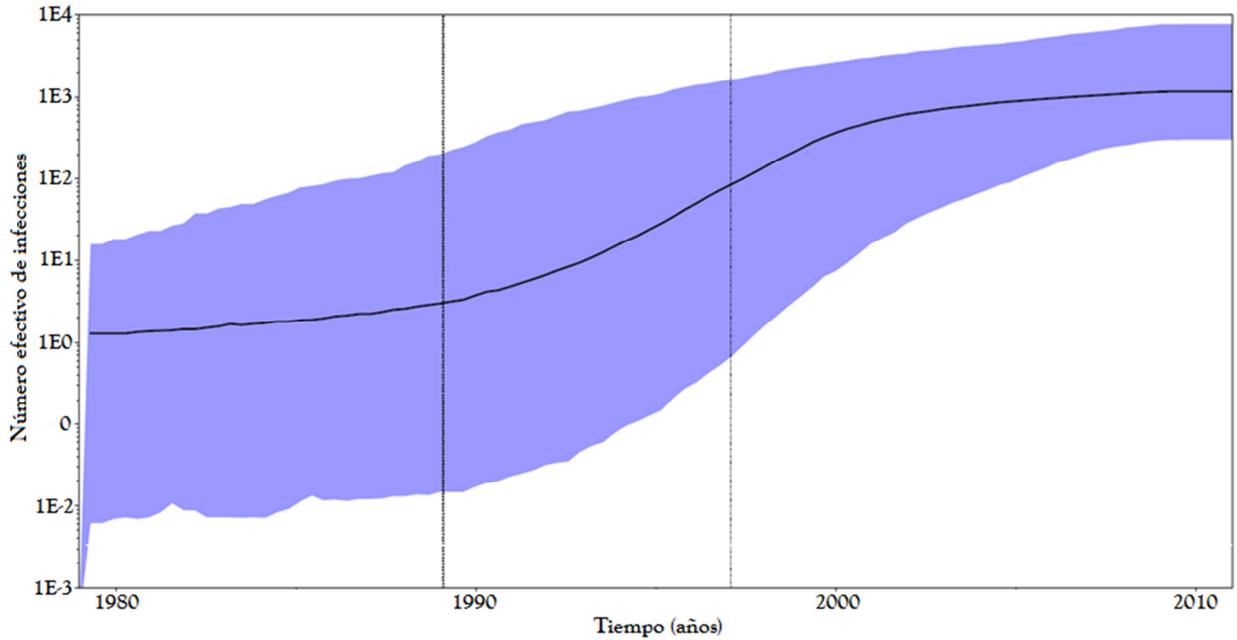
**Figura 4.13. Árbol filogenético de ML del subtipo 1b del VHC.** Árbol filogenético de ML realizado con el set de datos de secuencias 1b de Uruguay y del resto del mundo. En rojo se representan las secuencias uruguayas.

## 4.7. Reconstrucción demográfica de los clústeres locales de los subtipos 1a y 3a

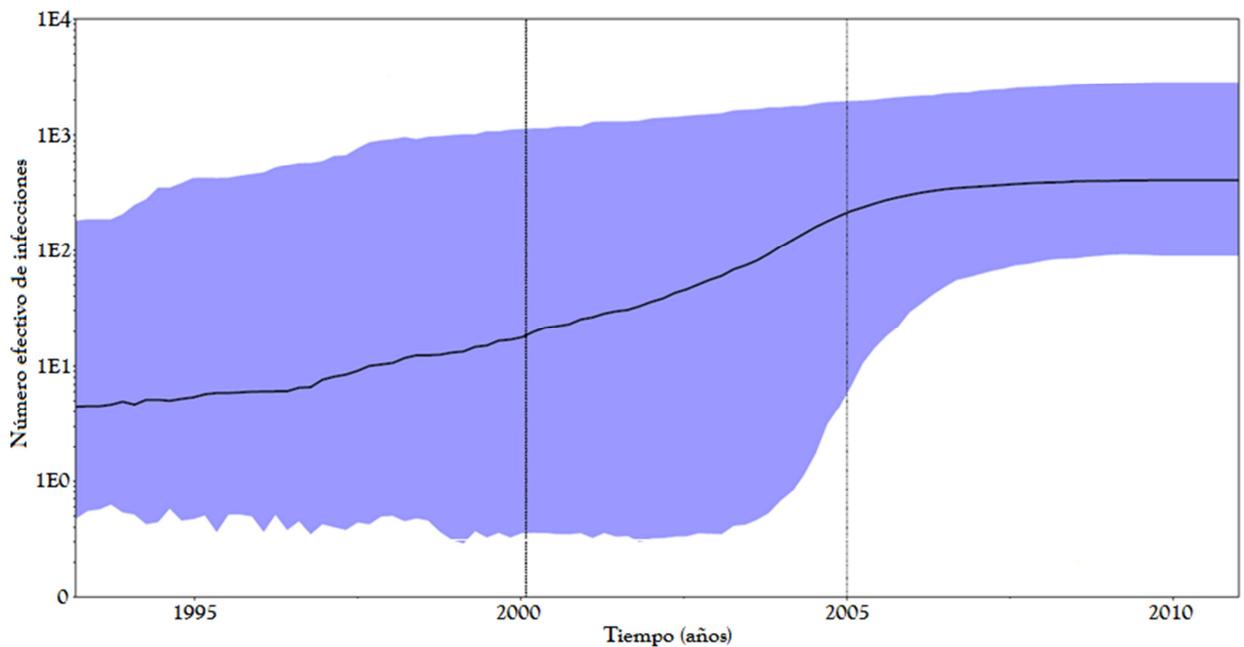
### 4.7.1. Clúster Uru-1a del subtipo 1a

La reconstrucción de la historia evolutiva del clúster Uru-1a, perteneciente al clado 1 del subtipo 1a, difundido a nivel local fue reconstruida en base a dos intervalos de tasas de sustitución previamente publicadas y bajo un árbol coalescente de *skyline* bayesiano. Con el dato previo de la “tasa lenta” ( $5 \times 10^{-4}$  –  $7 \times 10^{-4}$  sustituciones/sitio/año), la dispersión del clúster (tMRCA) comenzó en el año 1989 (1979-1997, 95% HPD) y el gráfico del *skyline* bayesiano mostró un período de crecimiento exponencial hasta el año 2000 con una expansión relativamente controlada desde entonces. Por otro lado, cuando se utilizó la “tasa rápida” ( $7 \times 10^{-4}$  –  $1,4 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año) para el análisis, el tMRCA se estimó en el año 2000 (1993-2005, 95% HPD) y el gráfico del *skyline* bayesiano mostró un crecimiento exponencial hasta el año 2005 con una expansión relativamente controlada desde entonces (figuras 4.14 y 4.15).

La historia demográfica del virus fue similar con ambas tasas, con una expansión inicial luego del ingreso del virus al país, para luego llegar a una fase de “control” en el número efectivo de infecciones. Difieren en los años en los que se da cada etapa, en primer lugar en el tMRCA, siendo de 11 años anterior en el caso de la “tasa rápida”, luego la etapa de expansión exponencial se ve retrasada en el caso de la “tasa lenta”, para culminar ambas en una fase controlada, que comienza de forma retrasada cuando se utiliza la “tasa lenta”.



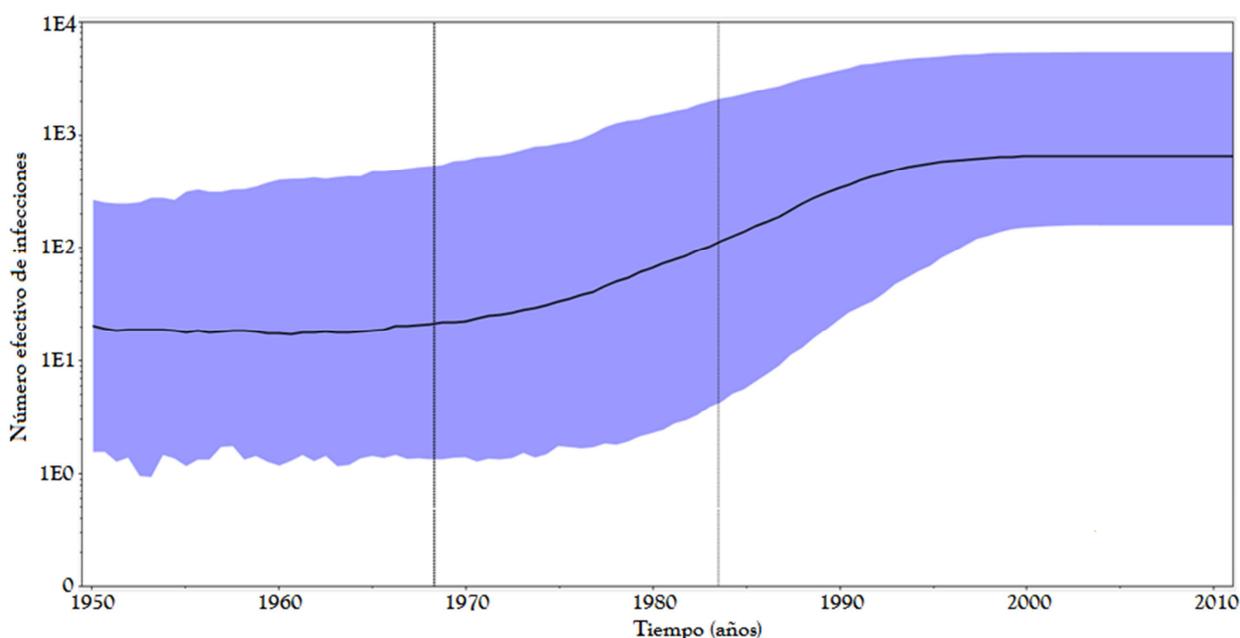
**Figura 4.14.** BSP del clúster local Uru-1a, del subtipo 1a utilizando la “tasa lenta” como *prior*. Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo para el clúster de dispersión local del subtipo 1a utilizando la tasa de evolución estimada por Pybus y colaboradores (2001).



**Figura 4.15.** BSP del clúster local Uru-1a, del subtipo 1a utilizando la “tasa rápida” como *prior*. Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo para el clúster de dispersión local del subtipo 1a utilizando la tasa de evolución estimada por Magiorkinis y colaboradores (2009).

#### 4.7.2. Clúster Uru-3a del subtipo 3a

En cuanto al clúster de dispersión local hallado para el subtipo 3a, denominado clúster Uru-3a, cuya historia evolutiva fue reconstruida en base a una tasa de evolución previamente estimada para este subtipo por Zehender y colaboradores (2013) de  $1,04 \times 10^{-3}$  –  $1,48 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año, estimamos el tMRCA en el año 1970 (1950-1984, 95% HPD). El gráfico del *Skyline* bayesiano mostró un período de crecimiento desde el año 1970 hasta el año 1995 con una expansión relativamente controlada desde entonces (figura 4.16). En anexo se muestran los resultados obtenidos al utilizar únicamente las secuencias uruguayas que forman el clúster monofilético uruguayo (figura 8.3).



**Figura 4.16.** BSP del clúster local Uru-3a, del subtipo 3a. Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a medida que avanzan los años para el clúster de dispersión local del subtipo 3a utilizando la tasa de evolución estimada por Zehender y colaboradores (2013).

## 4.8. Reconstrucción histórica evolutiva de los subtipos 1a y 3a

### 4.8.1. Subtipo 1a

Se reconstruyó la historia evolutiva del subtipo 1a con todas las secuencias uruguayas de este subtipo, nuevamente utilizando las dos tasas previamente publicadas para este subtipo. El tMRCA obtenido fue 1959 (1930-1982, 95% HPD), utilizando como prior el dato de la “tasa rápida”, mientras que el tMRCA, utilizando como prior el dato de la “tasa lenta”, fue en el año 1932 (1891-1962, 95% HPD). Los gráficos de *skyline* obtenidos para ambas tasas (figuras 4.17 y 4.18), sugieren una historia similar, con una fase donde se mantiene el número efectivo de infecciones de decenas de años para luego mostrar un crecimiento de menor importancia, seguido de un crecimiento exponencial del número efectivo de infecciones para volver a mantenerse estable hasta la actualidad. Para la “tasa rápida”, la primera fase de mantenimiento del número efectivo de infecciones se extiende hasta aproximadamente el año 1975, donde comienza la primera fase de crecimiento hasta el año 1995, que da paso a la fase de crecimiento exponencial hasta aproximadamente el año 2000, donde comienza la última fase en la cual el número efectivo de infecciones se mantiene hasta la actualidad. Por otro lado, la “tasa lenta”, muestra un cierto retraso en el tiempo en que se dan las distintas fases con respecto a la “tasa rápida”, con la primera fase donde se mantiene el número efectivo de infecciones hasta aproximadamente el año 1960, luego la primera fase de crecimiento hasta aproximadamente el año 1990, dando lugar a la fase de crecimiento exponencial entre el año 1990 y el 2000 aproximadamente, donde comienza la fase de mantenimiento del número efectivo de infecciones hasta la actualidad. En la sección Anexo, figuras 9.1 y 9.2 se muestran los resultados obtenidos al usar las secuencias uruguayas obtenidas para este subtipo, excluyendo las secuencias pertenecientes al clúster Uru-1a.

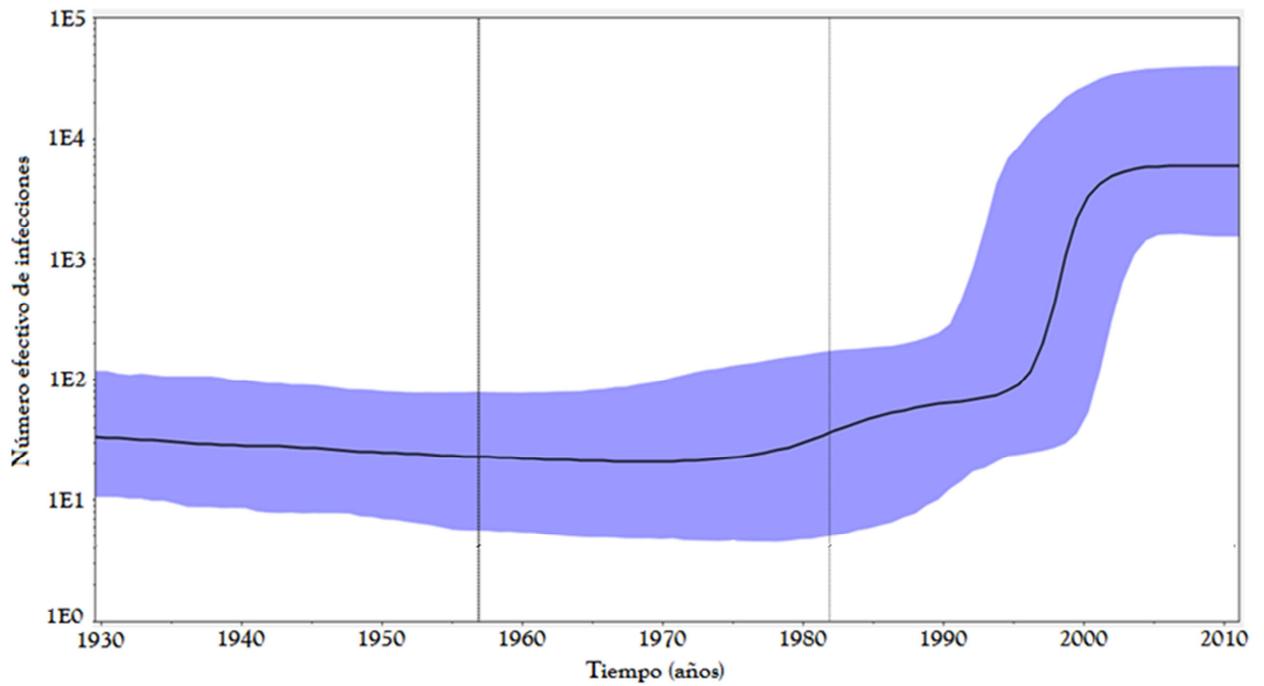


Figura 4.17. BSP del subtipo 1a utilizando la “tasa rápida” como *prior*. Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo para el subtipo 1a utilizando todas las secuencias uruguayas y la tasa de evolución estimada por Magiorkinis y colaboradores (2009).

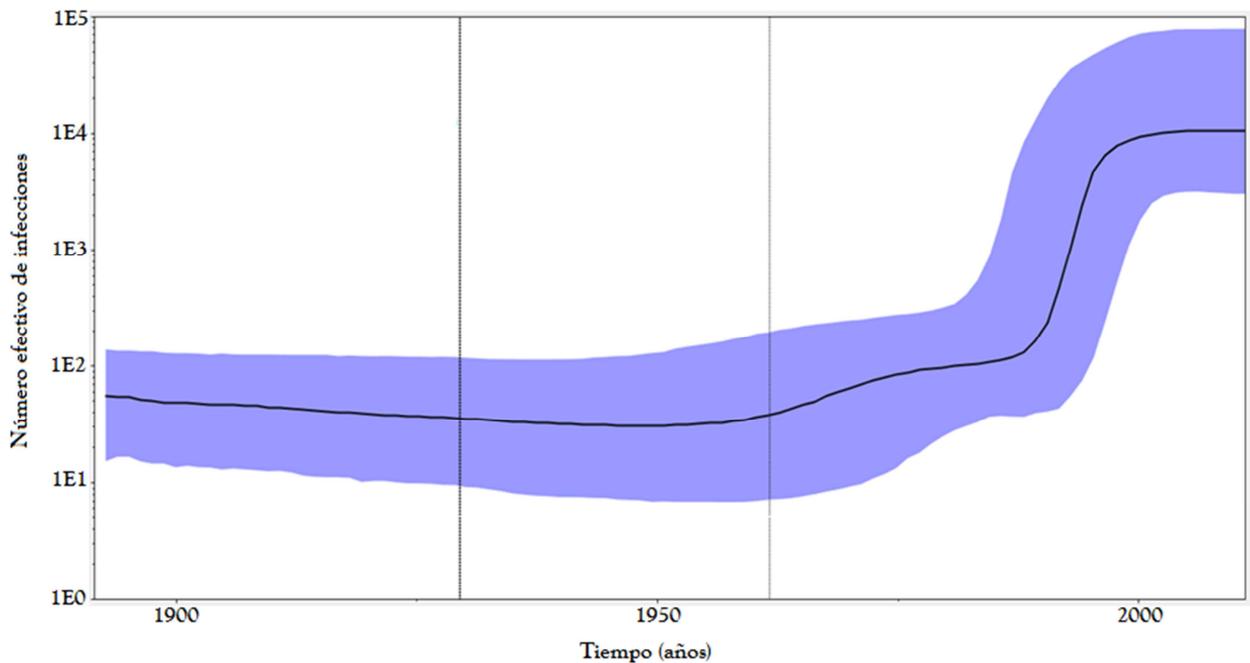
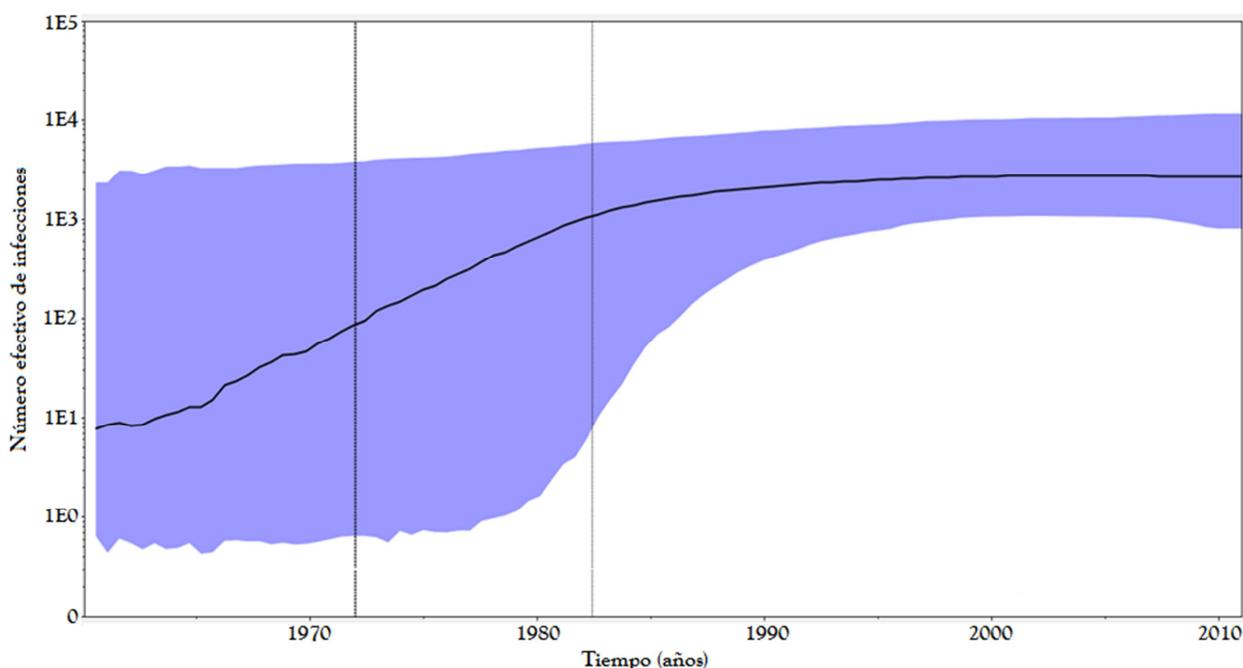


Figura 4.18. BSP del subtipo 1a utilizando la “tasa lenta” como *prior*. Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo para el subtipo 1a utilizando todas las secuencias uruguayas y la tasa de evolución estimada por Pybus y colaboradores (2001).

#### 4.8.2. Subtipo 3a

La reconstrucción de la historia evolutiva del subtipo 3a se realizó con todas las secuencias pertenecientes a este subtipo obtenidas en este estudio. Se utilizó la tasa previamente estimada por Zehender y colaboradores (2013), como dato previo para el análisis. El tMRCA obtenido luego del análisis fue 1972 (1960-1982, 95% HPD). El gráfico de Skyline bayesiano para este subtipo (figura 4.20), muestra dos fases: la primera de ellas hasta finales de los '80 donde se aprecia un crecimiento continuo del número efectivo de infecciones, mientras que a partir del año 1990 aproximadamente comienza una fase donde el número efectivo de infecciones se mantiene constante a lo largo del tiempo.



**Figura 4.19. BSP del subtipo 3a.** Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo para el subtipo 3a utilizando todas las secuencias uruguayas y la tasa de evolución estimada por Zehender y colaboradores (2013).

## **5. Discusión**

### **5.1. Optimización de la PCR para la región NS5B del VHC**

Se logró optimizar la PCR para la región NS5B, logrando obtener condiciones adecuadas de amplificación, a partir de los cebadores publicados por Cantaloube y colaboradores (2005). Dichas condiciones fueron pre-establecidas para todos los experimentos realizados en el marco de la presente tesis. La primera ronda de amplificación generalmente no logró ser visualizada en los geles de agarosa al 2%, sin embargo, la visualización de las bandas esperadas para la segunda ronda de amplificación fueron visualizadas claramente en los casos positivos.

### **5.2. Muestras amplificadas y secuenciadas de la región NS5B**

El porcentaje global de amplificación de 65,2%, en principio no es muy alto, teniendo en cuenta que se procesaron solamente muestras previamente positivas por PCR. Sin embargo, es importante mencionar que las mismas provienen de un muestreo que comenzó en el año 2005, con varios procesos de congelado y descongelado. De todas formas, el total de 165 secuencias es alto teniendo en cuenta la prevalencia estimada (0,43%) en la población total del país que en el año 2011 era de 3.286.314 personas según el censo realizado ese mismo año (<http://www.ine.gub.uy/censos2011/index.html>). Estimamos en base a estos datos que existen en Uruguay alrededor de 14.000 infectados con VHC. Entonces el porcentaje de secuencias obtenidas es del 1,2% del total de los pacientes infectados en el país.

### **5.3. Comparación de dos métodos de extracción**

La comparación de los métodos de extracción no fue un objetivo de esta tesis, sin embargo, al comparar los resultados de muestras amplificadas a

partir de extracciones por un método o el otro es que consideramos que la extracción por kit comercial fue más eficiente. Pero es importante considerar en este caso que la comparación no fue hecha intra-muestra, sino que fue una comparación de lotes, los cuales tuvieron las mismas condiciones entre sí, como los sucesivos descongelados y congelados, el transporte desde Montevideo a Salto, así como también las reacciones que le siguieron a la extracción. Además vale recordar que se partió de muestras previamente determinadas como positivas por RT-PCR, aunque para otra región del genoma.

Por lo tanto, los resultados de positividad absolutos obtenidos a partir de la extracción por el sistema comercial *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Applied Science™) indicarían que fue más efectiva, en este caso con un porcentaje de 80,4% de muestras positivas. Sin embargo esta observación no significa que la extracción por *TRizol® Reagent* (Invitrogen™), que tuvo un 56,1% de muestras positivas luego de la extracción por este método, haya sido ineficiente, por el contrario, más experimentos deberían realizarse para obtener una conclusión al respecto, y los mismos no estaban enmarcados como objetivos del presente estudio.

#### **5.4. Determinación de los genotipos y subtipos del VHC circulantes en Uruguay**

La determinación de los genotipos y subtipos del VHC circulantes en Uruguay se realizó utilizando la región Okamoto del gen que codifica para la proteína NS5B (posición en el genoma del VHC del nucleótido 8282 al 8610 en referencia la secuencia H77 con número de acceso AF009606), una pequeña región altamente conservada y muy utilizada para hacer estudios de genotipificación, subtipificación, filogenia, filodinámica y filogeografía, debido a su elevada capacidad informativa. El estudio de esta región permite una correcta asignación filogenética de genotipos y subtipos de VHC, así como también es representativa de la topología del genoma completo del virus

(Hraber et al., 2006). El modelo que mejor se ajustó a nuestro alineamiento generado con las secuencias obtenidas en esta tesis más las secuencias correspondientes a los genomas de referencia obtenidos de la base de datos de Los Alamos HCV (Kuiken et al., 2005; 2008) fue el GTR +  $G_4$  + I, lo cual era esperable ya que es el modelo más utilizado para VHC en la bibliografía (Lampe et al., 2010; 2013). Los subtipos descritos en el presente estudio, 1a, 1b, 3a, 2c y 2b fueron los más frecuentemente identificados en Sudamérica, con reportes de los mismos en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia y Venezuela (Moratorio et al., 2007; Di Lello et al., 2009; Lopes et al., 2009; Lampe et al., 2010; Ré et al., 2011; Alvarado-Mora et al., 2012; Culasso et al., 2012; di Filippo et al., 2012; Jaspe et al., 2012; da Silva et al., 2013; de Jesus et al., 2013; del Pino et al., 2013; Lampe et al., 2013; Pereira et al., 2013), sin embargo no se logró identificar ninguna secuencia perteneciente al subtipo 2a, el cual fue hallado también en varios de los reportes mencionados previamente, ni el subtipo 2j, comúnmente presente en Venezuela y Argentina (Sulbarán et al., 2010; del Pino et al., 2013), o el genotipo 4 como fue descrito en Argentina (Bolcic et al., 2011).

Si bien en Uruguay no contábamos hasta el presente, con trabajos que realizaran un estudio exhaustivo sobre los distintos genotipos y subtipos que circulan en el país y su prevalencia relativa, existen estudios donde se determinaron los genotipos circulantes en el Uruguay (Burjel et al., 1998; Colina et al., 1999; Moratorio et al., 2007). Sin embargo, estos trabajos fueron realizados con secuencias pertenecientes a la región 5'NCR, que actualmente cayó en desuso debido a su falla en la asignación correcta de subtipos de VHC muy emparentados filogenéticamente entre sí (Stuyver et al., 1994; Cantaloube et al., 2006; Murphy et al., 2007; Nakatani et al., 2011). Además, los mismos fueron realizados con un bajo número de secuencias (n=8, n=17 y n=25 respectivamente), sin llegar a ser representativos de la población nacional infectada por el VHC.

## 5.5. Estudios de recombinación genética

Estos estudios de recombinación genética se realizaron con motivo de estimar la ocurrencia de eventos de recombinación en la región de Okamoto, región utilizada en este estudio, ampliamente utilizada para la determinación de los genotipos y subtipos y a su vez estudiar la recombinación del VHC. Además estos estudios se realizaron con el motivo de evitar que la ocurrencia de la misma interfiera en los análisis de coalescencia (Möhle, 2000; McVean et al., 2002; Cutter, 2013; Davies et al., 2013).

No se encontró ninguna secuencia recombinante, lo cual determinó que todas las secuencias obtenidas eran plausibles de ser utilizadas para los siguientes análisis filodinámicos. Además, se confirmó que esta región era adecuada para la subtipificación de nuestras secuencias debido a la ausencia de recombinación en ninguna de nuestras secuencias y lo ya destacado previamente intrínseco a la región NS5B, indicándola como la más adecuada para realizar eficientemente estos estudios (Hraber et al., 2006).

## 5.6. Entradas del VHC a Uruguay

Aunque diversos estudios informan de varias introducciones distintas del virus en los países vecinos Argentina y Brasil (Lampe et al., 2010; Ré et al., 2011; Culasso et al., 2012; Del Pino et al., 2013; Lampe et al., 2013), estos eventos continuaban siendo desconocidos para nuestro país. De todos modos, así como se esperaba que la distribución de los subtipos sea similar a la reportada en los países occidentales, se esperaba también que nuestro país tuviera una epidemia de múltiples entradas como ocurre en los países vecinos (Lampe et al., 2010; 2013). Para confirmar esta teoría se realizó el análisis filogenético de ML con secuencias de Uruguay y secuencias representativas de todo el mundo para los tres subtipos predominantes, 1a, 1b y 3a (Lampe et al., 2013).

Los resultados de los análisis filogenéticos con el objetivo de determinar si en Uruguay había existido un sólo evento independiente de introducción del virus y a partir de éste una propagación a todo el país o si la dispersión se debe a varios ingresos distintos en el país, confirmaron que efectivamente en Uruguay han existido múltiples eventos de entradas de VHC en los tres subtipos principales, como se describe en otros países de la región. La confirmación de este hecho fue realizada por la identificación de una gran cantidad de linajes distintos con secuencias uruguayas emparentadas con secuencias procedentes de otros lugares del mundo y una gran distancia filogenética entre las propias secuencias uruguayas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los múltiples ingresos podrían ser una característica intrínseca de la epidemiología de estos subtipos a nivel mundial, concordante también por los medios de transmisión asociados a estos subtipos y la gran movilidad mundial de personas que existe actualmente.

### **5.6.1. Subtipo 1a**

Se obtuvieron 86 secuencias correspondientes al subtipo 1a, lo que corresponde a más de la mitad del total de las muestras secuenciadas (52%) y contrariamente a lo descrito en Brasil, donde el 98% de las secuencias pertenecieron al subtipo 1a, clado 1 (Lampe et al., 2013), en nuestro país el 72% de las secuencias pertenecen a este clado, un porcentaje menor al reportado en Brasil. Por el contrario, la cantidad de secuencias pertenecientes al subtipo 1a, clado 2 en Brasil fue solamente el 2% (Lampe et al., 2013), en Uruguay fue del 28%, indicando la existencia de una variación mayor en nuestro país respecto a lo registrado en Brasil, con una dispersión mayor y más entradas de estirpes del clado 2 a nuestro país.

Paralelamente al hallazgo de múltiples entradas, se encontró un linaje monofilético con 35 secuencias uruguayas (40%) denominado Uru-1a. Este linaje indica una entrada seguida de una dispersión local del virus dentro del

país, por lo que su estudio en profundidad tiene un gran valor en cuanto a la posibilidad de realizar la reconstrucción histórica del mismo. Esto se ve reforzado con la observación de que el número de secuencias que pertenecen al linaje pareciera aumentar con los años (por observación directa ya que no se realizó análisis estadístico para su confirmación), por lo que sería valioso estudiar los factores de riesgo asociados a los pacientes para detener o al menos disminuir la dispersión del virus.

Además del ya mencionado clúster uruguayo Uru-1a, se encontró una distribución de múltiples linajes independientes con muy pocas secuencias uruguayas en cada uno de ellos, menos de tres secuencias y la gran mayoría de los linajes con una única secuencia uruguaya, con la excepción de dos linajes con más de cinco secuencias uruguayas denominados Uru-A y Uru-B. Estos linajes podrían ser el comienzo de nuevos linajes locales, por lo que es importante estudiar más a fondo estos casos para determinar si los pacientes pertenecen a algún grupo de riesgo y evitar su posible propagación.

El clúster Uru-A pertenece al clado 1 al igual que el Uru-1a, mientras que el linaje Uru-B pertenece al clado 2. Estudios sobre las posibles diferencias reportadas en la respuesta al tratamiento entre ambos clados del subtipo 1a podrían ayudar a predecir mejor el futuro de un paciente en tratamiento con agentes antivirales de acción directa (Peres-da-Silva et al., 2012).

### **5.6.2. Subtipo 3a**

En el análisis filogenético realizado para el subtipo 3a con 40 secuencias uruguayas (24%), podemos ver varios linajes con no más de 2 secuencias, salvo un grupo parafilético de 11 secuencias uruguayas denominado Uru-3a. Este es un grupo de probable dispersión local, y forma un grupo monofilético con 8 secuencias de Europa, 1 de Asia y 1 de América. A su vez, 9 de estas 11 secuencias se agrupan formando un pequeño clúster monofilético del

subtipo 3a, aumentando la posibilidad que la dispersión de este grupo sea en Uruguay.

Probablemente los linajes con secuencias únicas de Uruguay no tienen o tienen muy poca dispersión local debido a que se distribuyen entre secuencias no-uruguayas. Esta situación es la misma encontrada en la región y casi todo el resto del mundo, por lo que podríamos mencionar que el comportamiento del virus en nuestro país es similar al comportamiento del subtipo a nivel mundial (Lampe et al., 2013).

### **5.6.3. Subtipo 1b**

El análisis filogenético realizado para el subtipo 1b, con 27 secuencias (16%), mostró un patrón único de múltiples linajes con no más de 2 secuencias uruguayas. Nuevamente, estos probablemente sean linajes sin o con muy poca dispersión local debido a que las secuencias uruguayas se distribuyen entre secuencias no-uruguayas. El subtipo 1b se asocia principalmente a las transfusiones (Pawlotsky et al., 1995; Basaras et al., 1997; Oliveira et al., 1999) por lo que es esperado que no tenga mucha dispersión local y sí muchos linajes distintos. Esto es debido principalmente al tamizaje en los bancos de sangre, limitando la dispersión a partir de una misma cepa, determinando además, que se encuentre en menor proporción que los subtipos 1a y 3a. Sumado a esto, en general los pacientes infectados por el subtipo 1b son mayores en edad que el resto de los pacientes con otros subtipos encontrados en la región (Basaras et al., 1997).

## **5.7. Reconstrucción demográfica de los clústeres locales de los subtipos 1a y 3a**

### **5.7.1. Clúster Uru-1a del subtipo 1a**

La historia demográfica del clúster Uru-1a perteneciente al clado 1 del subtipo 1a fue inferida a través de la utilización de las dos tasas de evolución determinadas previamente (Pybus et al., 2001; Magiorkinis et al., 2009) y mostró una evolución similar en el número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo en ambos casos, pero difiriendo en algunos parámetros como el año del MRCA. Esta diferencia es de aproximadamente 11 años. En el caso en que se utilizó la "tasa lenta" determinada por Pybus y colaboradores (2001), el tMRCA se estimó en 1989. El origen y posterior propagación del clúster se remonta al año de descubrimiento del VHC (1989) por lo que se desconocía la enfermedad hasta ese momento y en Uruguay no se realizaba tamizaje en las transfusiones de sangre, ni controles en personas que usaban drogas inyectables. En este escenario, los pacientes desconociendo su infección por el VHC, donaban sangre y/o compartían jeringas propagando el virus. Hacia el 2000 se inició un período de "control" en el número efectivo de infecciones, el cual podría estar relacionado con el tamizaje en los centros de donación, pero principalmente con una reestructuración de la Junta Nacional de Drogas (JND) y la Secretaría Nacional de Drogas (SND) ([http://www.infodrogas.gub.uy/images/stories/pdf/2000\\_mem.pdf](http://www.infodrogas.gub.uy/images/stories/pdf/2000_mem.pdf)), que en el año 2000 comenzó a realizar estudios, campañas de prevención de drogas y promoción de la salud, así como uso de la publicidad para aumentar la conciencia pública sobre los riesgos de las drogas, incluyendo entre los mismos la transmisión del VHC y VIH, así como también el tratamiento de las personas afectadas por el consumo de drogas.

Por otro lado, utilizando la "tasa rápida" determinada por Magiorkinis y colaboradores (2009), el año del MRCA es más reciente en el tiempo, en el año 2000. Para esta fecha, el virus ya era conocido y estaba implementado el sistema de tamizaje obligatorio desde el año 1995, en CASMU desde 1993 (<http://www.smu.org.uy/elsmu/comisiones/vih/hepatbyc.pdf>), por lo que las transfusiones dejarían de tener un papel significativo en la transmisión del virus, aunque no debe ser descartada, ya que en Uruguay no está claro si todos los

centros de donación realizaban este tamizaje correctamente. Sin embargo, el uso de drogas inyectables y el intercambio de agujas podrían ser responsables de la propagación de este clúster en el país debido a que este subtipo se asocia principalmente a este tipo de transmisión (Pawlotsky et al., 1995; Cochrane et al., 2002). Por otro lado, se encontró una pequeña diferencia en el año que comenzó la etapa de control del número efectivo de infecciones en comparación con la “tasa lenta”, siendo aproximadamente el 2005 el año de inicio, mientras que con la “tasa lenta” fue por el 2000, por lo que el papel de la JND podría haber sido decisivo en el control de la enfermedad.

La reestructuración de la JND en Uruguay comenzó en el 2000, pero la serie de campañas preventivas fueron apareciendo con los años y por lo que es esperado recién ver los resultados años después, a medida que la población toma conciencia. En el año 1998, la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD) de la Organización de los Estados Americanos (OEA) estableció el Mecanismo de Evaluación Multilateral (MEM) para la cooperación internacional como instrumento indispensable para hacer frente al problema de las drogas ([http://www.infodrogas.gub.uy/html/informes-documentos/docs/hemisferico\\_cicad\\_2001\\_esp.pdf](http://www.infodrogas.gub.uy/html/informes-documentos/docs/hemisferico_cicad_2001_esp.pdf)), por lo que también debe haber tenido un impacto en el control del número de infecciones.

### **5.7.2. Clúster Uru-3a del subtipo 3a**

El análisis realizado para determinar la historia demográfica del grupo uruguayo Uru-3a determinó que el virus tuvo un crecimiento continuo en su número efectivo de infecciones a partir de su ingreso al país hasta aproximadamente el año 1990, donde el número efectivo de infecciones comienza a ser constante siendo así hasta la fecha. El año del MRCA se remonta a 1970 indicando una presencia del clúster de al menos cuarenta años. Su dispersión sin embargo es más leve que la del subtipo 1a, ya que el número efectivo de infecciones aumenta relativamente menos y a lo largo de

un período mayor. Este subtipo está asociado, al igual que el subtipo 1a, al uso de drogas intravenosas (Pawlotsky et al., 1995; Basaras et al., 1997; Oliveira et al., 1999; Cochrane et al., 2002; Salehi Moghadam et al., 2014), por lo que probablemente las infecciones aumentaron entre las décadas del 70' y 90'. Por otro lado, y con respecto al control de las infecciones desde 1985-1990 en adelante, podemos mencionar al tratamiento de la infección por el VHC como arma fundamental para lograr este objetivo. El tratamiento es efectivo en pacientes con el subtipo 3a del VHC por lo que aquellos pacientes que recibieron un tratamiento adecuado lograron eliminar el virus y evitar su dispersión.

## **5.8. Reconstrucción histórica evolutiva de los subtipos 1a y 3a**

La reconstrucción de la historia evolutiva de los dos subtipos predominantes en el país se realizó utilizando todas las secuencias obtenidas para cada subtipo, sin tomar en cuenta si provenían de un único ingreso al país o si provenían de varios ingresos distintos. De esta forma obtenemos la historia general del subtipo en Uruguay.

### **5.8.1. Subtipo 1a**

El año del MRCA obtenido para el subtipo 1a fue 1959 (1930-1982, 95% HPD), utilizando como dato previo el rango de la “tasa rápida”, mientras que el año del MRCA, utilizando como dato previo el rango de la “tasa lenta”, fue 1932 (1891-1962, 95% HPD). Esta variación se debe a la velocidad de evolución marcada por las diferentes tasas de evolución estimadas, como se mencionó previamente una de ellas más rápida que la otra, por lo que este resultado era previsible. Es decir, que el ancestro común más reciente sea más antiguo en el caso del análisis con la “tasa lenta”, debido a que el mismo fue realizado con una tasa que a partir de las mismas secuencias estima que su evolución es más lenta por lo que necesita ir más lejos en el tiempo para

explicar las sucesivas sustituciones ocurridas y observadas en las secuencias obtenidas en este estudio.

En cuanto a los gráficos de *skyline* obtenidos para ambas tasas, los cuales sugieren una historia similar en ambos casos, son también coherentes con el hecho de que la tasa de evolución marca la velocidad a la que evoluciona el virus pero no la cantidad de infecciones, en este caso evaluada mediante el número efectivo de infecciones. En cuanto a la historia sugerida por la “tasa lenta”, el primer aumento en el número de infecciones no tan marcado, puede corresponder al hecho de que las transfusiones no eran controladas en esos años (entre 1960 y 1990), recordando que el tamizaje comenzó a ser obligatorio en los primeros años de la década del 90. Este crecimiento en el número efectivo de infecciones (NEI) no es tan marcado debido a que el subtipo 1a está más asociado al uso de drogas inyectables que a transfusiones. Posteriormente, comienza una etapa de gran aumento en el NEI de aproximadamente 10 años de duración la cual podría estar asociada al aumento en el uso de drogas inyectables en esos años, con estudios realizados en Uruguay mostrando un aumento en la asociación del uso de estas drogas con el número de infectados con el VIH a partir del año 1989, sabiendo que el VIH es un virus con estrecha relación con el VHC, en términos de vías de transmisión (JND, 1996; Berriolo et al., 1997). Este último aumento se corresponde también con el aumento en el NEI del clúster Uru-1a. Luego el control en el NEI hacia el año 2000 lo podemos asociar a la acción del tamizaje en los centros de donación, pero principalmente a la reestructuración de la JND y la SND, al igual que el clúster Uru-1a.

En cuanto a los resultados obtenidos con la “tasa rápida” donde se observó el primer aumento en el NEI entre 1975 y 1995 aproximadamente, al igual que para la “tasa lenta”, se puede correlacionar al hecho de que no se realizaba el tamizaje obligatorio, el cual comenzó a ser obligatorio en todo el país en el año 1995. Luego al igual que para la “tasa lenta” se observó el gran aumento en el NEI, relacionándolo también al uso de drogas inyectables,

y por último el control en el NEI debido al tamizaje en los centros de donación, pero principalmente a la reestructuración de la JND y la SND, como fue observado en todos los análisis realizados para este subtipo.

Por último, en el análisis realizado con las secuencias uruguayas excluyendo aquellas que pertenecen al clúster Uru-1, obtuvimos el mismo patrón de comportamiento que al utilizar todas las secuencias, demostrando la robustez del análisis y del programa utilizado.

### **5.8.2. Subtipo 3a**

El subtipo 3a, ha estado presente en el país, desde mediados del siglo XX, pero su ingreso al país es más reciente en comparación con el subtipo 1a, coherente con lo publicado para otras regiones del mundo (Pawlotsky et al., 1995). Desde su ingreso, el subtipo muestra un crecimiento en el NEI constante a lo largo del tiempo. Lo más destacado es el control en el NEI posiblemente relacionado al hecho de que el tratamiento es altamente efectivo en pacientes infectados con este subtipo, logrando de esta forma controlar las infecciones por este subtipo desde el año 1990. Además, estar infectados con el genotipo 3 es uno de los criterios de inclusión para que el tratamiento sea cubierto por el Fondo Nacional de Recursos en Uruguay (FNR, 2012).

## 7. Conclusiones

Es el primer estudio de epidemiología molecular en Uruguay.

Se determinaron los subtipos circulantes en Uruguay entre los años 2005 y 2011, siendo los mismos 1a (52,1%), 3a (24,2%), 1b (16,4%), 2c (5,4%) y 2b (1,8%).

No se detectó ninguna secuencia recombinante en la región parcial de la NS5B estudiada.

Se detectaron múltiples ingresos del virus al país para los 3 subtipos predominantes (1a, 3a y 1b).

Los subtipos 1a y el 3a mostraron clústeres de dispersión local del virus, mientras que el subtipo 1b no mostró una posible dispersión local.

La dispersión de los clústeres locales Uru-1a y Uru-3a se encuentra controlada, pero es necesario realizar un mayor esfuerzo para poder disminuir la cantidad de personas infectadas con estas estirpes.

Los subtipos 1a y 3a tienen una larga historia dentro del país, cuyos ingresos se remontan a mediados del siglo XX.

Al igual que los clústeres de dispersión local Uru-1a y Uru-3a, tanto el subtipo 1a como el subtipo 3a en general, se encuentran en una fase relativamente controlada, aunque es necesario un esfuerzo mayor para poder disminuir la cantidad de personas infectadas con estas estirpes.

Los estudios de epidemiología molecular y filodinámica permiten determinar el impacto que tiene cada subtipo del VHC en la población y la eficacia de los tratamientos y campañas preventivas de la transmisión del VHC.

## 8. Perspectivas

Continuar estudios epidemiológicos y evolutivos hasta la actualidad mediante obtención y análisis de nuevas muestras.

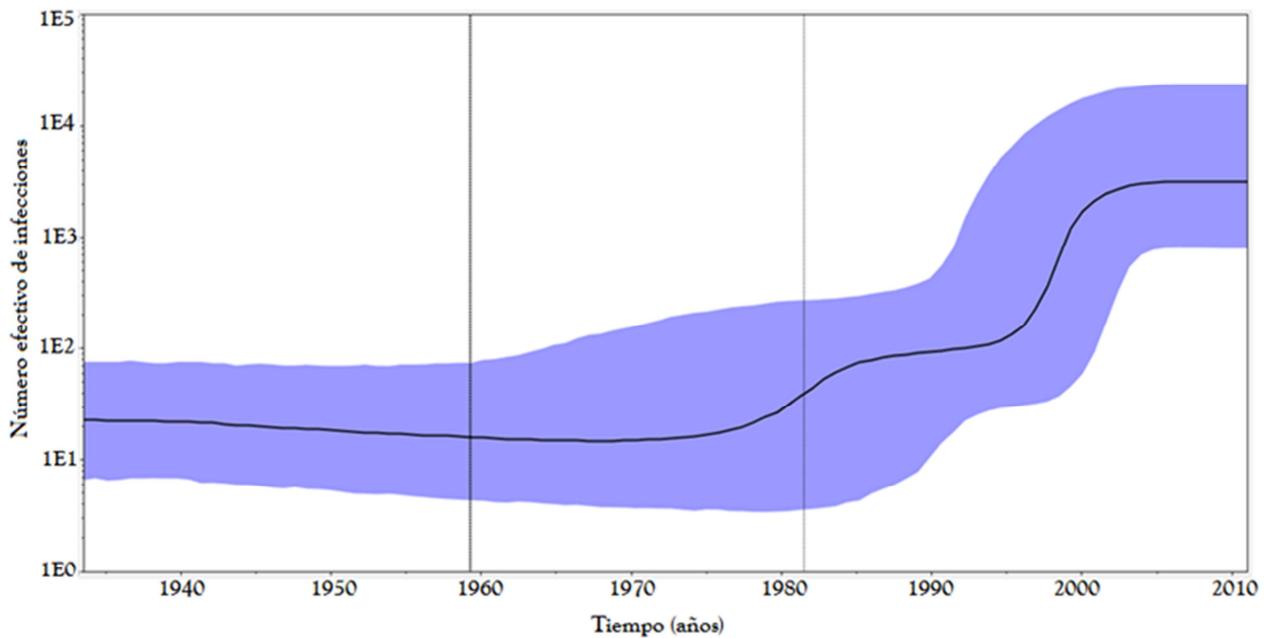
Mediante el desarrollo de diferentes metodologías buscar genotipos no descritos en el país.

Analizar la respuesta al tratamiento a nivel nacional.

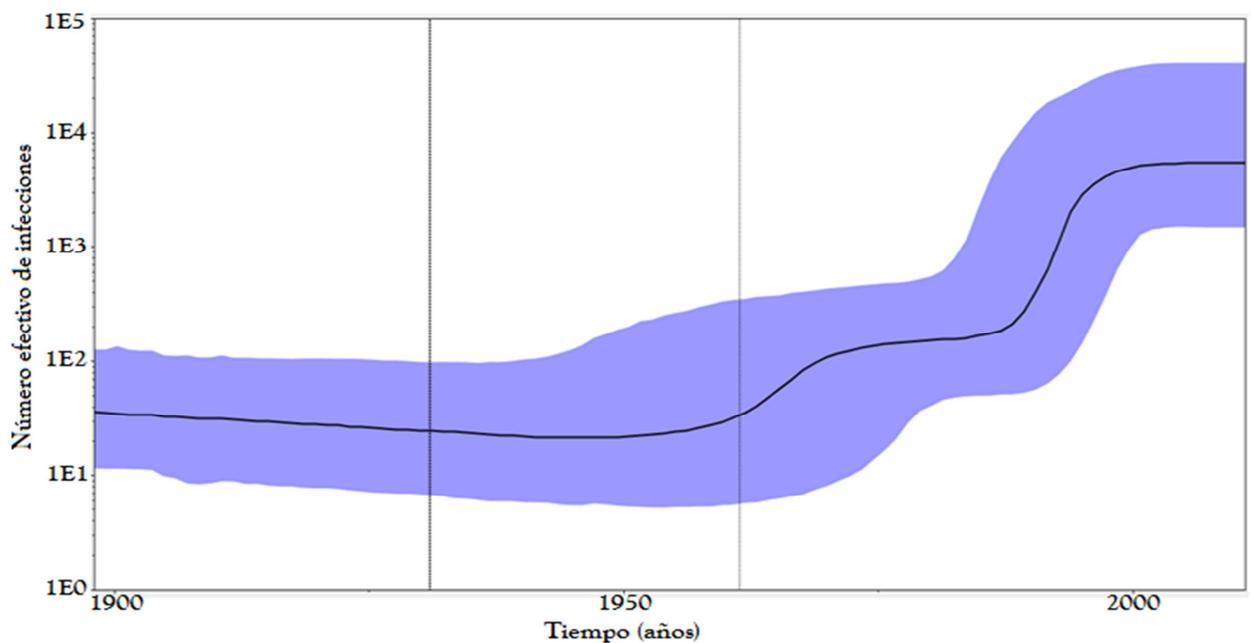
Realizar estudios evolutivos intra-paciente.

Reconstruir la historia evolutiva del subtipo 1b y los subtipos minoritarios.

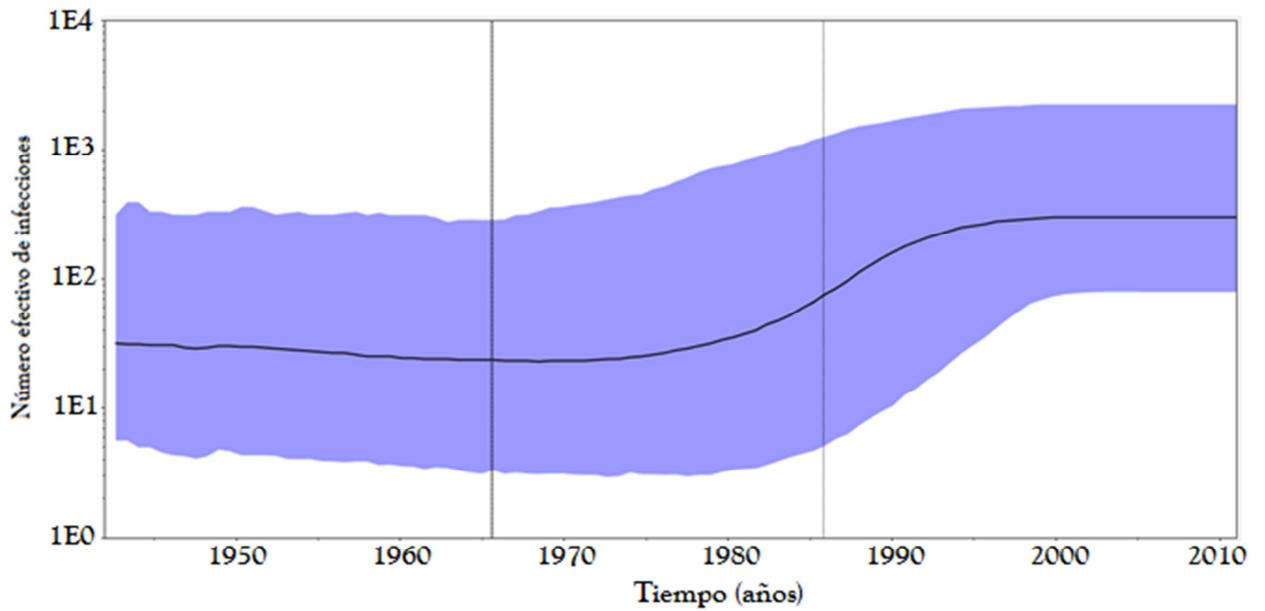
## 9. Anexo



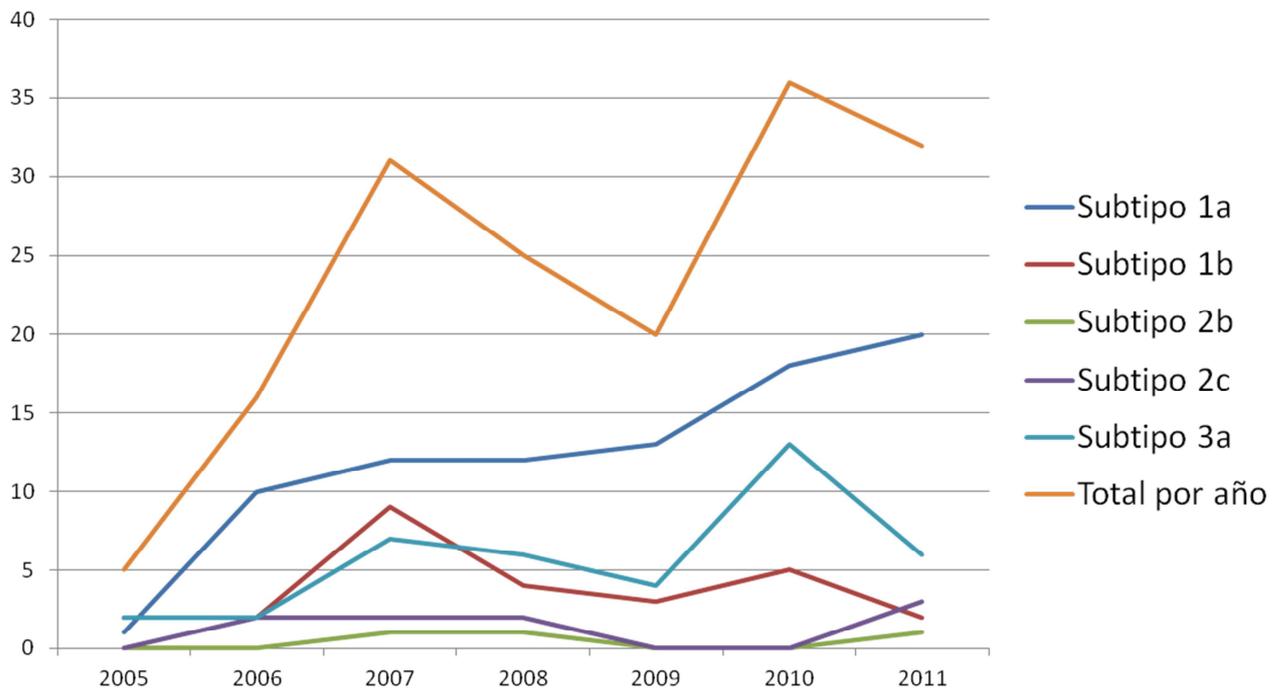
**Figura 9.1.** BSP del subtipo 1a utilizando la “tasa rápida” como *prior*. Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo para el subtipo 1a utilizando las secuencias uruguayas excluyendo todas aquellas que pertenecen al clúster Uru-1a y la tasa de evolución estimada por Magiorkinis y colaboradores (2009).



**Figura 9.2.** BSP del subtipo 1a utilizando la “tasa lenta” como *prior*. Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo para el subtipo 1a utilizando las secuencias uruguayas excluyendo todas aquellas que pertenecen al clúster Uru-1a y la tasa de evolución estimada por Pybus y colaboradores (2001).



**Figura 9.3. BSP del clúster local del subtipo 3a.** Se muestra el gráfico del número efectivo de infecciones a lo largo del tiempo para el clúster monofilético de dispersión local del subtipo 3a utilizando la tasa de evolución estimada por Zehender y colaboradores (2013).



**Figura 9.4. Gráfico de subtipos circulantes por año.** Se muestran los subtipos circulantes a lo largo del tiempo así como también el total de positivos por año. Se puede apreciar también el patrón seguido por cada subtipo a medida que pasan los años.

## 10. Manuscrito relacionado con esta tesis

Epidemic history of Hepatitis C virus in Uruguay.

Castells M<sup>1</sup>, Bello G<sup>2</sup>, Uriarte R<sup>3</sup>, Cristina J<sup>4</sup>, Colina R<sup>1</sup>.

1. Laboratorio de Virología Molecular, Regional Norte – Sede Salto. Universidad de la República, Salto, Uruguay.

2. Laboratorio de AIDS & Imunología Molecular, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Río de Janeiro, Brasil.

3. Laboratorio de Biología Molecular, Asociación Española Primera de Socorros Mutuos, Montevideo, Uruguay.

4. Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Manuscrito no publicado, se encuentra en fase de corrección.

## 11. Bibliografía

Abergel A, Ughetto S, Dubost S, Bonny C, Aublet-Cuvelier B, Delarocque-Astagneau E, Bailly JL, Bommelaer G, Casanova S, Delteil J, Deny P, Laurichesse H, Odent-Malaura H, Roussel J, Peigue-Lafeuille H, Henquell C. (2007) The epidemiology and virology of hepatitis C virus genotype 5 in central France. **Aliment Pharmacol Ther.** Nov 15;26(10):1437-46.

Akaike H. (1974) A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control.** 19:716-723.

Alter HJ, Holland PV, Purcell RH. (1975) The emerging pattern of post-transfusion hepatitis. **Am J Med Sci.** Sep-Oct;270(2):329-34.

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

Alter MJ. (2011) HCV routes of transmission: what goes around comes around. **Semin Liver Dis.** Nov;31(4):340-6.

Alvarado-Mora MV, Moura IM, Botelho-Lima LS, Azevedo RS, Lopes E, Carrilho FJ, Pinho JR. (2012) Distribution and molecular characterization of hepatitis C virus (HCV) genotypes in patients with chronic infection from Pernambuco State, Brazil. **Virus Res.** Oct;169(1):8-12.

Baldo V, Baldovin T, Trivello R, Floreani A. (2008) Epidemiology of HCV infection. **Curr Pharm Des.** 14(17):1646-54.

Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. (2013) The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. **Nat Rev Microbiol.** Jul;11(7):482-96.

Basaras M, Lombera N, de las Heras B, López C, Arrese E, Cisterna R. (1997) Distribution of HCV genotypes in patients infected by different sources. **Res Virol.** Sep-Oct;148(5):367-73.

Berriolo R, Osimani ML, Serra M, Weissenbacher MC. (1997) El SIDA y su asociación con el uso de drogas en Uruguay. **Rev Med Uruguay.** 13: 45-53.

Bolcic F, Jones LR, Laufer N, Quarleri J. (2011) Molecular characterization of hepatitis C virus genotype 4 sequences in HIV-coinfected patients from Argentina. **J Med Virol.** Jun;83(6):935-40.

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

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

Burjel L, Daglio M, Ghioni G, Manzin A, Pereira M, Ribeiro L, Solforosi L, Taborda M, Thomas C. (1998) Characterization of hepatitis C virus genotypes in an hemodialysis unit in Paysandú, Uruguay. **Rev Argent Microbiol.** Oct-Dec;30(4):190-4.

Burra P, Rodríguez-Castro KI, Marchini F, Bonfante L, Furian L, Ferrarese A, Zanetto A, Germani G, Russo FP, Senzolo M. (2014) Hepatitis C virus infection in end stage renal disease and kidney transplantation. **Transpl Int.** May 23.

- Caiaffa WT, Zocratto KF, Osimani ML, Martínez PL, Radulich G, Latorre L, Muzzio E, Segura M, Chiparelli H, Russi J, Rey J, Vazquez E, Cuchi P, Sosa-Estani S, Rossi D, Weissenbacher M. (2011) Hepatitis C virus among non-injecting cocaine users (NICUs) in South America: can injectors be a bridge? **Addiction**. Jan;106(1):143-51.
- Caillet-Saguy C, Lim SP, Shi PY, Lescar J, Bressanelli S. (2014) Polymerases of hepatitis C viruses and flaviviruses: structural and mechanistic insights and drug development. **Antiviral Res**. May;105:8-16.
- Cantaloube JF, Gallian P, Attoui H, Biagini P, De Micco P, de Lamballerie X. (2005) Genotype distribution and molecular epidemiology of hepatitis C virus in blood donors from southeast France. **J Clin Microbiol**. Aug;43(8):3624-9.
- Cantaloube JF, Laperche S, Gallian P, Bouchardeau F, de Lamballerie X, de Micco P. (2006) Analysis of the 5' noncoding region versus the NS5b region in genotyping hepatitis C virus isolates from blood donors in France. **J Clin Microbiol**. Jun;44(6):2051-6.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**. Apr 21;244(4902):359-62.
- Cochrane A, Searle B, Hardie A, Robertson R, Delahooke T, Cameron S, Tedder RS, Dusheiko GM, De Lamballerie X, Simmonds P. (2002) A genetic analysis of hepatitis C virus transmission between injection drug users. **J Infect Dis**. Nov 1;186(9):1212-21.
- Colina R, Azambuja C, Uriarte R, Mogdasy C, Cristina J. (1999) Evidence of increasing diversification of hepatitis C viruses. **J Gen Virol**. Jun;80 (Pt 6):1377-82.
- Colina R, Casane D, Vasquez S, García-Aguirre L, Chunga A, Romero H, Khan B, Cristina J. (2004) Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. **J Gen Virol**. Jan;85(Pt 1):31-7.
- Cook GA, Opella SJ. (2011) Secondary structure, dynamics, and architecture of the p7 membrane protein from hepatitis C virus by NMR spectroscopy. **Biochim Biophys Acta**. Jun;1808(6):1448-53.
- Cristina J, Colina R. (2006) Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. **Virol J**. Jun 30;3:53.
- Cristina J, Lopez F, Moratorio G, López L, Vasquez S, García-Aguirre L, Chunga A. (2005) Hepatitis C virus F protein sequence reveals a lack of functional constraints and a variable pattern of amino acid substitution. **J Gen Virol**. Jan;86(Pt 1):115-20.
- Culasso AC, Elizalde M, Campos RH, Barbini L. (2012) Molecular survey of hepatitis C virus in the touristic city of Mar del Plata, Argentina. **PLoS One**. 7(9):e44757.
- Cuthbert JA. (1994) Hepatitis C: progress and problems. **Clin Microbiol Rev**. Oct;7(4):505-32.
- Cutter AD. (2013) Integrating phylogenetics, phylogeography and population genetics through genomes and evolutionary theory. **Mol Phylogenet Evol**. Dec;69(3):1172-85.
- da Silva NM, Germano FN, Mendoza-Sassi RA, Seuánez HN, Soares MA, de Martinez AM. (2013) Evidence of association between hepatitis C virus genotype 2b and nosocomial transmissions in hemodialysis centers from southern Brazil. **Virol J**. May 29;10:167.

- Davies JL, Simancík F, Lyngsø R, Mailund T, Hein J. (2007) On recombination-induced multiple and simultaneous coalescent events. **Genetics**. Dec;177(4):2151-60.
- de Jesus Rodrigues de Freitas M, Fecury AA, de Almeida MK, Freitas AS, de Souza Guimarães V, da Silva AM, da Costa YF, da Costa RA, Ferreira P, Martins LC. (2013) Prevalence of hepatitis C virus infection and genotypes in patient with chronic kidney disease undergoing hemodialysis. **J Med Virol**. Oct;85(10):1741-5.
- del Pino N, Oubiña JR, Rodríguez-Frías F, Esteban JI, Buti M, Otero T, Gregori J, García-Cehic D, Camos S, Cubero M, Casillas R, Guàrdia J, Esteban R, Quer J. (2013) Molecular epidemiology and putative origin of hepatitis C virus in random volunteers from Argentina. **World J Gastroenterol**. Sep 21;19(35):5813-27.
- Departamento de laboratorio de salud pública (DLSP) (2002). Boletín epidemiológico. Uruguay. Ministerio de Salud Pública.
- Degasperi E, Aghemo A. (2014) Sofosbuvir for the treatment of chronic hepatitis C: between current evidence and future perspectives. **Hepat Med**. Apr 29;6:25-33.
- di Filippo D, Cortes-Mancera F, Beltran M, Arbelaez MP, Jaramillo S, Restrepo JC, Correa G, Navas MC. (2012) Molecular characterization of hepatitis c virus in multi-transfused Colombian patients. **Virol J**. Oct 23;9:242.
- Di Lello FA, Piñeiro Y Leone FG, Muñoz G, Campos RH. (2009) Diversity of hepatitis B and C viruses in Chile. **J Med Virol**. Nov;81(11):1887-94.
- Drummond AJ1, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Mol Biol Evol**. May;22(5):1185-92.
- El-Shabrawi MH, Kamal NM. (2013) Burden of pediatric hepatitis C. **World J Gastroenterol**. Nov 28;19(44):7880-8.
- European Association for Study of Liver. (2014) EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. **J Hepatol**. Feb;60(2):392-420.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. (1975) Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **N Engl J Med**. Apr 10;292(15):767-70.
- Fondo Nacional de Recursos: “Tratamiento de la hepatitis C con interferón pegylado más ribavirina”. Montevideo, Uruguay – Fondo Nacional de Recursos, Montevideo. Año 2005. Revisión 2012.
- Fu YX, Li WH. (1999) Coalescing into the 21st century: An overview and prospects of coalescent theory. **Theor Popul Biol**. Aug;56(1):1-10.
- Gouklani H, Bull RA, Beyer C, Coulibaly F, Gowans EJ, Drummer HE, Netter HJ, White PA, Haqshenas G. (2012) Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. **J Virol**. May;86(9):5080-8.
- Gouttenoire J, Penin F, Moradpour D. (2010) Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. **Rev Med Virol**. Mar;20(2):117-29.
- Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, Holmes EC. (2004) Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. **Science**. Jan 16;303(5656):327-32.

- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. (1999) The Molecular Basis of Mutation. En: **Modern Genetic Analysis**. New York: W. H. Freeman.
- Griffiths RC, Tavaré S. (1994) Sampling theory for neutral alleles in a varying environment. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. Jun 29;344(1310):403-10.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol**. May;59(3):307-21.
- Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. (2013) Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. Sep;10(9):553-62.
- Holmes EC. (2013) Virus Evolution. Knipe DM, Howley PM (eds). **Fields Virology, 6th ed.** (1) 286-310.
- Holmes EC. (2011) What does virus evolution tell us about virus origins? **J Virol**. Jun;85(11):5247-51.
- Hraber PT, Fischer W, Bruno WJ, Leitner T, Kuiken C. (2006) Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. **Virol J**. Dec 14;3:103.
- Jaspe RC, Sulbarán YF, Sulbarán MZ, Loureiro CL, Rangel HR, Pujol FH. (2012) Prevalence of amino acid mutations in hepatitis C virus core and NS5B regions among Venezuelan viral isolates and comparison with worldwide isolates. **Virol J**. Sep 21;9:214.
- Junta Nacional de Drogas. (1996) Registro de Casos: Resultado de la vigilancia epidemiológica, en puntos claves del país, sobre uso de drogas ilícitas. 29 y 30 de octubre 1996. **Reunión Nacional de Fortalecimiento de la Prevención del Uso de Drogas**. Montevideo, Uruguay.
- Kageyama S, Agdamag DM, Alesna ET, Leaño PS, Heredia AM, Abellanosa-Tac-An IP, Jereza LD, Tanimoto T, Yamamura J, Ichimura H. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. **J Med Virol**. 2006 Nov;78(11):1423-8.
- Kaito M, Ishida S, Tanaka H, Horiike S, Fujita N, Adachi Y, Kohara M, Konishi M, Watanabe S. (2006) Morphology of hepatitis C and hepatitis B virus particles as detected by immunogold electron microscopy. **Med Mol Morphol**. Jun;39(2):63-71.
- Kaito M, Watanabe S, Tanaka H, Fujita N, Konishi M, Iwasa M, Kobayashi Y, Gabazza EC, Adachi Y, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. (2006) Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. **Int J Mol Med**. Oct;18(4):673-8.
- Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. (1994) Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. **J Gen Virol**. Jul;75 (Pt 7):1755-60.
- Kalinina O, Norder H, Magnius LO. (2004) Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation. **J Gen Virol**. Jul;85(Pt 7):1853-7.
- Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnius LO. (2002) A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. **J Virol**. Apr;76(8):4034-43.

- Kamal SM. (2011) Hepatitis C virus genotype 4 therapy: progress and challenges. **Liver Int.** Jan;31 Suppl 1:45-52.
- Kim AY, Lauer GM. (2007) Pathogenesis of HIV-HCV Coinfection. **Curr Infect Dis Rep.** Jul;9(4):331-7.
- Krekulová L, Reháč V, Riley LW. (2006) Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. **Folia Microbiol (Praha).** 51(6):665-80.
- Kuiken C, Hraber P, Thurmond J, Yusim K. (2008) The hepatitis C sequence database in Los Alamos. **Nucleic Acids Res.** Jan;36(Database issue):D512-6.
- Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R. (2005) The Los Alamos hepatitis C sequence database. **Bioinformatics.** Feb 1;21(3):379-84.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science.** Apr 21;244(4902):362-4.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Avazova D, Khan A, Sugauchi F, Kan N, Kurbanova-Khudayberganova D, Khikmatullaeva A, Musabaev E, Mizokami M. (2008) Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1\_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. **Hepatol Res.** Apr 22;38(5):457-464.
- Lampe E, Espirito-Santo MP, Martins RM, Bello G. (2010) Epidemic history of Hepatitis C virus in Brazil. **Infect Genet Evol.** Oct;10(7):886-95.
- Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, Martins RM, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, de Martinez AM, Basso R, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini DA, Fujishima MA, Bello G. (2013) Genetic diversity of HCV in Brazil. **Antivir Ther.** 18(3 Pt B):435-44.
- Lavanchy D. (2011) Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clin Microbiol Infect.** Feb;17(2):107-15.
- Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, Pasquier C, Izopet J. (2007) New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. **J Virol.** Apr;81(8):4357-62.
- Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. (2013) Flaviviridae. Knipe DM, Howley PM (eds). **Fields Virology, 6th ed.** (1) 712-42.
- Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, Rice CM. (2007) The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. **J Virol.** Sep;81(17):8905-18.
- Lindenbach BD. (2013) Virion assembly and release. **Curr Top Microbiol Immunol.** 369:199-218.
- Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, Ou JH. (1995) Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. **Virology.** Nov 10;213(2):455-61.
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. (1999) Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. **J Virol.** Jan;73(1):152-60.

- Lopes CL, Teles SA, Espírito-Santo MP, Lampe E, Rodrigues FP, Motta-Castro AR, Marinho TA, Reis NR, Silva AM, Martins RM. (2009) Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. **Rev Saude Publica**. Aug;43 Suppl 1:43-50.
- López-Jiménez AJ, Clemente-Casares P, Sabariego R, Llanos-Valero M, Bellón-Echeverría I, Encinar JA, Kaushik-Basu N, Froeyen M, Mas A. (2014) Hepatitis C virus polymerase-polymerase contact interface: Significance for virus replication and antiviral design. **Antiviral Res**. May 6. pii: S0166-3542(14)00115-6.
- McVean G, Awadalla P, Fearnhead P. (2002) A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. **Genetics**. Mar;160(3):1231-41.
- Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, Allain JP, Hatzakis A, McCaffrey K, Gouklani H, Boo I, Pournourios P, Drummer HE. (2011) The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. **J Gen Virol**. Jan;92(Pt 1):112-21.
- Markov PV, Pepin J, Frost E, Deslandes S, Labbé AC, Pybus OG. (2009) Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa. **J Gen Virol**. Sep;90(Pt 9):2086-96. doi: 10.1099/vir.0.011569-0.
- Méndez-Sánchez N, Gutiérrez-Grobe Y, Kobashi-Margáin RA. (2010) Epidemiology of HCV infection in Latin America. **Ann Hepatol**. 9 Suppl:27-9.
- Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. (2006) Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. **J Viral Hepat**. 13:34-41
- Mindikoglu AL, Miller RR. (2009) Hepatitis C in the elderly: epidemiology, natural history, and treatment. **Clin Gastroenterol Hepatol**. Feb;7(2):128-34; quiz 124.
- Miyamura T, Matsuura Y. (1993) Structural proteins of hepatitis C virus. **Trends Microbiol**. Sep;1(6):229-31.
- Möhle M. (2000) Ancestral processes in population genetics-the coalescent. **J Theor Biol**. Jun 21;204(4):629-38.
- Mohsen AH, Easterbrook P, Taylor CB, Norris S. (2002) Hepatitis C and HIV-1 coinfection. **Gut**. Oct;51(4):601-8.
- Moratorio G, Martínez M, Gutiérrez MF, González K, Colina R, López-Tort F, López L, Recarey R, Schijman AG, Moreno MP, García-Aguirre L, Manascero AR, Cristina J. (2007) Evolution of naturally occurring 5'non-coding region variants of Hepatitis C virus in human populations of the South American region. **Virol J**. Aug 2;4:79.
- Moreau I, Hegarty S, Levis J, Sheehy P, Crosbie O, Kenny-Walsh E, Fanning LJ. (2006) Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland. **Virol J**. Nov 15;3:95.
- Moreno P, Alvarez M, López L, Moratorio G, Casane D, Castells M, Castro S, Cristina J, Colina R. (2009) Evidence of recombination in Hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. **Virol J**. Nov 18;6:203.
- Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F, Moradpour D. (2011) Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. **J Viral Hepat**. May;18(5):305-15.

- Murphy DG, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. (2007) Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. **J Clin Microbiol.** Apr;45(4):1102-12.
- Nakatani SM, Santos CA, Riediger IN, Krieger MA, Duarte CA, do Carmo Debur M, Carrilho FJ, Ono SK. (2011) Comparative performance evaluation of hepatitis C virus genotyping based on the 5' untranslated region versus partial sequencing of the NS5B region of brazilian patients with chronic hepatitis C. **Viol J.** Oct 3;8:459.
- Nelson DR. (2011) The role of triple therapy with protease inhibitors in hepatitis C virus genotype 1 naïve patients. **Liver Int.** Jan;31 Suppl 1:53-7.
- Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL. (2006) Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. **J Virol.** Aug;80(15):7569-77.
- Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR, Paetzold U, Schreier E, Pauli G, Yoshida CF. (1999) Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** Mar;32(3):279-82.
- Operskalski EA, Kovacs A. (2011) HIV/HCV co-infection: pathogenesis, clinical complications, treatment, and new therapeutic technologies. **Curr HIV/AIDS Rep.** Mar;8(1):12-22.
- Orland JR, Wright TL, Cooper S. (2001) Acute hepatitis C. **Hepatology.** Feb;33(2):321-7.
- Orlent H, Desombere I, Hansen B, Van Vlierberghe H, Haagmans B, De Knecht RJ, Schalm SW, Leroux-Roels G, Janssen HL; DITTO-HCV Study Group. (2010) Baseline anti-NS4a antibodies in combination with on-treatment quantitative HCV-RNA reliably identifies nonresponders to pegylated interferon-ribavirin combination therapy after 4 weeks of treatment. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** Dec;22(12):1443-8.
- Ortega-Prieto AM, Sheldon J, Grande-Pérez A, Tejero H, Gregori J, Quer J, Esteban JI, Domingo E, Perales C. (2013) Extinction of hepatitis C virus by ribavirin in hepatoma cells involves lethal mutagenesis. **PLoS One.** Aug 16;8(8):e71039.
- Osimani ML, Latorre L, Garibotto G, Scarlatta L, Chiparelli H, Vidal J. (2005) VIH, Hepatitis B, Hepatitis C y VDRL en usuarios de cocaína no inyectable en Uruguay. **Adicciones.** 17(2);157-62.
- Paintsil E, Binka M, Patel A, Lindenbach BD, Heimer R. (2014) Hepatitis C virus maintains infectivity for weeks after drying on inanimate surfaces at room temperature: implications for risks of transmission. **J Infect Dis.** Apr 15;209(8):1205-11.
- Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D. (1995) Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. **J Infect Dis.** Jun;171(6):1607-10.
- Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, Figueiredo GM, Montarroyos UR, Braga C, Turchi MD, Coral G, Crespo D, Lima ML, Alencar LC, Costa M, dos Santos AA, Ximenes RA. (2013) Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. **BMC Infect Dis.** Feb 1;13:60.
- Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. (2006) The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **J Hepatol.** Oct;45(4):529-38.

- Petta S, Craxì A. (2011) Optimal therapy in hepatitis C virus genotypes 2 and 3 patients. **Liver Int.** Jan;31 Suppl 1:36-44.
- Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ. (2011) Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. **J Viral Hepat.** Sep;18(9):608-18.
- Posada D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. **Mol Biol Evol.** Jul;25(7):1253-6.
- Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. (2001) The epidemic behavior of the hepatitis C virus. **Science.** Jun 22;292(5525):2323-5.
- Pybus OG, Rambaut A, Harvey PH. (2000) An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. **Genetics.** Jul;155(3):1429-37.
- Pybus OG, Rambaut A. (2002) GENIE: estimating demographic history from molecular phylogenies. **Bioinformatics.** Oct;18(10):1404-5.
- Ré VE, Culasso AC, Mengarelli S, Farías AA, Fay F, Pisano MB, Elbarcha O, Contigiani MS, Campos RH. (2011) Phylodynamics of hepatitis C virus subtype 2c in the province of Córdoba, Argentina. **PLoS One.** 6(5):e19471.
- Rosen HR, Gretch DR. (1999) Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Mol Med Today.** Sep;5(9):393-9.
- Rotman Y, Liang TJ. (2009) Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. **J Virol.** Aug;83(15):7366-74.
- Sagnelli E, Santantonio T, Coppola N, Fasano M, Pisaturo M, Sagnelli C. (2014) Acute hepatitis C: clinical and laboratory diagnosis, course of the disease, treatment. **Infection.** Mar 12.
- Salehi Moghadam F, Mohebbi SR, Hosseini SM, Romani S, Mirtalebi H, Azimzadeh P, Damavand B, Naghoosi H, Khanyaghma M, Sanati A, Zali MR. (2014) Phylogenetic analysis of hepatitis C virus strains and risk factors associated with infection and viral subtypes among Iranian patients. **J Med Virol.** Aug;86(8):1342-9.
- Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. (2010) Viral mutation rates. **J Virol.** Oct;84(19):9733-48.
- Sanyal AJ. (2010) The Institute of Medicine report on viral hepatitis: a call to action. **Hepatology.** 51:727-8.
- Sharma SA, Feld JJ. (2014) Acute hepatitis C: management in the rapidly evolving world of HCV. **Curr Gastroenterol Rep.** Feb;16(2):371.
- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis.** Sep;5(9):558-67.
- Simmonds P. (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. **J Gen Virol.** Nov;85(Pt 11):3173-88.
- Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. (2014) Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. **Hepatology.** Jan;59(1):318-27.

- Strimmer K, Pybus OG. (2001) Exploring the demographic history of DNA sequences using the generalized skyline plot. **Mol Biol Evol.** Dec;18(12):2298-305.
- Stuyver L, van Arnhem W, Wyseur A, Hernandez F, Delaporte E, Maertens G. (1994) Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Oct 11;91(21):10134-8.
- Sulbarán MZ, Di Lello FA, Sulbarán Y, Cosson C, Loureiro CL, Rangel HR, Cantaloube JF, Campos RH, Moratorio G, Cristina J, Pujol FH. (2010) Genetic history of hepatitis C virus in Venezuela: high diversity and long time of evolution of HCV genotype 2. **PLoS One.** Dec 13;5(12):e14315.
- Swindell SR, Plasterer TN. (1997) SEQMAN. Contig assembly. **Methods Mol Biol.** 70:75-89.
- Sy T, Jamal MM. (2006) Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci.** 3(2):41-6.
- Szabo SM, Bibby M, Yuan Y, Donato BM, Jiménez-Mendez R, Castañeda-Hernández G, Rodríguez-Torres M, Levy AR. (2012) The epidemiologic burden of hepatitis C virus infection in Latin America. **Ann Hepatol.** Sep-Oct;11(5):623-35.
- Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H. (1991) Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **J Virol.** Mar;65(3):1105-13.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol.** Oct;28(10):2731-9.
- Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. (2008) Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. **PLoS Pathog.** Mar 21;4(3):e1000032.
- Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway JC, Rice CM. (2008) Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. **J Virol.** Feb;82(3):1073-83.
- Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, Allain JP, Hatzakis A. (2009) The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. **PLoS Med.** Dec;6(12):e1000198.
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. (2009) Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature.** 461:798-801.
- Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, Wiese M, Tenckhoff H, Nischalke HD, Lokhnygina Y, Kullig U, Göbel U, Capka E, Wiegand J, Schiefke I, Güthoff W, Grüngreiff K, König I, Spengler U, McCarthy J, Shianna KV, Goldstein DB, McHutchison JG, Timm J, Nattermann J; German Anti-D Study Group. (2010) A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. **Gastroenterology.** 139:1586-92.
- Torriani FJ, Ribeiro RM, Gilbert TL, Schrenk UM, Clauson M, Pacheco DM, Perelson AS. (2003) Hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) dynamics during HCV treatment in HCV/HIV coinfection. **J Infect Dis.** Nov 15;188(10):1498-507.

- Vezi E, Aghemo A, Colombo M. (2010) A review of the treatment of chronic hepatitis C virus infection in cirrhosis. **Clin Ther.** Dec;32(13):2117-38.
- Vignuzzi M, Stone JK, Andino R. (2005) Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. **Virus Res.** Feb;107(2):173-81.
- Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. **RNA.** May;7(5):710-21.
- WHO. (2003) Hepatitis C.
- Young KC, Lindsay KL, Lee KJ, Liu WC, He JW, Milstein SL, Lai MM. (2003) Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. **Hepatology.** Oct;38(4):869-78.
- Zaltron S, Spinetti A, Biasi L, Baiguera C, Castelli F. (2012) Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. **BMC Infect Dis.** 12 Suppl 2:S2.
- Zeng QL, Zhang JY, Zhang Z, Wang LF, Wang FS. (2013) Sofosbuvir and ABT-450: terminator of hepatitis C virus? **World J Gastroenterol.** Jun 7;19(21):3199-206.
- Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Mauss S, Wedemeyer H, Sarrazin C, Hueppe D, Zehnter E, Manns MP. (2009) Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. **J Viral Hepat.** Feb;16(2):75-90.