



Sustituciones Asociadas a Resistencia a Drogas Antivirales Directas en las Regiones NS5A y NS5B del genoma del Virus de la Hepatitis C en pacientes uruguayos

Lic. Fabián Aldunate Caramori

Maestría en Ciencias Biológicas

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Facultad de Ciencias

Universidad de la Republica

Montevideo, Uruguay

2019

Sustituciones Asociadas a Resistencia a Drogas Antivirales Directas en las Regiones NS5A y NS5B del genoma del Virus de la Hepatitis C en pacientes uruguayos

Autor: Fabián Aldunate Caramori (faldunate@fcien.edu.uy)

Orientador: Dr. Juan Cristina (juan.cristinag@gmail.com)

Co-orientador: Dra. Pilar Moreno (pmoreno@fcien.edu.uy)

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Presidente: Dr. Santiago Mirazo

Vocales: Dra. Jimena Hochmann & Dr. Andrés Iriarte

“It's the questions we can't answer that teach us the most. They teach us how to think. If you give a man an answer, all he gains is a little fact. But give him a question and he'll look for his own answers”

Patrick Rothfuss, The Wise Man's Fear

Resumen

Actualmente cerca de 71 millones de personas se encuentran infectadas con el virus de la hepatitis C (VHC), los cuales están en riesgo de desarrollar fibrosis hepática, cirrosis y hepatocarcinoma. Si bien al momento no existe una vacuna profiláctica efectiva contra VHC, el desarrollo de nuevas drogas Antivirales de Acción Directa (DAA), que tienen como blanco proteínas para la replicación viral (NS3, NS5A, NS5B) ha revolucionado el tratamiento de esta infección. Sin embargo, concomitantemente con el desarrollo de estos fármacos, y teniendo en cuenta la elevada tasa de mutación de este virus, han emergido variantes virales resistentes las cuales se definen por la presencia de una o más Sustituciones Asociadas a Resistencia denominadas RASs.

La detección de RAS en pacientes aun no tratados (*naïve*) con DAAs es de importancia clínica a la hora de predecir la respuesta al tratamiento. La frecuencia de RAS en NS5A y NS5B del VHC en este tipo de pacientes ha sido reportada en muchos países, aunque existen pocos reportes en Sudamérica. El objetivo de este trabajo es estudiar las relaciones filogenéticas de las cepas del VHC provenientes de pacientes uruguayos crónicamente infectados, *naïve* a DAAs y estudiar diferentes factores virales que influyen en la respuesta a la terapia centrándose en la presencia de RASs en las regiones que codifican para NS5A y NS5B. Para ello, se amplificaron y analizaron las secuencias consenso de dichas regiones del genoma de VHC provenientes de 31 muestras de pacientes uruguayos crónicamente infectados. Los resultados revelaron la existencia de RASs a inhibidores de NS5A y NS5B en 6 y 19% del total de los pacientes analizados, respectivamente.

También se estudió la presencia de RASs como variantes minoritarias de la población viral. Con este fin se realizó la secuenciación profunda de 11 muestras provenientes de pacientes, determinándose la presencia de RASs en variantes minoritarias en todos los pacientes independientemente de si el paciente había sido tratado o no

Por último, en el marco de esta tesis se inició el desarrollo de una estrategia experimental que nos permitirá caracterizar aquellas sustituciones a nivel de NS5A no asociadas, *a priori*, con un fenotipo resistente, pero que podrían interferir en acción de los DAAs. Para esto se realizó la implementación del estudio de VHC (utilizando vectores subgenómicos y clones infecciosos) en un modelo de cultivo celular de células de hepatocarcinoma, abriendo un nuevo abanico para futuros estudios en el campo de la virología experimental en nuestro país.

Abstract

Currently about 71 million people are infected with hepatitis C virus (HCV), which might lead to liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Nowadays there is not an effective prophylactic vaccine against HCV, however, the development of new Direct Action Antiviral agents (DAA), which target viral replication proteins (NS3, NS5A, NS5B), has revolutionized the treatment of this infection. Concomitantly with the development of these drugs, and taking into account the evolutionary rates of this virus, resistant viral variants have emerged and are defined by the presence of one or more specific resistance-associated substitutions (RASs).

The detection of RAS in *naïve* patients with DAAs seems to be of great importance in predicting the response to treatment in DAA-failure patients. The frequency of RAS in NS5A and NS5B regions of HCV in these patients has been reported in many countries but there are only a few reports in South America. The main objective of this study was to study different viral factors that influence the response of patients to therapy focusing in the presence of RASs within NS5A and NS5B regions in chronically infected Uruguayan patients, naïve to DAAs treatment. To this end, 31 serum samples were amplified and analyzed. The results showed the existence of RASs within NS5A and NS5B inhibitors in 6 and 19% of the patients studied, respectively.

Additionally, the presence of minority variants of RASs in the viral population was studied by deep sequencing serum samples of 11 patients. We determined the presence of RASs in minor frequencies regardless of the treatment received and also provide the evidence that these substitutions could influence the final prognosis of the patient.

Finally, we began of the development of new strategies to characterize substitutions at the NS5A not associated *a priori* with a resistant phenotype, but could lead to resistance to DAAs. To do so, we performed *ex vivo* assays to implement the HCV study in a cellular model for the first time in Uruguay, opening a new spectrum for future studies in experimental virology.

Agradecimientos

Gracias...

A Juan Cristina por brindarme la oportunidad de formar parte de la familia que es el Laboratorio de Virología Molecular. *El ARN viral.*

A Pili, por su orientación constante tanto en lo laboral como personal, fomentando e impulsando mi vocación académico-científicas que roza el capricho científico. *Una polimerasa pero de alta fidelidad.*

A Nati, mi orientadora postiza que es capaz desde su genialidad, bondad y humildad poder guiarme, aconsejarme e incluso ser capaz de desarrollar y bajar a tierra ideas que no han salido ordenadas de mi mente. *La región conservada del IRES, no se puede sin ella.*

A Gonza por abrirme las puertas del Institut Pasteur de Paris, por su impronta intrínseca capaz de fomentar la ciencia e impulsor de nuevas ideas. *La ribavirina hacia un buen caos.*

A todos los integrantes, viejos y nuevos del laboratorio, por su ayuda constante con la mejor predisposición, sin ellos no hay familia del LVM. *Las proteínas de la célula huésped.*

A mi familia y amigos, que a pesar de no entender esta carrera, sin su apoyo no sería posible que yo me dedicara a esto. *Un buen organismo huésped.*

A Sil, por su eterno e incondicional apoyo a lo largo de los años impulsado por el amor mutuo. *La mejor cronicidad y hasta la muerte.*

Lista de abreviaturas

μl	microlitro
μM	micromolar
°C	Grados Celsius
3' UTR	Region 3' no traducida
5' NCR	Region 5' no codificante
AA	aminoacido
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMP	ampicilina
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CV	carga viral
CO ₂	Dióxido de carbono
DAAs	Antivirales de Accion Directa (del ingles: Direct-Acting Antiviral Agents)
DCV	Daclatasvir
BOC	Boceprevir
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP(s)	desoxinucleótido(s) trifosfato
DSV	Dasabuvir
DTT	ditiotreitól
EBR	Elbasvir
EC ₅₀	Concentración efectiva 50%
FLuc	luciferasa de Firefly
FNR	Fondo Nacional de Recursos
Gb	Gigabytes
GTR+γ+I	General Time Reversible + distribución gamma + sitios invariables
HCC	carcinoma hepatocelular (del inglés: Hepatocellular carcinoma)
IFN-α-peg	Interferón alfa pegilado
IRES	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (del inglés: Internal Ribosome Entry Site)
IVT	Transcripción in vitro (del inglés: In Vitro Transcription)
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LDV	Ledipasvir
M	Molar
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar

MSP	Ministerio de Salud Pública
NEAA	aminoácidos no esenciales (del inglés: Non-essential amino acids)
NGS	Secuenciación masiva (del inglés: Next Generation Sequencing)
nt	nucleótidos
OBV	Ombitasvir
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés: Open Reading Frame)
pb	pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino (del inglés: Phosphate-buffered Saline)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: Polymerase Chain
PM	Peso Molecular
RAPs	Polimorfismos asociados a Resistencia (del inglés: Resistance-associated Polymorphisms)
RASs	Sustituciones asociadas a Resistencia (del inglés: Resistance-associated Substitutions)
RAVs	Variantes asociadas a Resistencia (del inglés: Resistance-associated Variants)
RBV	ribavirina
RPs	random primers
RT	Retrotranscripción
RVS	respuesta virológica sostenida
seg	segundos
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés: Single-nucleotide Polymorphism)
SOF	Sofosbuvir
TVR	Telaprevir
UI	Unidades Internacionales
VEL	Velpatasvir
VHC	Virus de la Hepatitis
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

Tabla de contenido

1. Introducción	1
1.1. Epidemiología	1
1.2. Transmisión.....	1
1.3. Patogénesis	2
1.4. Clasificación taxonómica	4
1.5. Composición estructural y genómica del VHC.....	4
1.5.1. Estructura viral	4
1.5.2. Genoma viral y sus proteínas	5
1.6. Ciclo viral.....	7
1.7. Variabilidad genética.....	9
1.7.1. Mutación y Recombinación.....	9
1.7.2. Cuasiespecies.....	9
1.7.3. Genotipos y su distribución.....	10
1.8. Prevención.....	11
1.9. Tratamiento	12
1.9.1. Terapia clásica basada en interferón.....	13
1.9.2. Antivirales de acción directa (DAAs)	14
1.10. Factores que afectan la respuesta al tratamiento antiviral	16
1.10.1. Accesibilidad al tratamiento con DAAs	17
1.10.2. Factores genéticos virales.....	17
1.10.2.a Genotipos.....	17
1.10.2.b Variabilidad de la Región ISDR de NS5A	18
1.10.2.c Sustituciones Asociadas a Resistencia a DAAs.....	19
1.11. Estado actual en Uruguay.....	20
2. Relevancia del proyecto	21
3. Hipótesis.....	22
4. Objetivo general	22
4.1. Objetivos específicos.....	22
5. Materiales y métodos.....	23
5.1. Muestras	23
5.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	23

5.3. Amplificación de las regiones genómicas NS5A y NS5B del genoma de VHC.....	24
5.3.1 Nested PCR para amplificación de NS5A y NS5B	24
5.3.2 One-Step PCR para amplificación de NS5A y NS5B	25
5.4. Electroforesis en gel de agarosa	26
5.5. Purificación y Secuenciación de los productos de PCR.....	26
5.6. Verificación del genotipo de las muestras.....	26
5.6.1. Secuencias y alineamientos	26
5.6.2. <i>Likelihood mapping</i>	27
5.6.3. Análisis de saturación de sustituciones	28
5.6.4. Árboles filogenéticos.....	28
5.8. Análisis de sustituciones en la secuencia consenso y búsqueda de RASs a inhibidores de NS5A y de NS5B	29
5.9. Mapeo de sustituciones encontradas en NS5B.....	29
5.10. Secuenciación masiva.....	30
5.10.1. Preparación de librerías	30
5.10.1. Análisis de datos derivados de la Secuenciación Masiva.....	32
5.10.2 Pre-procesamiento de los datos	32
5.10.3. Alineamiento y ensamblado	33
5.10.4. Determinación de variantes (SNP calling)	33
5.11. Visualización de datos.....	34
5.12. Análisis de la sustitución K24Q, como posible RAS ledipasvir, en un vector subgenómico de VHC.	34
5.12.1. Vector subgenómico.....	35
5.12.2. Mutagénesis por Overlap-extension PCR.....	35
5.13. Puesta a punto de la producción de VHC en cultivo celular	41
5.13.1. Cultivo celular y transfección del ARN viral	42
5.13.2. Cuantificación viral	43
5.13.3. Verificación de la presencia de viriones de VHC en los sobrenadantes.....	44
6. Resultados	45
Sección 1	45
6.1. Relaciones filogenéticas de las cepas del VHC provenientes de pacientes uruguayos crónicamente infectados <i>naïve</i> a DAAs.....	45
6.1.1 Características de la población de estudio.....	45

6.1.2. Confirmación de genotipos y subtipos asignados	45
6.1.2.a <i>Likelihood mapping</i> de las regiones de NS5A y NS5B	46
6.1.2.b Análisis de Saturación de sustituciones en las secuencias analizadas	47
6.1.2.c Análisis filogenéticos de las regiones NS5A y NS5B del genoma de VHC	49
6.1.3. Estudios filogenéticos de la región NS5A de cepas subtipo	51
Sección 2	53
6.2. Análisis de sustituciones a nivel de las regiones NS5A y NS5B, que podrían influir en la respuesta al tratamiento (INF o DAAs).....	53
6.2.1. Estudio de Sustituciones en la región ISDR de la NS5A y su relación con la respuesta al tratamiento con IFN.....	53
6.2.2. Estudio del perfil de RAS a DAAs a nivel de la región NS5A	56
6.2.3. Estudio del perfil de RAS a DAAs a nivel de la región NS5B	57
6.2.3. Mapeo de sustituciones no asociadas a priori con resistencia a DAAs	58
Sección 3	60
6.3. Estudio de variantes minoritarias de la cuasiespecie viral por secuenciación profunda	60
6.3.1. Control de calidad de librerías y resultados de la secuenciación masiva	60
6.3.2. Alineamientos.....	62
6.3.3. Cobertura.....	63
6.3.4. Secuencias consenso generadas a partir de la secuenciación masiva	65
6.3.5. Identificación de cambios minoritarios y de baja frecuencia en NS5A y NS5B	66
6.3.6. Identificación de RASs como variantes minoritarias	67
6.3.7. Hacia una transferencia Básica-Asistencial: aporte de la secuenciación masiva al estudio de un caso clínico.....	71
Sección 4	76
6.4.1. Desarrollo de una estrategia experimental que nos permita caracterizar posibles sustituciones de resistencia a ledipasvir a nivel de NS5A.....	76
6.4.2 Puesta a punto de la producción de VHC en cultivo celular	79
6.4.2.a Cultivo celular y transfección del ARN viral	79
6.4.2.b Cuantificación viral	80
6.4.2.c Presencia de ARN de viriones de VHC en los sobrenadantes	81
7. Discusión.....	83
7.1. Relaciones filogenéticas de las cepas del VHC provenientes de pacientes uruguayos crónicamente infectados naïve a DAAs	83

7.2. Análisis de sustituciones a nivel de las regiones NS5A y NS5B, que podrían influir en la respuesta al tratamiento (INF o DAAs).....	84
7.3. Estudio de variantes minoritarias de la cuasiespecie viral por secuenciación profunda	88
7.4.1. Desarrollar una estrategia experimental que nos permita caracterizar posibles sustituciones de resistencia a ledipasvir a nivel de NS5A y producción de VHC en cultivo celular	92
8. Conclusiones	94
9. Perspectivas.....	96
10. Bibliografía.....	97
11. Material suplementario.....	107
11.1. Resultados suplementarios de sección 1.....	107
11.2. Resultados suplementarios de sección 2.....	111
11.3. Resultados suplementarios de sección 3.....	116
11.4. Resultados suplementarios de sección 4.....	118
12.1 Publicaciones derivadas de esta tesis	119
12.2. Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis.....	119

1. Introducción

1.1. Epidemiología

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa causada por el virus de la hepatitis C (VHC). Este virus fue caracterizado molecularmente en 1989, reconociéndose como la causa mayor de hepatitis no-A, no-B y una causa importante de las hepatitis crónicas a nivel mundial (Choo et al., 1989).

La prevalencia de individuos infectados con VHC a nivel global, basado en la positividad de anticuerpos anti-VHC, ha sido estimada en 115 millones de personas (Gower et al., 2014). Sin embargo, no todas estas personas están actualmente infectadas ya que algunas han resuelto la infección (*clearance* del virus) ya sea espontáneamente o como resultado de algún tratamiento. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que existen, al día de hoy, 71 millones de personas viviendo con el virus y anualmente cerca de 400 mil personas mueren por el VHC, principalmente por cirrosis o hepatocarcinoma (HCC) (World Health Organization, 2018). De todas formas estos análisis son extrapolaciones poco robustas basadas en la información obtenida a partir de 100 países con una representación desigual, ya que, no sólo se analizó un 29% de países de bajos ingresos, y además la calidad de los reportes varía considerablemente entre los países (Blach et al., 2016).

En cuanto a la situación nacional, se desconoce la prevalencia de infectados por el VHC. Sin embargo, se cuenta con datos recabados entre los años 2014 y 2015 por el Ministerio de Salud Pública (MSP), quien reportó 259 y 201 nuevos casos de Hepatitis C, respectivamente (División Epidemiológica, 2017), siendo el 42,4% de todos los casos de hepatitis virales considerando las hepatitis A, B y C. Por otro lado, también se dispone de datos aproximados provenientes del Banco de Sangre que muestran una seroprevalencia del 0.31% [OPS, 2017], sin embargo, este dato se encuentra sesgado a donantes de sangre promisorios a tales efectos (sin factores de riesgos).

1.2. Transmisión

El VHC es primariamente transmitido a través de la exposición directa o indirecta con sangre contaminada.

La transmisión puede ser debida a prácticas médicas poco seguras utilizando material mal esterilizado, así como al uso compartido de materiales para la inyección de drogas intravenosas. Antes de 1990, año en que comenzó el cribado obligatorio en muestras de sangre, las causas de la infección iatrogénica que es cuando la infección se desarrolla subsiguiente a un acto médico eran muy frecuentes, e incluían transfusión de sangre o derivados también debido a hemodiálisis, el uso compartido de jeringas y la reutilización de jeringas de vidrio. Un ejemplo de esto es la fuente de infección de VHC en Egipto que fue atribuida a la campaña de tratamiento contra la schistosomiasis durante la década de los 60 (1960-1970) (Arafa et al., 2005). Hoy en día a nivel mundial, el hábito de compartir jeringas de usuarios de drogas intravenosas es el responsable del 23% de las nuevas infecciones, siendo en algunas regiones, como Europa y Estados Unidos responsable de hasta el 60% (World Health Organization, 2018). de las infecciones agudas por VHC (Manns et al., 2017). El riesgo de transmisión de madre-hijo se eleva hasta un 11% en niños nacidos de madres portadoras del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), mientras que ese riesgo disminuye a 6% en aquellos casos donde no existe con infección con este virus (Benova et al., 2014). La transmisión sexual también puede ocurrir, pero es mucho menos frecuente (Alter et al., 2003).

La distribución etaria de la infección con VHC se correlaciona directamente con la fuente principal de infección. Por ejemplo, en países como Australia, Finlandia, Portugal y Reino Unido donde la principal vía de transmisión es la inyección de drogas el pico de infección ronda los 30 años. Esta diferencia viene acompañada al hecho de que el usuario de drogas inyectadas es típicamente joven. Por otro lado, tenemos el ejemplo de la infección por vía iatrogénica. Debido a que la mayoría de las infecciones de este tipo ocurrieron antes de la década de los 90s cuando no se realizaba el tamizaje para VHC, el pico de edad de los pacientes infectados por esta vía se encuentra entre los 50-60 años (Sibley et al., 2015).

1.3. Patogénesis

El VHC presenta hepatotropismo y en el comienzo, la infección es generalmente asintomática en el 90% de los casos. En caso de presentar síntomas, estos pueden ser ictericia, astenia, fiebre o artralgia. En una infección aguda, el primer marcador es la detección de ARN en las 2 primeras

semanas post-infección y posteriormente la detección de anticuerpos entre las 7-8 semanas. En el 20% de los casos, el VHC se resuelve espontáneamente en los primeros 6 meses de la infección gracias al sistema inmune. (Manns et al., 2017; Wang et al., 2016).

En el 75-85% de los casos, la infección aguda progresa a una infección crónica. Se considera una infección crónica cuando el virus persiste por más de 6 meses en el organismo. Como resultado de esta infección crónica, se puede desarrollar fibrosis hepática, cirrosis y otras consecuencias de la cirrosis, como descompensación hepática (ascitis, sangrado gastrointestinal, síndrome hepatorenal y encefalopatía hepática) y hepatocarcinoma (HCC). La progresión no es necesariamente un proceso lineal y puede ser acelerado por numerosos factores tales como la edad, sexo masculino, consumo de alcohol y co-infección con otros virus como el virus de la hepatitis B y el VIH (Hoofnagle et al., 2013).

El progreso a infección crónica por VHC está asociado en parte a una alteración en la respuesta inmune. Las células *Natural Killer* (NK) exhiben una alteración en su fenotipo y función durante la infección habiendo infiltración intrahepática de células T (Rehermann, 2013). A pesar de los intensos estudios de la respuesta inmune innata y adaptativa en infección aguda y crónica por VHC, todavía permanecen poco claros los mecanismos subyacentes a la resolución y persistencia del virus.

La fibrinogénesis, caracterizada por la activación de los miofibroblastos hepáticos es la complicación principal producto de la infección crónica por VHC (Yamane, McGivern, Masaki, & Lemon, 2013). La inflamación local parecería que juega un importante rol en este proceso. Esta inflamación ocurre como respuesta al estrés oxidativo y a la respuesta inmune mediada por los hepatocitos que expresan epítopes virales (Bowen et al., 2005). A estas características se suman la producción de numerosos factores de crecimiento, así como citoquinas que son producidas por estos hepatocitos, lo cual genera la perpetuación de la inflamación local crónica

De estos pacientes crónicos un 30% desarrollan cirrosis después de 10-30 años. Los pacientes cirróticos presentan un riesgo de muerte de un 4% por año y el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular es de un 5%. Un dato importante es que un tercio de los pacientes diagnosticados con HCC muere en el primer año de ser diagnosticado (Lingala et al., 2015). También la

infección por VHC ha sido asociada a otras complicaciones extra-hepáticas, como , por ejemplo, crioglobulinemia y linfoma no Hodgking (Negro et al., 2015).

1.4. Clasificación taxonómica

El VHC pertenece al género hepacivirus de la familia *Flaviviridae*. Esta familia comprende además los Pestivirus, Pegivirus, Flavivirus donde se agrupan virus de gran importancia tanto para la salud humana como animal (**Fig. 1**) (Adams et al., 2017). Además de infectar humanos, se han descrito hepacivirus capaces de infectar roedores, monos colobos, murciélagos, caballos y burros (Wang et al., 2017; Smith et al., 2016; Burbelo et al., 2012).

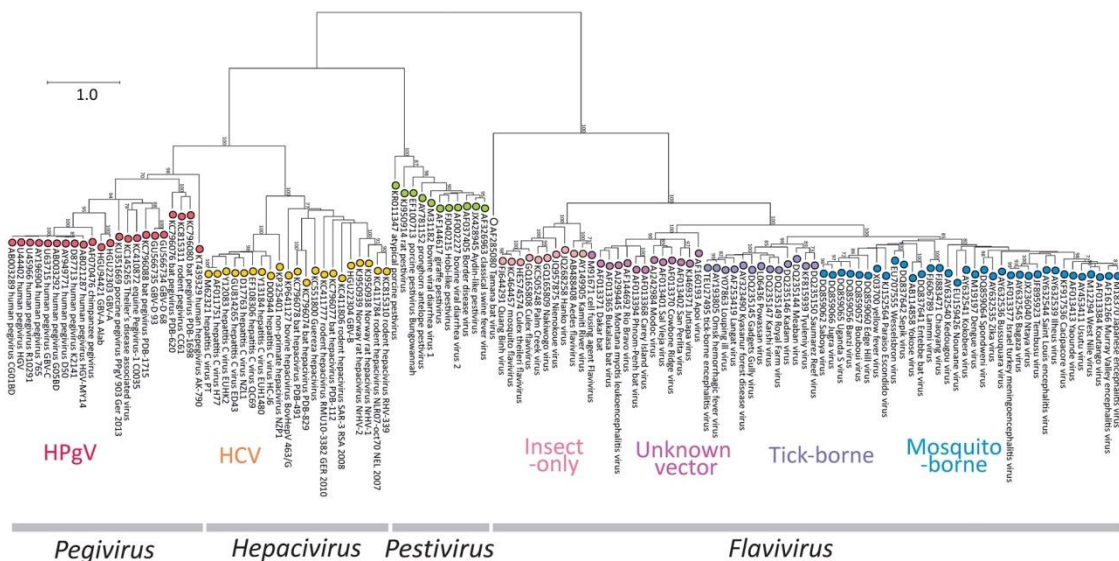


Figura 1. Árbol filogenético de la familia *Flaviviridae*. Árbol filogenético que incluye todos los miembros de la familia *Flaviviridae* obtenido a partir de secuencias de una región parcial de la NS5B. Modificado de (Adams et al., 2017).

1.5. Composición estructural y genómica del VHC

1.5.1. Estructura viral

Los viriones del VHC son pequeños de unos 45-65 nm de diámetro, y se encuentran envueltos en una bicapa lipídica donde se encuentran ancladas dos glicoproteínas, las proteínas E1 y E2. Una gran cantidad de las partículas virales circulan asociadas a lipoproteínas, siendo una marca distintiva del virus. Frecuentemente se encuentra en sangre asociadas a proteínas LDL, VLDL y a apolipoproteínas (Morozov et al., 2018).

1.5.2. Genoma viral y sus proteínas

El genoma del VHC es de ARN monohebra, de sentido positivo, de aproximadamente 9600 nucleótidos (nt) de longitud. El ARN viral posee un único marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés: *Open Reading Frame*). Como se puede observar en el esquema de la Figura 2, a ambos extremos del genoma existen 2 regiones altamente conservadas y estructuradas. Estas regiones tienen gran importancia en el ciclo replicativo del virus siendo responsables de la replicación y traducción del genoma viral. La traducción se inicia gracias al sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) ubicado en el extremo 5'UTR. A partir del ORF se obtiene una poliproteína que es procesada tanto por proteasas virales como del hospedero en 10 proteínas:

-3 proteínas estructurales (core, E1 y E2) ubicadas en la región amino-terminal de la poliproteína, proteínas esenciales para la generación del virión.

-7 proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) que cumplen rol fundamental en la morfogénesis, replicación del ARN y en la regulación de ciertas funciones celulares (Morozov et al., 2018).

La proteína estructural de core está compuesta de 191 aminoácidos (AA) y tiene un tamaño de 22 KDa. Forma parte de la nucleocápside y cumple diversos roles tales como unión al ARN viral, colaboración en la creación de la gotas lipídicas y funciones regulatorias que promueven la patogénesis viral como apoptosis y desarrollo de HCC (Dubuisson et al., 2014). Las proteínas E1 y E2 son las glicoproteínas de la envoltura y participan en el ensamblado, la entrada a la célula hospedera y en la fusión endosomal (Moradpour et al., 2013).

En relación a las proteínas no estructurales, la proteína p7 es esencial para el egreso y la infectividad al formar hexámeros con actividad de canal iónico (Bentham et al., 2013). La NS2 es una proteína transmembrana cuya función cisteín-proteasa es necesaria para la infectividad viral. En colaboración con la proteína NS3, estimula su capacidad proteasa. La proteína NS3 presenta una actividad helicasa ATP dependiente en la parte C-terminal cuya función es la relajación del ARN viral durante la replicación viral. En la parte N-terminal presenta actividad serín-proteasa y junto con la proteína NS4A (su co-factor) se encuentra involucrada en el clivaje del resto de las proteínas no estructurales. Incluso, se ha visto que la proteasa NS3/4A es capaz de clivar blancos celulares que participan en la respuesta inmune innata (Sun et al., 2005). NS4A, cofactor de la

proteasa NS3, también promueve la apoptosis celular y altera la distribución mitocondrial. La proteína no estructural NS4B es una proteína de membrana que altera las membranas intracelulares, siendo éste un proceso vital para la formación del complejo de replicación (Nomura-Takigawa et al., 2006).

La proteína NS5A es una fosfoproteína de 56 KDa y en las células infectadas con VHC presenta 2 isoformas. Esta es una proteína con múltiples funciones y que contribuye a la replicación, patogénesis, la modulación de señales intracelulares y la respuesta al interferón (Morozov et al., 2018). La hélice N-terminal de la proteína es necesaria para la localización en la membrana. Ha sido reportado que esta proteína tiene un rol en la respuesta al IFN, a través de una región denominada “región determinante de la sensibilidad al interferón” (ISDR: “*interferon- α sensitivity determining region*” por su sigla en inglés). Varios reportes han sugerido que el ISDR puede utilizarse para predecir la resistencia y sensibilidad al tratamiento con IFN. También la NS5A. También la NS5A modula vías implicadas en la apoptosis (Macdonald et al., 2004).

La proteína NS5B es la ARN polimerasa ARN dependiente. Consta de 591 AA y se localiza en el extremo C-terminal de la poliproteína. La estructura cristalizada de la polimerasa muestra la típica estructura de “mano derecha”. Esta enzima se caracteriza por carecer de la función correctora de errores, lo que le brinda a este virus la capacidad de generar una gran cantidad de mutaciones.

Tanto NS3 como NS5A y NS5B debido a sus características esenciales en el ciclo celular, son proteínas blanco de acción de las drogas antivirales directas (Gentles et al., 2011; De Francesco et al., 2005).

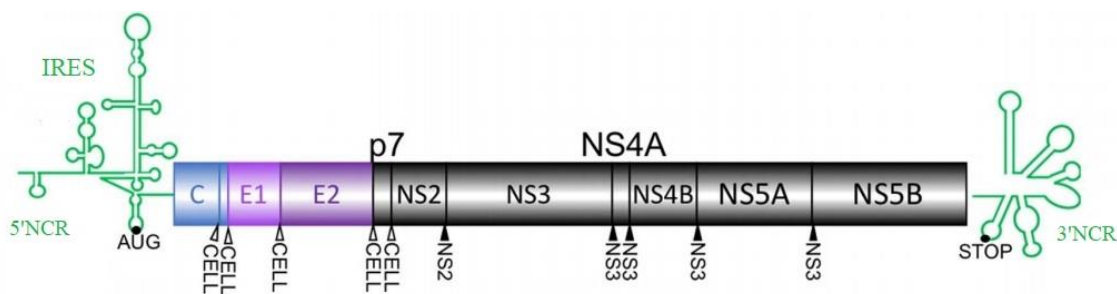


Figura 2. Organización genómica del VHC. Representación esquemática del genoma de VHC. En el extremo 5' no codificante (5'NCR) se representa la estructura secundaria del IRES, seguido de las proteínas estructurales (C, E1 y E2) y las proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). En la región 3' no codificante (3'NCR) se muestra también su estructura secundaria.

Adicionalmente se indican los sitios de clivaje de la poliproteína, así como si son reconocidos por proteasas celulares o virales. Imagen modificada de (Alazard-Dany et al., 2019).

1.6. Ciclo viral

La partícula viral circula libremente o en asociación a lipoproteínas (llamadas lipovirpartículas) a las que se unen gracias a las proteínas E1 y E2. Los receptores de LDL (LDLR) y los glicosaminoglicanos estarían involucrados en la primera unión con una baja afinidad. Posteriormente, E1-E2 interactúan de manera secuencial con diversos receptores como SRB1, CD81 y diversas proteínas de la familia de las claudinas, las cuales son requeridas para la entrada del virus a la célula (Zeisel et al., 2013).

Luego de la unión, el virus entra al hepatocito por endocitosis mediada por clatrina, seguida de la fusión entre las membranas virales y endosomales lo que lleva a la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. La proteína E1 actuaría como proteína de fusión. Posteriormente el ARN viral es liberado en el citosol, y debido a que es un ARN monhebra de sentido positivo sirve como un ARN mensajero (ARNm) para el comienzo de la traducción (síntesis de la poliproteína). La región 5' UTR contiene un sitio de entrada para el ribosoma (IRES) que controla la iniciación de la traducción (Honda, Beard, Ping, & Lemon, 1999). La poliproteína sintetizada es un precursor de aproximadamente 3000 AA y es generada en estrecha asociación con la membrana del Retículo Endoplasmático. El clivado de la poliproteína dará lugar a las 3 proteínas estructurales y las 7 proteínas no estructurales.

La proteína NS5A es una proteína integral de membrana con la funcionalidad de re-arreglar la membrana llevando a la formación de una “red membranosa” o complejo de replicación para compartimentalizar la replicación del VHC (Scheel et al., 2013). Para la replicación en estos complejos, se genera un intermediario de ARN de sentido negativo a partir del cual se generan hebras de sentido positivo de manera desproporcionada (relación 1:10). Este proceso es catalizado por la proteína NS5B (Murakami et al., 2006). La proteína NS3 con actividad helicasa actúa como separador del ARN naciente, desdoblado la estructura secundaria del genoma viral y desplazando las proteínas de unión a ARN.

Se han asociado varios factores del hospedero que intervendrían en el ciclo viral. Tal es el caso de la Ciclofilina A que se une tanto a NS5A como a NS5B para colaborar en la formación del complejo de replicación. El microARN 122 (miR-122), un microARN específico del hígado que es capaz de unirse a 2 sitios conservados en el extremo 5'NCR del genoma para aumentar la eficiencia de replicación y estabilidad del ARN viral (Manns et al., 2017).

El ensamblado del virión ocurre en el retículo endoplasmático. Finalmente, el VHC usa la ruta de producción de las lipoproteínas de VLDL y apolipoproteínas (apoB) para el ensamblaje y llega a la maduración en el aparato de Golgi. Sin embargo, la ruta precisa de liberación sigue siendo poco clara. De todos modos, cuando la maduración culmina, los viriones son transportados usando la ruta de la VLDL o por vesículas extracelulares (Zeisel et al., 2013). En la Figura 3 se puede apreciar a modo simplificado el ciclo viral del VHC.

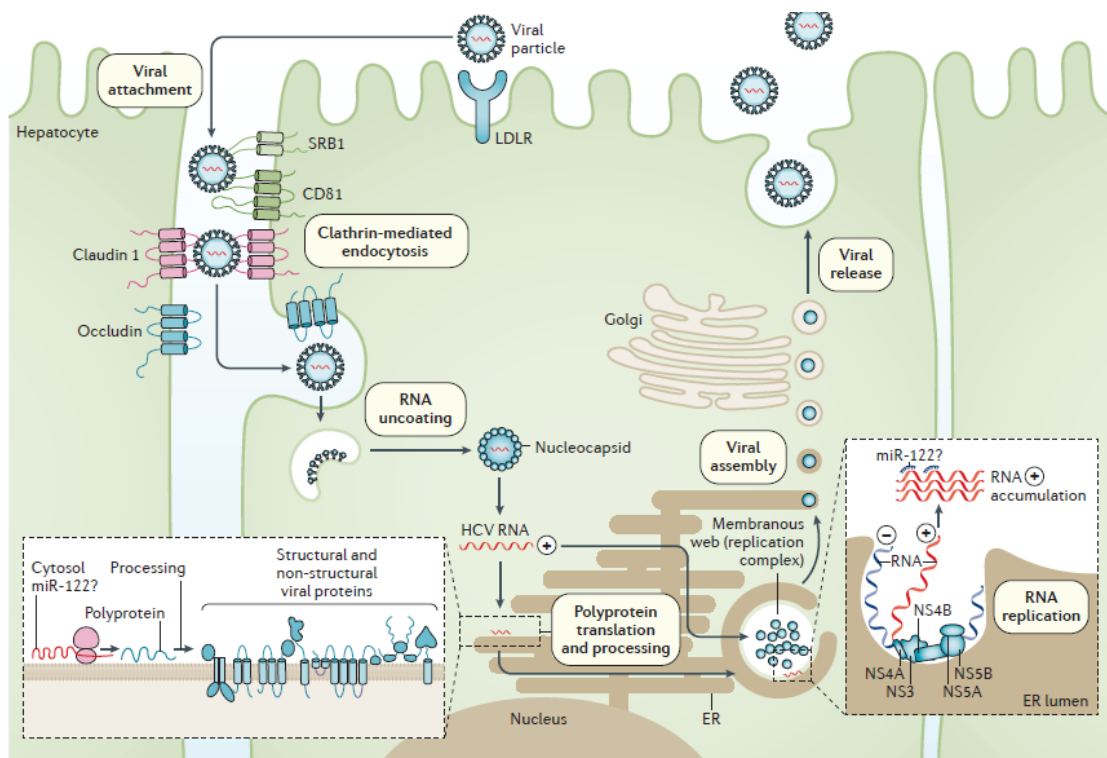


Figura 3. Ciclo viral del VHC. Representación esquemática del ciclo viral del VHC detallándose la entrada viral, la endocitosis mediada por clatrina, traducción de la poliproteína y procesamiento. Se ilustra la replicación de ARN, ensamblaje y liberación de la partícula viral. Imagen obtenida de (Manns et al., 2017).

1.7. Variabilidad genética

1.7.1. Mutación y Recombinación

Debido al hecho de que su genoma está compuesto por ARN, el VHC presenta una gran variabilidad genética otorgada por su elevada tasa de mutabilidad y por los eventos de recombinación. La carencia de actividad correctora de errores de la ARN polimerasa viral (NS5B) le otorga a este virus una tasa de mutaciones de 10^{-5} mutaciones por nucleótido por ciclo replicativo (Geller et al., 2016). Otro de los mecanismos que VHC utiliza para generar variabilidad es la recombinación. La recombinación es una característica de muchos virus ARN y es un importante mecanismo para la producción de nuevos genomas con ventajas de crecimiento selectivas (Worobey et al., 1999). Hasta la fecha se ha reportado recombinación tanto intra como inter genotipo en aislamientos de VHC provenientes de diferentes regiones geográficas (Galli et al., 2014), incluyendo un reporte en nuestro país de recombinación entre los subtipos 1a y 1b (Moreno et al., 2009). Asimismo se ha reportado recombinación intracuasiespecie.

1.7.2. Cuasiespecies

Debido a la elevada tasa de mutacional, los cortos tiempos de generación, los grandes números poblacionales y la alta tasa de replicación, el VHC circula como una cuasiespecie (Pawlotsky et al., 2006). Una cuasiespecie se define como una compleja población de variantes genéticamente relacionadas sujetas al continuo proceso de variación genética, competición entre variantes y selección en un ambiente determinado. Esta dinámica le aporta a VHC una gran adaptabilidad con una importante implicancia a nivel terapéutico, permitiendo que variantes con mejor capacidad replicativa y/o las que escapan la presión selectiva (por ejemplo una droga) emerjan en la población viral permitiendo al virus resistir a los tratamientos contra el VHC (Morozov et al., 2018).

Como podría esperarse, la variabilidad genética se encuentra distribuida heterogéneamente a lo largo del genoma viral. Regiones con funciones esenciales para el virus o con dominios estructurales importantes presentan menor tasa de variabilidad, como es el caso del IRES. Por el contrario, la región más variable del genoma se encuentra en la región que codifica para la glicoproteína de superficie E2 (Bukh, et al., 1992; Guillou-guillemette et al., 2007).

1.7.3. Genotipos y su distribución

La tasa de error de la ARN polimerasa ARN dependiente y la presión ejercida por el sistema inmune del hospedero, ha impulsado la evolución filogenética del VHC en 8 linajes genéticos. El último genotipo identificado fue en el año 2018 como el genotipo 8 en 4 pacientes de India residentes en Canadá (Fig 4) (Borgia et al., 2018). En mayo del año 2019 el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, del inglés: *International Committee on Taxonomy of Viruses*) lo ha reconocido como un nuevo genotipo (Lefkowitz et al., 2018) Por lo tanto, hasta la fecha se han descrito 8 genotipos y 87 subtipos. Los genotipos 1-4 y 7 contienen múltiples subtipos que difieren entre un 15-25% mientras para los genotipo 5 y 8 solo se ha identificado 1 subtipo hasta el momento (Simmonds et al., 2005).

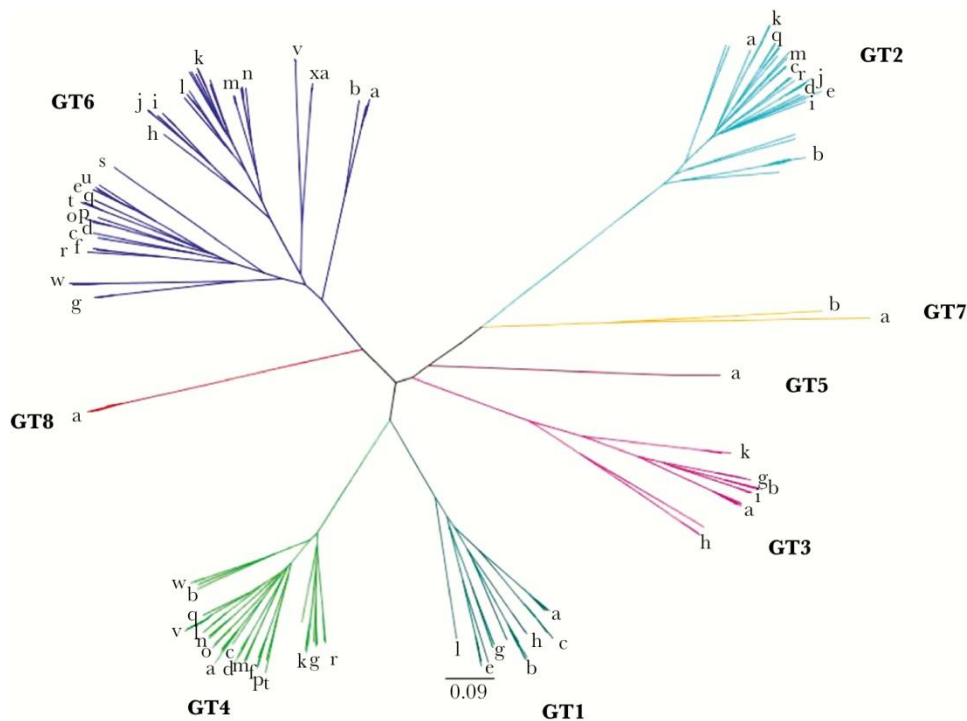


Figura 4. Árbol filogenético de los genotipos virales del VHC. El árbol de máxima verosimilitud incluye los genotipos del 1 al 8. El alineamiento incluye 170 secuencias representativas de las secuencias completas (Borgia et al., 2018).

Los genotipos están caracterizados por una distribución geográfica distintiva (**Figura 5**). Esta distribución tiene que tomarse en cuenta ya que tiene implicaciones clínicas. En el continente Americano, Japón y Europa existe una prevalencia del genotipo 1 (Pawlotsky et al., 2006). Los

genotipos con mayor distribución global y de mayor prevalencia en los países occidentales son el 1 y el 3. En Uruguay, el genotipo 1 es el más prevalente, presente en un 74% de las infecciones, seguidas por el genotipo 3a en un 26% (Castells et al., 2015).

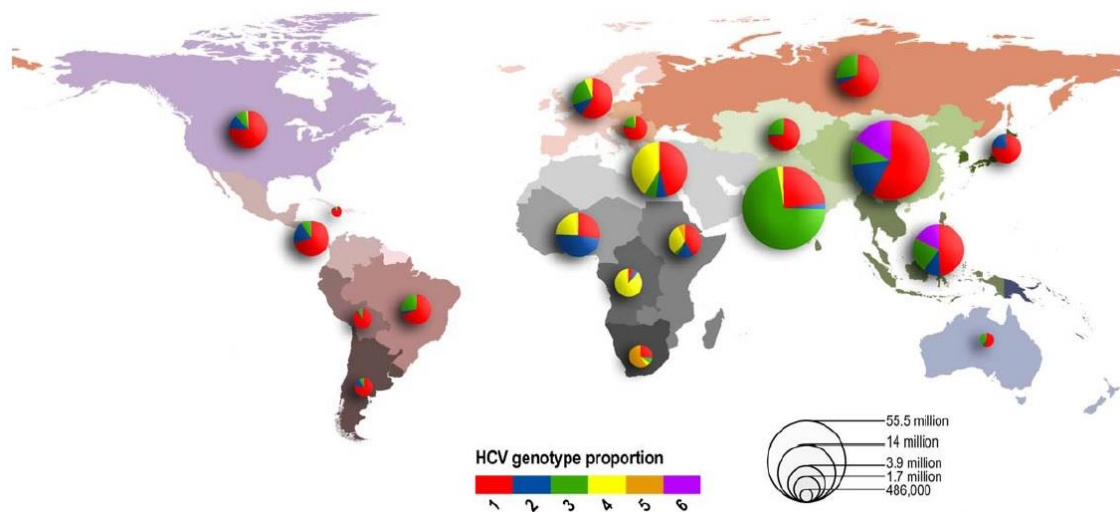


Figura 5. Distribución y prevalencia relativa de los genotipos de VHC. Representación geográfica de los genotipos 1-6 y su proporcionalidad en cantidad de casos. Imagen obtenida de (Messina et al., 2015).

1.8. Prevención

La prevención primaria está dirigida a reducir o eliminar la transmisión de VHC. Mientras que la prevención secundaria pretende reducir el riesgo de la enfermedad crónica al identificar personas ya infectadas y proporcionarle una terapia efectiva. Uno de los principales problemas en la prevención de la infección es la ausencia de síntomas. Por lo que la identificación de pacientes infectados tendría que ser un objetivo clínico a través de buenos programas de prevención.

A pesar del descubrimiento de VHC en 1989, no existe aún una vacuna efectiva para prevenir este virus. Este hecho nos impulsa a profundizar en los estudios para lograr una vacuna efectiva a fin de erradicar esta enfermedad a nivel mundial. El desarrollo de vacunas efectivas se ve obstaculizada por diferentes circunstancias como es la falta de un modelo animal adecuado, una ineficiente producción de títulos de anticuerpo contra el VHC, así como, su corta vida media de los anticuerpos y la inhabilidad de generar una gran producción de virus en cultivo celular (Ghasemi et al., 2018). Además existen otras barreras en el desarrollo de vacunas como la gran

variabilidad del virus y su divergencia entre los genotipos en ciertas regiones impide el desarrollo de vacunas pangenotípicas.

En cuanto a la prevención secundaria, el *screening* de la infección por VHC es crucial para el diagnóstico, ya que un tratamiento oportuno provocaría una mejoría en los pacientes y se evitaría la transmisión del virus. Se estima que entre el 45-85% de los infectados no están en conocimiento de su condición debido a la característica asintomática de la infección (World Health Organization, 2018). Un estudio en Alemania, cuyo objetivo fue tamizar más de 20 mil pacientes, reportó que el 65% de los individuos infectados no se encontraba al tanto de su infección por VHC (Wolffram et al., 2015).

1.9. Tratamiento

Toda persona con infección crónica con VHC debería ser tratada con el mejor tratamiento posible. Aunque no todo paciente con infección crónica con VHC desarrollará fibrosis (Chen et al., 2009), un tratamiento oportuno podría impedir la progresión de la enfermedad y disminuir la transmisión del virus (Shivkumar et al., 2012). El estado de la enfermedad por VHC puede ser estimado a través de la biopsia de hígado con el sistema METAVIR (Bedossa et al., 1994). Sin embargo, la biopsia es un método invasivo que pueden generar infección, sangrado, dolor, etc.

En el transcurso de los años, el tratamiento del VHC ha sufrido un cambio que ha mejorado sustancialmente gracias a los nuevos sistemas de cultivo celular. El tratamiento clásico consistía en una terapia basada en interferón-alfa (IFN α) y ribavirina (RBV), y fue un avance importante en el tratamiento de la infección crónica por VHC en la década de los 90' (McHutchison et al., 1998). Sin embargo, debido a la baja tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) obtenida particularmente para el genotipo 1, así como los grandes efectos secundarios causados mayormente por el IFN, está siendo paulatinamente remplazada por el uso de nuevas drogas antivirales (Lemon et al., 2010; Pawlotsky et al., 2003; Zeuzem et al., 2000) Estas nuevas drogas tienen como blanco de acción proteínas fundamentales para la replicación viral, por lo que son denominadas drogas antivirales directas (DAAs – *Direct Acting Agents* por su sigla en inglés). Además se han intentado desarrollar otro tipo de terapias como por ejemplo los análogos inmunosupresores de la Ciclosporina A y antagonistas de miR122 (Miravirsén). Este último, ya se encuentra en la fase de ensayos clínicos (Janssen et al., 2013).

1.9.1. Terapia clásica basada en interferón

Durante casi 20 años, la terapia estándar se basó en interferón-alfa (IFN α). Al inicio, el tratamiento consistía únicamente en interferón, posteriormente se implementó un régimen de IFN α con RBV y por último el interferón- α -pegilado (IFN α -peg) junto con RBV. El IFN pegilado se obtiene al unir cadenas ramificadas de polietilenglicol a la molécula de interferón, con lo que se disminuye el metabolismo del fármaco aumentando su biodisponibilidad y mejorando así su perfil farmacológico.

Los interferones, descritos por primera vez en 1957 (Isaacs et al., 1987), son una familia diversa de citoquinas con funciones antivirales y antiproliferativas. El IFN induce a las células infectadas a producir otras proteínas que inhiben la replicación viral induciendo una cascada de señales que terminan por activar la transcripción de genes de respuesta al IFN. Los IFN de tipo I se liberan en respuesta a algunas infecciones virales e induce la producción de citoquinas y potencia la respuesta inmune celular al activar las células “natural killers”, maduración de células dendríticas y proliferación de linfocitos T (Buti et al., 2008).

La RBV es un nucleósido sintético análogo de la guanosina que actúa sobre el VHC y también sobre distintos virus al estimular una mutagénesis letal. La RBV, a diferencia del INF, es bien tolerada, con cuadros esporádicos de anemia, pero generalmente. La RBV, en el tratamiento de VHC, siempre se administra en combinación con otras drogas (INF o DAAs), ya que no tendría por sí misma la capacidad para erradicar al virus (Bokharaei-Salim et al., 2014).

Si bien esta fue la terapia implementada por varios años, las respuestas virológicas sostenidas eran insatisfactorias sobre todo para el genotipo 1 (45%).(Pawlotsky et al., 2018). Una RVS se caracteriza por una negativización del ARN viral durante el tratamiento, permaneciendo indetectable 6 o 3 meses después del tratamiento con IFN/RBV o DAAs, respectivamente (WHO, 2018) Por el contrario, el tratamiento para la infección aguda con terapias basadas en IFN ha demostrado similares tasas de RVS que con los DAAs, incluso por períodos cortos (Jaeckel et al., 2001).

En suma, las terapias basadas en IFN α y RBV, no solo presentaban tasas de RVS insatisfactorias, sino que se asociaban a diversos efectos adversos que dificultaban la adhesión al tratamiento y ocasionaban una disminución en la calidad de vida del paciente.

1.9.2. Antivirales de acción directa (DAAs)

A partir del año 2011, el tratamiento de la hepatitis C crónica sufrió un cambio radical gracias a los avances en la investigación básica que permitieron conocer en mayor medida los procesos moleculares en referencia al ciclo celular del VHC, desarrollando fármacos que actúan directamente sobre la replicación del virus, por eso el nombre de Antivirales de Acción Directa (DAAs).

Existen diversos fármacos comercializados para los distintos blancos del VHC, que están destinados contra 3 de las proteínas no estructurales del virus: la proteasa NS3/4A, la fosfoproteína NS5A y la polimerasa viral NS5B. Cada grupo de antivirales dirigido para los respectivos blancos comparten la terminación de su denominación: los ‘-previr’, ‘-asvir’ y ‘-buvir’ para los inhibidores de la proteasa NS3/4A, inhibidores del complejo NS5A e inhibidores de la polimerasa NS5B, respectivamente.

1.9.2.a Inhibidores de NS3/4A

En el año 2011 se introducen por primera vez los primeros inhibidores de proteasas de primera generación únicamente contra el genotipo 1 del VHC: boceprevir y telaprevir. La proteasa NS3 fue identificada como un gran blanco antiviral ya que bloquearía el ciclo celular al inhibir la maduración de la poliproteína viral. Estos antivirales consisten en compuestos peptido-miméticos que interaccionan con el sitio catalítico de la proteasa viral.

A lo largo de los años se desarrollaron nuevos antivirales dirigidos a inhibir la proteasa viral, ampliando el espectro de acción contra más genotipos virales como el simeprevir, paritaprevir y grazoprevir que inhiben los genotipos 1-4. Posteriormente se desarrollaron el glecaprevir y el voxilaprevir que abarcan el mayor espectro, e inhiben todos los genotipos virales (pangenotípicos) (World Health Organization, 2018). Actualmente, y luego de varios años de pruebas los inhibidores de proteasas no se consideran una buena opción terapéutica, como terapia única, al no tener buenas tasas de respuesta en comparación a otros DAAs desarrollados posteriormente (Pawlotsky et al., 2018).

1.9.2.b Inhibidores de la NS5A

A diferencia de la proteasa NS3, la fosfoproteína NS5A es una proteína multifuncional que no posee actividad enzimática. NS5A es una proteína de unión al ARN con varios sitios de fosforilación que dificultan estudios de relación estructura/función. Los inhibidores de la fosfoproteína viral NS5A alteran el rol regulatorio de esta proteína y parecen provocar la desorganización del complejo replicativo, inhibiendo así la replicación del VHC, pero también bloquearían el ensamblaje y la liberación del virus. El primer inhibidor de la NS5A comercializado fue el daclatasvir (DCV) y se administraba junto con un inhibidor de la NS5B con o sin RBV (Sulkowski et al., 2014).

También se han desarrollado una gran variedad de otros antivirales dirigidos a esta fosfoproteína tales como el ledipasvir (LDV), ombitasvir (OMB), elbasvir (EBV), velpatasvir (VEL) y pibrentasvir (PBV). Los DAAs como el LDV, VEL y PBV presentan actividad pangénotípica (contra todos los genotipos) mientras que los otros se encuentran restringidos a ciertos genotipos virales (World Health Organization, 2018)

1.9.2.c Inhibidores de NS5B

La replicación puede ser bloqueada al usar inhibidores de NS5B. Para tal fin pueden utilizarse 2 tipos de inhibidores:

- 1) Inhibidores nucleostídicos: Incluyen a los análogos de nucleótidos, que funcionan como un terminador de la cadena de ARN. Estos análogos precisan antes ser activados intracelularmente por fosforilación. El sofosbuvir (SOF) es un análogo de la uridina que presenta actividad pangénotípica y es el único aprobado para su utilización (Götte et al., 2016).
- 2) Inhibidores no-nucleosídicos de NS5B: Actúan en sitios alostéricos en la enzima dejándola sin funcionamiento. El Dasabuvir (DSV) es el único inhibidor de esta característica aprobado hasta el momento (Asselah et al., 2014) y está dirigido únicamente contra el genotipo 1.

Estas nuevas terapéuticas han permitido nuevos regímenes libres de interferón, han mejorado la cobertura en cuanto a genotipos y han logrado mejorar de forma significativa las altas tasas de RVS.

Se ha demostrado que el tratamiento con antivirales de acción directa es sumamente eficaz y es por esto que la combinación de DAAs es considerado el tratamiento de primera línea para pacientes infectados crónicamente según el AASLD (“AASLD/IDSA HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C,” 2018) y la Asociación Europea del estudio del Hígado (EASL) (Pawlotsky et al., 2018). Estos tratamientos permiten alcanzar tasas de RVS superiores al 90% para todos los genotipos de VHC.

En el 2014 la combinación de sofosbuvir con ledipasvir (Harvoni) fue aprobada para el tratamiento de VHC genotipo 1 con una RVS de más del 95% (Charlton et al., 2015). En el mismo año, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó la combinación de 3 DAAs, el ombitasvir, paritaprevir y dasabuvir (Viekira Pak) para el tratamiento crónico de VHC. Posteriormente en el 2016 el régimen de tratamiento abarcó también sofosbuvir/velpatasvir (Epclusa) para un tratamiento pangenotípico con tasas de RVS de más 95% (Bourlière et al., 2017).

Si bien los tratamientos están destinados fundamentalmente para pacientes infectados crónicamente, existen recomendaciones a seguir para tratar la hepatitis C aguda con DAAs, aunque aún sigue bajo debate (Pawlotsky et al., 2018).

1.10. Factores que afectan la respuesta al tratamiento antiviral

A pesar de que a primera vista parecería que este tipo de terapias resuelve el problema de las infecciones con VHC, algunos pacientes no logran una RVS, estos presentan fallas terapéuticas que se pueden clasificar como recaídas o como no-respuestas. Una recaída ocurre cuando el paciente exhibe valores indetectables de ARN de VHC durante y al finalizar la terapia, pero éste reaparece dentro de las 12 o 24 semanas posteriores a finalizar el tratamiento (si es tratado con IFN α o DAAs, respectivamente). Cuando el paciente muestra niveles de ARN viral detectable a lo largo de todo el tratamiento se le denomina “no respondedor” (WHO, 2018).

Existen factores que afectan la tasa de respuesta virológica dependiendo del tipo de tratamiento empleado (terapias basadas en IFN o DAAs), características modificables (peso corporal,

consumo de alcohol, etc.), no modificables (edad, sexo, factores genético) del hospedero y características propias del virus (genotipo, mutaciones puntuales, etc.).

1.10.1. Accesibilidad al tratamiento con DAAs

Al día de hoy, está estimado que el 90% de los pacientes infectados crónicamente con el VHC pueden ser curados con tratamientos basados en DAAs. Existe un gran número de reportes que confirma la gran eficacia y tolerabilidad de estos tratamientos. Sin embargo, quedan ciertos problemas que aún no se han resuelto. El más importante es probablemente la baja accesibilidad para conseguir los fármacos con DAAs. De hecho, menos del 10% de los pacientes con infección crónica pueden acceder a ellos, en países de bajos recursos (Edlin et al., 2016). Asimismo todavía se requiere especial atención a personas de difícil tratamiento, como pacientes con cirrosis avanzada y descompensación hepática (Pawlotsky et al., 2016). De hecho, es importante destacar que muchos pacientes con cirrosis avanzada son excluidos de los ensayos clínicos fase II y III debido a su condición (Kowdley et al., 2014). Esto dificulta la dosificación y el tiempo del tratamiento ya que muchos de estos pacientes presentan la metabolización del hígado disminuida (Ferenci et al., 2015).

1.10.2. Factores genéticos virales

1.10.2.a Genotipos

Como ya se ha mencionado, el genoma del VHC presenta una gran diversidad. Se han identificado varios genotipos y numerosos subtipos (Smith et al., 2014). A su vez, cada genotipo y subtipo y difieren en el desarrollo de la enfermedad, el genotipo 3 parece ser el más agresivo con mayor riesgo de desarrollo de HCC. Por otro lado, los pacientes infectados con el genotipo 1 resultaron lo más difícil para el tratamiento con IFN α -peg más RBV, La combinación de IFN α -peg y RBV llegaba a lograr una tasa de RVS de un 50% en pacientes infectados con genotipo 1 en Japón (Yamada et al., 2008), Europa y EEUU (Manns et al., 2017; Poynard et al., 2009; Fried et al., 2002).

Por otro lado el genotipo 3 es el más difícil para el tratamiento con los antivirales de acción directos (DAAs). El subtipo de VHC también importa, los genotipos 1a son los que responden más lento a tratamientos con DAAs (Morozov et al., 2018).

1.10.2.b Variabilidad de la Región ISDR de NS5A

El IFN α -peg se utilizó en el tratamiento de la hepatitis por más de 20 años. Sin embargo, como ya se mencionó, un porcentaje elevado de pacientes (sobre todo del genotipo 1) no respondían favorablemente. Esto indicaba claramente que existían diferentes factores que afectaban la respuesta, entre ellos uno de los más estudiados en su momento fue la variabilidad genética dentro de la región que codifica para NS5A.

En relación con la resistencia al IFN, se ha reportado que NS5A se une e inhibe a una proteína inducida por el IFN denominada PKR (Gale et al., 1998). En condiciones normales PKR es activada por el IFN generando una inhibición no específica general de la traducción celular lo que resulta en una disminución de la replicación viral. La interacción de la NS5A con la PKR resulta en la inhibición de la autofosforilación de PKR contrarrestando de esta forma la actividad antiviral del IFN y manteniendo así la expresión de proteínas virales (Gale et al., 1997).

Se han reportado numerosos estudios que sugieren que hay una vinculación entre el número de sustituciones aminoacídicas en una región del gen de NS5A (llamada ISDR) y la respuesta al tratamiento a IFN, aunque también se han reportado resultados controversiales (Pascu et al., 2004; Enomoto et al., 1996). La ISDR (región determinante de la sensibilidad al IFN) está localizada en la región 5' del dominio de unión a PKR de la fosfoproteína NS5A, más específicamente entre los aminoácidos 2209 y 2248 de la poliproteína.

Los primeros estudios fueron realizados en pacientes infectados con el genotipo 1b (Enomoto et al., 1996), donde se mostraba una diferencia significativa en el número de sustituciones en esta región entre los pacientes que lograban una RVS y aquellos que no respondían. Para el caso del subtipo 1a si bien ciertos resultados indican que las sustituciones a nivel de la región de ISDR puede predecir la respuesta al IFN, estos resultados han sido controversiales, ya que ciertos reportes en Europa no reportan una asociación entre los mismos (Kumthip et al., 2016; Yahoo et al., 2011; Fried et al., 2002; Polyak et al., 1998; Hofgärtner et al., 1997).

En suma, estos estudios muestran que existe un número de sustituciones en ISDR significativamente mayor en pacientes con RVS que en pacientes sin RVS (Kazuhiko et al., 2009; Nakamoto et al., 2015) y que la variabilidad del dominio ISDR de la región de NS5A podría predecir la respuesta al tratamiento con IFN α -peg.

1.10.2.c Sustituciones Asociadas a Resistencia a DAAs

Debido al comportamiento del virus como cuasiespecie, la población viral presenta numerosos polimorfismos muchos de los cuales se presentan en las regiones que codifican para proteínas blanco de los DAAs, y que en algunos casos podrían conferirle una menor susceptibilidad a estos antivirales.

A medida que se somete al VHC a la presión con determinados DAAs, se seleccionan variantes con una reducida susceptibilidad para las mismas. El término Sustituciones Asociadas a Resistencia (RAS) se ha utilizado para identificar sustituciones que confieran una menor susceptibilidad a cierta droga o tipo de droga.

Se ha reportado la existencia de sustituciones de resistencia en poblaciones virales mayoritarias, encontradas en la secuencia consenso (aquella que se obtiene por Secuenciación Sanger), aún en pacientes nunca antes tratados con DAAs, simplemente por la capacidad intrínseca de este tipo de virus de mutar constantemente. Sin embargo muchas veces se encuentran en poblaciones virales minoritarias (en porcentajes menores al 1%) debido que muchas de estas sustituciones pueden producir una reducción del *fitness* (capacidad replicativa) viral. En la población viral, las variantes minoritarias con un menor *fitness*, pueden emerger como poblaciones mayoritarias cuando son seleccionadas positivamente por un determinado antiviral. Estas variantes de susceptibilidad disminuida pero de bajo *fitness* pueden, por los procesos de mutación, adquirir mutaciones que compensen esa debilidad y revertir paulativamente al fenotipo *wildtype* una vez finalizado el tratamiento (Pawlotsky et al., 2006).

Asimismo se denomina Polimorfismo Asociado a Resistencia (RAP) a cualquier otro cambio aminoacídico con respecto a la secuencia de referencia, para un determinado genotipo, en sitios donde ya antes se han reportado sustituciones asociadas a resistencia (Zeuzem et al., 2017).

Es importante destacar que después de una falla en el tratamiento, las variantes que son resistentes a inhibidores de NS3 desaparecen en pocas semanas, mientras que variantes resistentes en NS5A persisten por hasta un año (Pawlotsky et al., 2006). De todas formas, el uso combinado de DAAs para distintas proteínas blanco puede mitigar el impacto que tienen las RASs; además es posible añadir al régimen RBV o incluso extender por más tiempo el tratamiento para obtener resultados satisfactorios de respuesta virológica (Sorbo et al., 2018).

1.11. Estado actual en Uruguay

La mayoría de las personas en el mundo que viven con VHC no están diagnosticadas y por lo tanto permanecen sin tratamiento. Globalmente, únicamente 1 de cada 5 personas viviendo con el VHC ha sido diagnosticada (World Health Organization, 2018). En países de bajos ingresos, un 8% de los infectados ha sido diagnosticado en comparación al 40% en los países desarrollados (World Health Organization, 2018).

En Uruguay en el año 2015 el Fondo Nacional de Recursos (FNR) financiaba únicamente la terapia de IFN α -peg y RBV. A principios del año 2017 se implementó la posibilidad de incorporar los DAAs en pacientes únicamente con enfermedad hepática grave y para aquellos que estaban en lista de trasplante hepático, mientras que el resto de los pacientes con infección crónica con VHC seguía con el régimen clásico basado en IFN α -peg y RBV. Así es que, en el año 2018, el FNR financiaba la terapia de SOF/VEL únicamente a pacientes en lista de trasplante, pacientes ya trasplantados o aquellos con fibrosis estadio F3 o F4 (cirrosis). A partir de agosto de 2019, se amplió la cobertura con de los DAAs a todos los pacientes con ese tipo de virus, sustituyéndose el tratamiento de SOF/VEL a SOF/DCV (Fondo Nacional de Recursos, 2019).

2. Relevancia del proyecto

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el marco de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible propuso como objetivo final la eliminación de las hepatitis víricas promoviendo la prevención de la transmisión, ampliación de los servicios de detección, tratamiento entre otras.

Asimismo en el año 2019 la OMS fomento a “invertir en la eliminación de las hepatitis” motivando a aumentar las inversiones nacionales e internacionales con el fin de alcanzar las metas de eliminación para el 2030.

Hoy en día el VHC infecta cónicamente a más de 71 millones de personas, ocasionando 400 mil muertes anuales (World Health Organization, 2018). Este virus como la mayoría de virus cuyos genomas están compuestos por ARN, replica a una tasa de mutación muy alta (Geller et al., 2016) y por lo tanto exhibe una significativa variabilidad genética. Esto permite a la población viral emerger y adaptarse rápidamente a diferentes presiones selectivas impuestas tanto por el sistema inmune de los hospederos como por los tratamientos farmacológicos antivirales. La rápida evolución de este virus representa, además, una enorme dificultad para el desarrollo de tratamientos profilácticos efectivos, como son las vacunas.

El desarrollo de las nuevas Drogas Antivirales Directas (DAAs) ha generado una revolución a la hora del tratamiento para personas infectadas con este virus, sin embargo estos continúan siendo extremadamente costoso, sobre todo para países en vías de desarrollo (Edlin et al., 2016). Además, la pre-existencia o el surgimiento de cepas con sustituciones de resistencia para estos DAAs no garantizan una respuesta virológica sostenida.

Por consiguiente, conocer el patrón de sustituciones de resistencia (RAS) a DAAs circulantes a nivel Nacional y poder caracterizar nuevas sustituciones es de fundamental importancia para la elección de regímenes terapéuticos adecuados para cada uno de los pacientes.

3. Hipótesis

Varios reportes indican en circulación de cepas virales que presentan RASs a nivel de NS5A y NS5B en su secuencia basal, en pacientes que nunca han recibido tratamiento con DAAs. Por este motivo es que en este trabajo esperamos encontrar, en pacientes *naïve* al tratamiento, cepas con sustituciones de resistencia a nivel de la secuencia consenso de NS5A y NS5B. Asimismo, analizando más en profundidad las poblaciones virales se espera que, a nivel de las variantes minoritarias dentro de las cuasiespecies, hallar un mayor cantidad de cambios de resistencia, tanto en pacientes *naïve* al tratamiento como en pacientes recaedores a este tipo de terapias.

4. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es estudiar la variabilidad genética de las regiones NS5A y NS5B del genoma de VHC en pacientes infectados crónicamente y analizar sustituciones presentes en dichas regiones que influyen la respuesta a la terapia anti-hepatitis C, a modo de brindar información relevante a la hora de seleccionar tratamientos más personalizados que ayuden a un manejo integral de los pacientes infectados.

4.1. Objetivos específicos

- Estudiar las relaciones filogenéticas de las cepas del VHC provenientes de pacientes uruguayos crónicamente infectados *naïve* al tratamiento con DAAs.
- Analizar diferentes factores virales que pueden influir en la respuesta al tratamiento basado en interferón o a DAAs en las regiones de NS5A y NS5B del genoma del VHC.
- Estudiar por secuenciación profunda las variantes minoritarias presentes en las cuasiespecies virales de pacientes pre y post tratamiento con DAAs.
- Desarrollar una estrategia experimental que nos permita caracterizar posibles sustituciones de resistencia a ledipasvir a nivel de NS5A mediante abordajes de cultivo celular.

5. Materiales y métodos

5.1. Muestras

En el marco de este proyecto de tesis se recolectaron 31 muestras de suero provenientes de pacientes uruguayos infectados crónicamente con VHC, reclutadas entre 2015 al 2018 que nunca habían sido tratados con Antivirales de Acción Directa (DAAs) (*naïve* al tratamiento). Posteriormente y en el marco de los estudios de secuenciación masiva se adicionaron 3 muestras provenientes de pacientes crónicamente infectados con VHC que sí habían sido tratados con DAAs.

Las muestras utilizadas en este proyecto fueron recolectadas, bajo consentimiento informado, por la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas, en el marco del proyecto FMV_1_2014_1_104171 (ANII).

Los estudios fueron realizados de acuerdo con la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki y aprobados por los paneles institucionales correspondientes. La información personal es confidencial y su acceso fue restringido a los médicos.

En todos los casos la infección por el VHC fue confirmada por la Real Time PCR Abbot (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, USA), en la clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas. Todas las muestras analizadas correspondían a cepas de VHC de genotipo 1. La genotipificación fue realizada por servicios tercerizados a la Clínica.

5.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ARN total fue realizada a partir de 140 µl de suero utilizando el kit QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), según instrucciones suministradas por el fabricante. El material así obtenido se almacenó a -80°C.

La síntesis de ADNc se realizó siguiendo el protocolo descrito en Aldunate et al. 2018. El ADNc así obtenido fue almacenado a -20°C hasta su posterior utilización en la reacción de PCR.

5.3. Amplificación de las regiones genómicas NS5A y NS5B del genoma de VHC

5.3.1 Nested PCR para amplificación de NS5A y NS5B

Utilizando como molde el ADNc obtenido mediante RT, se realizó la amplificación de las regiones de interés mediante *Nested-PCRs*.

Los *primers* utilizados, tanto para la amplificación de NS5A como para la de NS5B, fueron modificados de los previamente descritos por Paolucci y colaboradores (Paolucci et al., 2013) a fin de adaptarlos a las secuencias de las cepas circulantes en América Latina.

Para cada reacción de amplificación se usó como control positivo el ADNc proveniente de un ARN de VHC ya evaluado como positivo y se utilizó en cada experimento como mínimo un control negativo de amplificación (H₂O DEPC). También se trabajó en un laboratorio con dos áreas independientes: una de pre amplificación (procesamiento de ARN y síntesis de ADNc) y la otra de post-amplificación (PCR, electroforesis en geles de agarosa y visualización de los productos de PCR). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un Applied Biosystems ABI 2720.

La mezcla de PCR para el primer *round* (tanto de NS5A como de NS5B) se realizó en un volumen final de 25 μ l que contenía 5 μ l de buffer (5X, MgCl₂ 1.5 mM), 0,5 μ l de dNTPs (10 μ M), 1 μ l de cada *primer* (10 μ M), 0,5 μ l de enzima Phusion High Fidelity (2U/ μ l, Thermo Scientific, USA), y 2,5 μ l de ADNc. Las condiciones de ciclado fueron: 98°C por 5 minutos (min); 35 ciclos de 98°C por 1 min, Temperatura de Annealing (TA) °C por 1 min y 72°C por 3 min, y 5 min finales a 72°C.

Posteriormente, utilizando 5 μ l de primer round, se realizó una reamplificación (2do *round*), en un volumen final de 50 μ l que consistió de 10 μ l de buffer (5X MgCl₂ 1.5 mM) 1 μ l de dNTPs (10 μ M), 2 μ l de cada *primer* (10 μ M) y 1 μ l de enzima Phusion High Fidelity (2U/ μ l, Thermo Scientific, USA). Las condiciones de ciclado del segundo round fueron las siguientes: 98°C por 5 min; 35 ciclos de 98°C por 1 min, TA°C por 1 min y 72°C por 2 min; y 5 min finales a 72°C. Tanto los *primers* utilizados para cada una de las PCRs, como las TA correspondientes se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. *Primers* utilizados para la amplificación y la secuenciación de la región que codifica para NS5A y NS5B

Región	Gen	Nombre	Sentido	Round	TA °C	Secuencia 5' - 3'	Posición en el genoma
NS5A	1a	Fwd_Ext	fw	1°	58	GACRTYTGGGACTGGATATGCG	6276 - 6297
		Rev_Ext	rv	1°		GCTCRATGTCYTAYWCCTGGAC	7600 - 7621
		fwd_int	fw	2°	60	GATATGCGAGGTGYTGAGCG	6290 - 6310
		rev_int	rv	2°		GAGCARCACACGACRTCCTC	7584 - 7603
		rev_seq	rv	Sec		AARGAGTCCARRAYCACCAC	7089 - 7108
	1b	EXT-F	fw	1°	54	GGATYAAYGARGACTGYTCYAC	6177 - 6198
		REV-F	rv	1°		GACCARGAMCCGTCRCTGAGRT	7485 - 7506
		INT-F	fw	2°	54	GGGAYTGGATATGYACGGT	6231 - 6249
		INT-R	rv	2°		GGCATGGAGGARWAYGAC	7438 - 7455
		SEQ-F	fw	Sec		ARYTRTCYGCRCCTTCYYTGAARG	6903 - 6926
NS5B	1a	EF	fw	1°	58	GGAGCCYGGRGATCCRGATCTYAGC	7520 - 7544
		ER	rv	1°		TAGGCATCTACCTCCTCCCAAC	9349 - 9371
		IF	fw	2°	58	GAYGTCGTGTGYTGCTCRATGTC	7587 - 7609
		IR	rv	2°		GAGACACGCTGTGATAAATGTCTCCC	9272 - 9297
		SF	fw	Sec		TCGTAAGCCAGCTCGYCTCATCG	8060 - 8082
	SR	rv	Sec	-	CTCTCCAGGTGAAATCAATAGG	9032 - 9053	
	1b	ext	fw	1°	55	CGYTGAGTCRTWYTCCTCCATGC	7432 - 7454
		rev	rv	1°		GGGCRYGAGACASGCTGTGATA	9227 - 9248
		F_int	fw	2°	58	CTCAGYGACGGKTCYTGGTC	7487 - 7506
		R_int	rv	2°		GCTGTGATATATGTCTCCCC	9216 - 9235
F_seq		fw	Sec	-		TGGGRGTHCGYGTRTGCGAG	8040 - 8059
R_seq	rv	Sec	-	AGCATYGTRCAGTYCYKGAGC	8467 - 8487		

Fw: *foward*; rv: *reverse*; Sec: *primers* utilizado exclusivamente para secuenciar. TA: temperatura de *annealing*

5.3.2 One-Step PCR para amplificación de NS5A y NS5B

Por otro lado las muestras que no pudieron ser amplificadas mediante el abordaje de *Nested* PCR mencionado previamente, fueron sometidas a una *One-Step* PCR, a partir del ARN y con los mismos *primers* externos usados para la *Nested* PCR.

La mezcla de reacción para la *One-Step* PCR se realizó en un volumen final de 30 µl que contenía 15 µl de Buffer (2X, 0,4 mM de cada dNTP y 3,2 mM MgSO₄), 1 µl de cada uno de los *primers* (10 µM) externos detallados en la tabla, 0,2 µl de Ribolock (40U/µl, Thermo Fisher, Vilnius, Lituania), 0,6 µl de mix de enzimas retrotranscriptasa SuperScript III/Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 7,2 µl de agua DEPC y 5 µl de ARN. El ciclado de

RT-PCR consistió en una incubación a 48°C por 45 min (RT), seguida de una pre-desnaturalización a 94°C por 5min, y 40 ciclos de: 94°C por 1 min, TA°C (detallado en la Tabla 1) por 1 min y 68°C por 3 min, y finalmente una extensión final de 68°C por 10min. Posteriormente se realizó un segundo *round* con los mismos *primers* y temperaturas mencionadas en el protocolo de la *Nested* PCR.

5.4. Electroforesis en gel de agarosa

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

5.5. Purificación y Secuenciación de los productos de PCR

Los amplicones fueron purificados, a fin de ser enviados para su secuenciación, mediante los kits comerciales QIAquick PCR Purification Kit o QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), según instrucciones del fabricante, dependiendo si se observaba únicamente la banda amplificada o si se observaban bandas inespecíficas.

La secuenciación de los productos de PCR obtenidos fue realizada en el servicio de secuenciación de Macrogen Inc (Korea). Cada producto de PCR fue secuenciado bidireccionalmente con el mismo set de *primers* del 2 round de amplificación sumado a otros *primers* de secuenciación internos (Sec) detallados en la Tabla 1.

5.6. Verificación del genotipo de las muestras

5.6.1. Secuencias y alineamientos

Para determinar la correcta asignación de genotipos/subtipos realizada por los servicios tercerizados, se procedió al análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

Los cromatogramas correspondientes a las secuencias de NS5A (nucleótidos 6310 al 7584) y NS5B (nucleótidos 7609 al 9272) de los 31 pacientes uruguayos fueron visualizadas mediante el

programa Chromas Lite del Techelysium DNA Sequencing Software (<https://technelysium.com>) y editadas con el programa Seqman (DNASTAR, Madison, USA).

Subsiguientemente las secuencias obtenidas, tanto de NS5A como de NS5B, (números de acceso MH070029-MH070090) fueron alineadas con 59 secuencias representativas de los diferentes genotipos de VHC provenientes de diferentes regiones del mundo (Tabla suplementaria S1). Estas secuencias fueron obtenidas de la base de datos de VHC de Los Alamos HCV Sequence (Kuiken et al., 2005) y de NIAID Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) (Pickett et al., 2012) y se seleccionaron únicamente aquellas que provenían de genomas completos, de modo que se pudieran utilizar los mismos genomas para los alineamientos de NS5A y NS5B. El alineamiento fue realizado mediante el software CLUSTAL W (Thompson, et al., 1997).

5.6.2. Likelihood mapping

Con el objetivo de determinar la señal filogenética de cada uno de los alineamientos, a ser utilizados para la construcción de los árboles, se realizaron estudios de *Likelihood Mapping* (Strimmer, von Haeseler, & Salemi, 2012), utilizando el programa Tree Puzzle v5.3 (Schmidt, Strimmer, Vingron, & Von Haeseler, 2002) y el algoritmo “*Quartet puzzling*”. Este algoritmo permite analizar, mediante máxima verosimilitud, las topologías que pueden resolverse completamente a partir de todos los cuartetos posibles de las n secuencias del alineamiento. Un alineamiento con valores de árboles definidos superiores a 70-80% presenta un fuerte apoyo desde el punto de vista estadístico (Schmidt et al., 2002). Previo a la realización de este análisis se determinó el modelo evolutivo que mejor describía nuestro set de datos utilizando el algoritmo *Find best DNA/Protein model* implementado en el software MEGA7 (Kumar et al., 2013). A través del criterio de información de Akaike (AIC, del inglés: *Akaike Information Criterion*) se determinó el modelo evolutivo óptimo para describir cada uno de nuestros conjuntos de datos. La información así obtenida fue utilizada para configurar los parámetros para el *Likelihood Mapping* y posteriormente el modelo fue también empleado para la construcción de los árboles filogenéticos.

Se realizaron los estudios de *Likelihood mapping* con el set de datos utilizado anteriormente que incluía las secuencias provenientes de muestras uruguayas (regiones NS5A y NS5B) y muestras

representativas de otros países. Para NS5A se usaron 89 secuencias (de 953 nucleótidos de longitud) y para NS5B 90 secuencias (361 nucleótidos). Los análisis fueron realizados con un modelo de sustitución GTR, un modelo mixto de tasa de heterogenicidad (1 invariable + 5 tasas *gamma*) con 1000 cuartetos al azar. Con un parámetro de estimación de Neighbor-joining.

5.6.3. Análisis de saturación de sustituciones

Para determinar si existía saturación de sustitución en las secuencias obtenidas en el marco de esta tesis (provenientes de pacientes infectados crónicamente) se usó el método de Xia (Xia et al., 2013). Este método nos permite calcular el número de transiciones y transversiones en todos los codones y comparar los índices de saturación con la saturación crítica. La distancia genética fue estimada usando el modelo de sustitución nucleotídica GTR. Además se generaron los análisis asumiendo 2 tipos extremos de topología (simétrica y asimétrica). El análisis de saturación de sustitución fue realizado con el programa DAMBE (Xia et al., 2013; Lemey et al., 2012). El programa DAMBE está limitado a un número <32 taxones, y como el set de datos utilizado excede este número, el programa genera un subset de muestras aleatoriamente de 4, 8, 16 y 32 taxones, repetidas veces y realiza el test para cada subset.

5.6.4. Árboles filogenéticos

Una vez determinados el mejor modelo evolutivo, la no existencia de saturación de sustitución en las muestras y verificada la señal filogenética, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de NS5A y NS5B. Esto se realizó por el método de máxima verosimilitud con el modelo GTR+G+I (*time reversible* + *gamma* + sitios invariables) utilizando el software MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) y como medida de robustez de cada uno de los nodos se empleó el método de *bootstrap* con 500 pseudo-réplicas.

Para la región genómica de NS5A se utilizaron 953 nucleótidos (posición 6367 a la 7319 respecto a la cepa de referencia H77, número de acceso al GenBank: NC_004102). Para la región NS5B se incluyeron 361 nucleótidos correspondientes a la región de Okamoto (posición 8265 al 8625) usando la misma secuencia de referencia (Okamoto et al., 1992). Los árboles obtenidos se editaron mediante el programa FigTree v1.4.4 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

Posteriormente para el estudio filogenético de la región NS5A genotipo 1a se utilizaron las muestras de pacientes uruguayas *naïve* a tratamiento con DAAs ($n=20$), y 94 secuencias provenientes de Brasil y del resto del mundo (material suplementario tabla S2). Esto se realizó por el método de máxima verosimilitud con el modelo GTR+G+I utilizando el software MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016).

5.8. Análisis de sustituciones en la secuencia consenso y búsqueda de RASs a inhibidores de NS5A y de NS5B

Con el objetivo de identificar las sustituciones en las regiones de NS5A y NS5B de VHC de las cepas provenientes de los pacientes uruguayos, se generó una “secuencia consenso mundial” para los genotipos 1a y 1b. Estas secuencias fueron generadas mediante la utilización del programa Lasergene SeqMan versión 7.0.0 (DNASTAR, Madison, WI) a partir de secuencias de NS5A y NS5B circulantes en diferentes países del mundo (160 secuencias correspondientes al subtipo 1a y 88 secuencias correspondientes al subtipo 1b) extraídas de Los Alamos HCV Sequence database (Kuiken et al., 2005) y de NIAID ViPR (Pickett et al., 2012).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo fueron traducidas *in silico* a secuencia de aminoácidos y comparadas posteriormente con la secuencia de referencia consenso mundial del genotipo correspondiente, a fin de identificar las sustituciones presentes en cada una de ellas. La utilización de secuencias reconstruidas a partir de diferentes secuencias mundiales tuvo como propósito estudiar las sustituciones encontradas evitando mal interpretarlas por variaciones derivadas de la diversificación regional de este virus.

Para la búsqueda de sustituciones de resistencia se utilizó, por un lado, una búsqueda automática utilizando el programa de acceso libre Geno2pheno [HCV] (g2p[HCV]) (Kalaghatgi et al., 2016). Asimismo se realizó una pesquisa manual de las sustituciones respaldada por bibliografía actualizada (Law et al., 2019; Esposito et al., 2019; Bagaglio et al., 2018). Esta búsqueda permitió identificar además polimorfismos asociados a Resistencia (RAPs).

5.9. Mapeo de sustituciones encontradas en NS5B

Aquellas sustituciones encontradas en las cepas uruguayas, a nivel de las secuencias consenso, las cuales no habían sido al momento asociadas con la generación de fenotipos resistentes, fueron

estudiadas mediante su localización en la estructura 3D de la proteína NS5B. Para esto se procedió a descargar de la base de datos: Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) la polimerasa viral NS5B cristalizada del VHC del genotipo 1a, PDB ID: 3QGI (Gentles et al., 2011). El programa utilizado para la visualización y mapeo fue el software VMD (Visual Molecular Dynamics) (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996). Este mapeo se realizó para determinar si alguna de las sustituciones encontradas podía ubicarse, en la estructura tridimensional, cercana al sitio activo de la NS5B y/o a sustituciones ya reportadas como resistentes para DAAs.

5.10. Secuenciación masiva

Con el objetivo de analizar la presencia de sustituciones de resistencia a DAAs en poblaciones minoritarias o de baja frecuencia dentro de las cuasiespecies (<15%), y si su presencia podría influir en la respuesta a la terapia, se generaron librerías a partir de los productos de PCR generados para NS5A y NS5B a fin de someterlos a secuenciación masiva. Con este fin se seleccionaron 11 muestras:

- 8 muestras de pacientes que nunca habían sido sometidos a DAAs
- 3 muestras de pacientes recaedores a terapias con DAAs.

De estas 11 muestras, 2 pertenecen a un mismo paciente, una antes de ser tratada con DAAs y la otra muestra se extrajo después de ser sometido al tratamiento con DAAs Mas adelante se profundizara en la descripción de este caso a través de un “Reporte de Caso”

5.10.1. Preparación de librerías

Las librerías se realizaron con el TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA), según protocolo del fabricante.

Los productos de PCR utilizados como templado fueron recuantificados por el Qubit 2.0 Fluorometer dsDNA HS Assay (Life Technologies, Eugene, OR, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Fragmentación y purificación

Una vez cuantificado, se fragmentaron 100 ng de ADN por muestra utilizando el ultrasonicador Covaris M220 del Institut Pasteur de Montevideo para obtener fragmentos de aproximadamente 350 pb. Los parámetros configurados en el equipo según las instrucciones fueron:

- *Peak/DisplayedPower* (W): 50
- *Duty Factor*: 20%
- *Cycles per Burst*: 200
- *Treatment time*: 65 seg
- Cantidad de muestra por tubo Covaris: 52.5 ul (100ng)

A partir de este punto, y para continuar con la construcción de las librerías, se utilizó el Kit TruSeq Nano DNA Library Prep. La purificación del ADN fragmentado se realizó mediante la utilización de perlas magnéticas (SPB por Sample Purification Beads).

Reparación de extremos y selección de tamaño

La reparación consiste en procesar los extremos cohesivos de los fragmentos a extremos romos utilizando exonucleasas junto con buffers específicos proveídos por el kit.

Posterior a la reparación se selecciona el correcto tamaño a ser utilizado para las librerías utilizando diferentes concentraciones de las perlas magnéticas SPB. Primero se remueven los fragmentos largos para luego remover los fragmentos pequeños siguiendo cuidadosamente el protocolo del fabricante.

Por último se adenila (A) con un solo nucleótido en el extremo 3' de los fragmentos romos con el objetivo de prevenir una ligación entre fragmentos durante la ligación de los adaptadores. Los adaptadores tienen un único nucleótido T en el extremo 3' lo cual provee de complementariedad para la ligación entre el adaptador y los fragmentos. Esta estrategia asegura una baja tasa de formación de quimeras (templados concatenados).

Ligación de adaptadores

El siguiente paso en la construcción de las librerías consiste en la ligación de los adaptadores a los fragmentos. Es necesario agregar un marcador específico a cada muestra para poder procesar varias en una misma *Flow cell* del secuenciador de manera simultánea, es por esto que se le adiciona un Index a cada adaptador. Siempre que se le agrega los adaptadores se debe realizar un paso de purificación de los fragmentos ligados utilizando las SPB.

Enriquecimiento de los fragmentos de ADN

Finalmente existe un paso que consiste en la amplificación por PCR solo los fragmentos que contienen los adaptadores en los dos extremos con el fin de amplificar la cantidad de ADN de las librerías. La PCR se realiza con *primers* específicos que se unen a los extremos de los adaptadores y con un número bajo de ciclos para evitar una sobre-representación de determinados productos sobre otros. Los fragmentos que solo contienen 1 adaptador o ninguno en sus extremos son subproductos de una ligación ineficiente y no podrán unirse a la *Flow Cell* de manera que no podrán generar los *clusters* para su posterior secuenciación.

Validación de las librerías

Siempre se debe validar las librerías analizando su calidad y cuantificándolas. La cuantificación se realizó nuevamente por un método colorimétrico (Qubit). Mientras que para el control de calidad se testeó el tamaño de los fragmentos junto con su distribución realizando una corrida en la plataforma Agilent Technology 2100 Bionalyzer con un “High Sensitivity DNA chip” (Waldbronn, Germany).

Secuenciación

Cada librería generada fue normalizada a una concentración de 4 nM y se transfirieron pooleadas a una placa. La secuenciación se realizó en un equipo MiSeq (Illumina) con los reactivos de MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA). Se realizó en *reads* de 250 nt de forma *paired-end* (2x250). Esta etapa fue realizada en el servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo bajo la supervisión y guía del Dr. Gonzalo Greif.

5.10.1. Análisis de datos derivados de la Secuenciación Masiva

Se realizó el análisis de las variantes minoritarias (SNPs) y en esta etapa se contó con la colaboración del MSc. Martín Soñora (Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares, Institut Pasteur de Montevideo).

5.10.2 Pre-procesamiento de los datos

En primera instancia se evaluó la calidad de las secuencias en crudo mediante el programa FastQC v 0.10.1 (Babraham Institute, Cambridge, UK) (Andrews et al., 2015). Este programa

brinda información estadística de parámetros como son los valores de calidad de las secuencias, contenido G+C, sobrerrepresentación de secuencias (indicando si la librería genómica esta sesgada o contaminada), entre otras variables. Las secuencias contienen un valor de calidad para cada base secuenciada, lo que se conoce como valor Q. Este valor indica la probabilidad de que una base determinada sea nombrada incorrectamente por el secuenciador.

Posteriormente se realizó el trimado de los datos, el cual requiere a una filtración de secuencias que perjudican y/o alteran un resultado final acorde. Para ello es necesario filtrar secuencias contaminantes (no pertenecientes a VHC), secuencias de baja calidad, remoción de las dúplicas de PCR, remoción de *reads* con tamaños inadecuados, eliminación de los adaptadores utilizados para la secuenciación masiva y de los *primers* usados para la amplificación de las muestras. El trimado de las secuencias se realizó por medio de la herramienta Trimmomatic (Bolger et al., 2014) incluida en la plataforma web GALAXY (usegalaxy.org) (Afgan et al., 2018).

5.10.3. Alineamiento y ensamblado

Posteriormente al trimado, los *reads* se ensamblaron basándose en secuencias solapantes, y alineándolos a una secuencia de referencia empleando el programa BWA-MEM (H. Li & Wren, 2014). Las secuencias de referencia utilizadas fueron las mismas secuencias consenso obtenidas por secuenciación Sanger para cada una de las muestras. Para cada muestra se generaron archivos sorted.bam y sus respectivos índices .bai, que fueron agrupados en uno solo mediante el algoritmo *Merge Bam Files* de la herramienta SAMTools (Li et al., 2009). A partir del ensamblado se reconstruyeron la secuencias genómicas consenso para cada una de las muestras. La comparación entre la secuencia consenso reconstruida a partir de los datos de la masiva con la secuencia consenso obtenida por la secuenciación Sanger se evaluó con el software MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

5.10.4. Determinación de variantes (SNP calling)

El “variant calling” fue realizado utilizando el programa UnifiedGenotyper del paquete Genome Analysis Toolkit (McKenna et al., 2010) utilizando el algoritmo MPileUp (Li et al., 2009) con el objetivo de búsqueda de SNP. Este proceso, que identifica los sitios que difieren con la secuencia de referencia, tiene como objetivo el detectar los polimorfismos presentes, desde SNP comunes hasta variantes raras. Sin embargo, es un pre-requisito contar con alta cobertura (10.000X) para

una detección confiable de las variantes, ya que el número de *reads* alineados a cada base es usado para diferenciar entre errores de secuencia y polimorfismos verdaderos. En esta parte del proyecto de tesis nos centramos únicamente en la búsqueda de variantes previamente reportadas como asociadas a resistencia (RAS).

5.11. Visualización de datos

Para la evaluación y visualización de los alineamientos y ensamblados se utilizó además el programa Qualimap2 (Okonechnikov et al., 2016). Otra herramienta para la visualización de datos utilizada fue el IGV (Integrative Genomics Viewer) (Thorvaldsdóttir et al., 2013). Los gráficos realizados en la tesis fueron realizados con el software GraphPad Prism versión 6.0 (<https://graphpad.com>). Los perfiles de cobertura fueron generados con el programa RStudio (<https://rstudio.com>).

5.12. Análisis de la sustitución K24Q, como posible RAS ledipasvir, en un vector subgenómico de VHC.

Dentro de las sustituciones identificadas en el marco de esta tesis a nivel de la región NS5A, se encontraron varias que no habían sido previamente reportadas como asociadas a resistencia a DAAs. Teniendo en consideración este hecho, en esta sección de la tesis nos planteamos determinar el perfil de resistencia a un inhibidor de NS5A (ledipasvir-LDV) de la sustitución K24Q. Esta sustitución si bien es una RAS en el genotipo 1b, no se ha demostrado su efecto de resistencia en el subtipo 1a. Con el fin de estudiar el posible rol de esta sustitución en la generación de resistencia a DAAs, se procedió a la generación de clones subgenómicos de VHC con la mutación de interés, así como con mutaciones controles. Las mutaciones fueron, generadas mediante mutagénesis por “*Overlap-extension PCR*”, de manera de poder ensayar el perfil de resistencia a LDV en cultivo de células Huh7.5, derivadas de hepatoma humano, transfectadas con los clones mencionados. Como controles resistentes a LDV en el subtipo 1a, se eligieron las RASs K24R y Y93H previamente reportadas como RASs (Bagaglio et al., 2018; Esposito et al., 2019; Paolucci et al., 2013).

5.12.1. Vector subgenómico

Se empleó el vector subgenómico reportero HSG_FEO (L+8) de este virus, cedido por el Dr. Charles Rice del Laboratory of Virology and Infectious Disease, The Rockefeller University, Nueva York, Estados Unidos (Figura 6). Este vector codifica para dos cistrones: el primero codifica para la luciferasa de *Firefly* (FLuc) y una neomicin-fosfotransferasa II (NPTII), y su expresión está dirigida por el IRES de VHC de subtipo 1a; el segundo cistron codifica para las proteínas no estructurales NS3, NS5A y la NS5B de subtipo 1a y su expresión está dirigida por el IRES del virus de la Encefalomiocarditis (EMCV). La NPTII confiere resistencia a la geneticina (G418) y permite la selección de clones celulares con expresión estable del replicón (Kinge et al., 2014). Por otro lado, la expresión de la luciferasa permitiría cuantificar el nivel de replicación en las células.

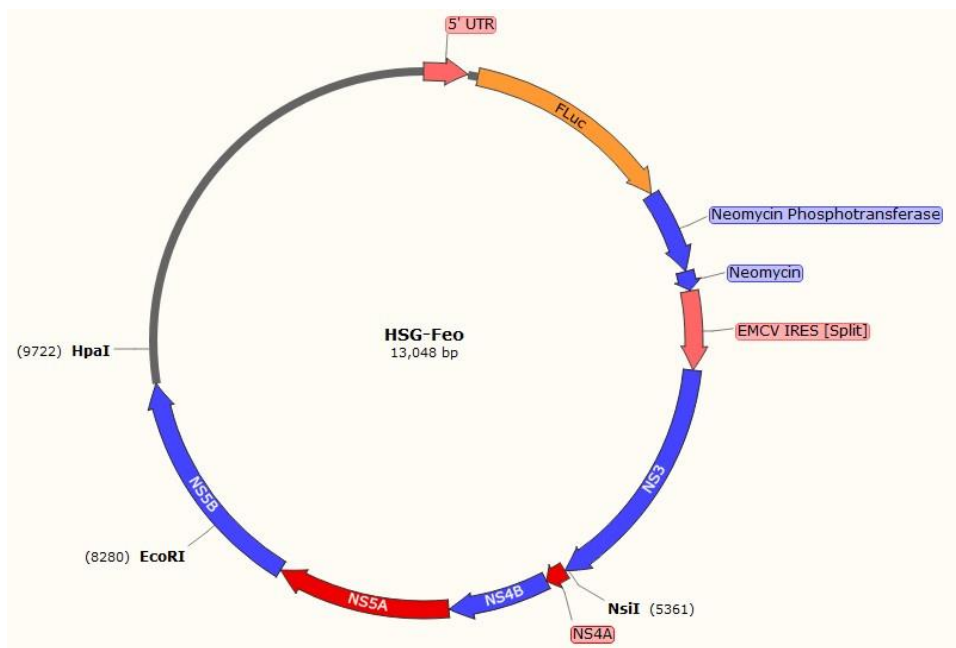


Figura 6. Representación esquemática del vector subgenómico 1a HSG-Feo utilizado para generar los mutantes. También se indican los sitios de corte de enzimas de restricción que se utilizaron en la tesis. Fluc: luciferasa de *Firefly*. Creado con SnapGeneViewer v4.2.6

5.12.2. Mutagénesis por Overlap-extension PCR

1. Diseño de primers para las mutagénesis

Para el diseño de *primers* se utilizó el programa PrimerX (www.bioinformatics.org) usando como molde el vector HSG_FEO (L+8). Los parámetros configurados fueron los siguientes: que los *primers* que incorporaran la mutación fueran solapantes, que la mutación se encontrara preferencialmente en el centro del oligonucleótido y que sus temperaturas de *melting* fueran entre 55 y 75°C. Asimismo, se diseñaron otros *primers* que incluyen sitios de corte para enzimas de restricción, y que permiten llevar adelante el protocolo de mutagénesis por *Overlap-extension PCR* y la subsiguiente clonación del producto en el vector de interés (que se detalla más adelante).

2. Obtención de productos P1 y P2

En primera instancia, para cada una de las mutaciones de interés, se obtuvieron 2 productos de PCR (P1 y P2). Cada producto de PCR va a contener la mutación incorporada por los *primers*. Las mezclas de reacción para estas PCRs incluyeron: 5 µl de Phusion HF Buffer 5X, 0,75 µl de MgCl₂ 50mM, 0,5µl de dNTPs 10mM, 1µl de cada cebador, 0,3µl de polimerasa Phusion High Fidelity (2U/µl, Thermo Scientific, USA), 10 ng de vector parental (HSG-Feo) y agua DEPC hasta completar el volumen final (25µl cada reacción). El ciclado de amplificación fue idéntico para ambas PCRs (P1 y P2) y todos los mutantes: 1min de pre-desnaturalización a 98°C, seguido de 35 ciclos de: 30seg de desnaturalización a 98°C, 30seg de hibridación a 60°C y 2 min de extensión a 72°C, y finalmente 3min de extensión final a 72°C. La lista de *primers* diseñados se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. *Primers* diseñados en el marco de esta tesis y utilizados para la mutagénesis por Overlap-PCR en el vector subgenómico HSG_FEO (L+8).

Sustitución	Sentido	Primers (5´- 3´)	Producto	Tamaño (pb)
K24R	Fwd R	GACCTGGCTGAGAGCCAAGCTCATG	P2	1923
	Rev EcoRI	CTTGGACTTCCACGCTTGCACGAGGAATTCAACC		
	Fwd Nsil	CACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCG	P1	1081
	Rev R	CATGAGCTTGGCTCTCAGCCAGGTC		
K24Q	Fwd_Q	CTTTAAGACCTGGCTGCAAGCCAAGCTCATGC	P2	1923
	Rev EcoRI	CTTGGACTTCCACGCTTGCACGAGGAATTCAACC		
	Fwd Nsil	CACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCG	P1	1079
	Rev Q	GCATGAGCTTGGCTTG CAGCCAGGTCTTAAAG		
Y93H	Fwd_H	ACGTTCCCCATTAACGCCCAACCACGGGC	P2	1719
	Rev EcoRI	CTTGGACTTCCACGCTTGCACGAGGAATTCAACC		
	Rev_H	TACAGGGGCCCGTGGTGTGGGCGTTAATGG	P1	1287
	Fwd Nsil	CACCAAATACATCATGACATGCATGTCGGCCG		

En la columna sentido: Los nombres EcoRI y Nsil refiere a primers ubicados en los sitios de cortes de dichas enzimas de restricción. Fwd: forward; Rev: reverse. En la columna de primers los nucleótidos que aparecen en **Negrita** y Subrayado corresponden al nucleótido mutado

3. Overlap-extension PCR y digestión

Previo a extender estos productos de PCR (P1 y P2) en una *Overlap-extension PCR*, se purificaron a partir de gel y se midieron sus concentraciones de ADN. Para generar el producto final que posteriormente dio lugar al inserto que fue clonado, se realizó una *Overlap-extension PCR* a partir de cantidades equimolares de P1 y P2. A modo de ejemplo, en la Figura 7 se observa la localización de los *primers* utilizados en la estrategia de *Overlap-extension PCR* para generar el mutante K24R en NS5A. El mismo procedimiento, con los primers correspondientes,

se realizó para la generación de los mutante K24Q y Y93H. La mezcla de reacción incluyó: 10 µl de Phusion HF Buffer 5X, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 0,6 µl de polimerasa Phusion High Fidelity (2 U/µl, Thermo Scientific, USA), P1 y P2 en cantidades equimolares y agua DEPC hasta completar un volumen final de 50 µl. El ciclado de amplificación fue el siguiente: 1min a 98°C, seguido de 10 ciclos de: 30 seg a 98°C, 30seg a 62°C y 3 min a 72°C, y finalmente 3 min de extensión final a 72°C. Luego de que el ciclo finalizara, se le agregó 0,5 µl de enzima, 2 µl del cebador *forward* de P1 (Fwd NsiI) y 2 µl del cebador reverso de P2 (Rev EcoRI) y se repitió el ciclado por 30 ciclos más. Estos productos finales se purificaron a partir de gel, se midieron sus concentraciones y luego fueron digeridos con las enzimas *NsiI* y *EcoRI*; obteniéndose así los insertos, cuyos tamaños aproximados fueron de alrededor de los 2971 pb. Posterior a la digestión, los insertos fueron purificados utilizando el Kit de DNA Clean & Concentrator Kit (ZymoResearch) y se midió su concentración.

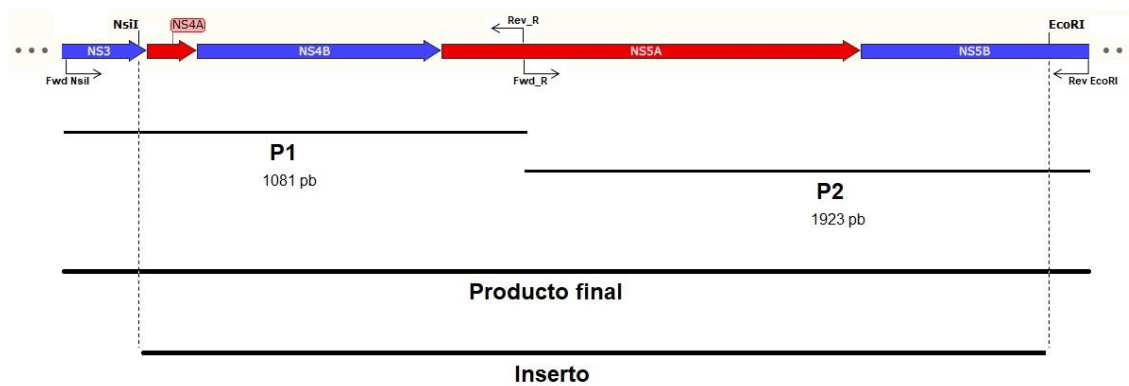


Figura 7. Esquema de la localización de los primers utilizados en la estrategia de *Overlap-extension PCR* para la generar el mutante K24R en el NS5A a modo de ejemplo. Se representa la región del vector utilizado como templado. Arriba del esquema se indican tanto los sitios de corte de las enzimas *NsiI* y *EcoRI*, como los primers *forward*, y reversos para la mutación K24R a modo de ejemplo. Con líneas negras en la parte inferior del esquema se indican los productos de PCR (P1, P2 y Producto Final, que corresponde con la *Overlap-PCR*) y el inserto (resultado de la digestión del producto final con *NsiI* y *EcoRI*).

4. Generación del *Backbone*

Por otro lado, fue necesario generar el *backbone* en el cual serán insertados los insertos mutados generados previamente por *overlap-extension*. Con este fin, el vector subgenómico HSG-FEO fue digerido con las enzimas de restricción *NsiI* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y *EcoRI* (Invitrogen, California, USA) según las indicaciones del fabricante y posteriormente fue tratado con fosfatasa alcalina (Invitrogen, California, USA) a fin de minimizar los eventos de

recirculación. El volumen total de la digestión fue sembrado en un gel de agarosa 1% con SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Madison, USA) como intercalante de ADN. La banda correspondiente al *backbone*, de aproximadamente 10.077 pb, fue purificada de gel con el QIAQuick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), según protocolo del fabricante.

5. Ligación de *backbone* con los insertos generados (con sustituciones K24Q, K24R y Y93H)

Posteriormente se procedió a ligar los insertos mutados generados al *backbone*. Para ello se utilizaron 100 ng del *backbone* y 65 ng del inserto (*ratio* 1.5:1 entre inserto y vector) utilizando la enzima T4 ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) según indicaciones del fabricante. También se realizó un control negativo de ligación en el cual solo se incluyó el *backbone* sin el inserto. La incubación se realizó por 15 min a temperatura ambiente antes de proseguir con la transformación.

6. Transformación y verificación del inserto

Una vez culminada la ligación del producto, se procedió a la transformación por *shock* térmico en células quimiocompetentes *E. coli* DH5 α . Para la transformación, se descongelaron viales de células DH5 α colocándolos en hielo de por 10 min. Luego se les agregó 10 μ l de ligación y se incubó en hielo por 30 min. Finalmente se realizó un *shock* térmico durante 30 seg a 42°C. Las bacterias fueron recuperadas mediante el agregado de 900 μ l de medio Luria Bertani (LB) e incubación por 30 min. a 37°C a 220 rpm. Posterior a la recuperación, se plaquearon 100 μ l de este cultivo en placas de LB agar con ampicilina (AMP - a una concentración final de 100 μ g/ml) y el volumen restante se centrifugó y también fue plaqueado. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 16 a 18 hs. Con el fin de amplificar los vectores, se seleccionaron 10 colonias y se las creció en 5mL de LB-AMP (a una concentración final de 100 μ g/mL) por 12h a 37°C y 220rpm.

Para verificar la presencia del inserto se realizó un *boiling* PCR. Para ello, se tomó 1ul del crecimiento de LB, se diluyó en 99 μ l de H₂O y se incubó 15 min a 95°C. Una vez culminada la incubación se realizó un *spin-down*. Se utilizaron 5 ul del sobrenadante como molde para realizar una PCR con 5 μ l de buffer (5X) con MgCl₂, 0,5 μ l de dNTPs (10 μ M), 1 μ l de *primer* (10 μ M) *forward* de P1, 1 μ l de *primer* (10 μ M) reverso de P2, 0,5 μ l de enzima Phusion High Fidelity (2 U/ μ l, Thermo Scientific, USA), y agua DEPC hasta completar un volumen final de 25

μl. Las condiciones de PCR fueron: 98°C por 5 min; 35 ciclos de 98°C por 45 seg, 53°C por 45 seg y 72°C por 1 min, y 3 min finales a 72°C.

De aquellos cultivos donde se verificó la presencia de *backbone* con inserto se procedió a la extracción de plásmidos utilizando el kit Plasmid Miniprep de Zyppy™ (Zymo Research, California, USA) según indicaciones del fabricante. Finalmente se midió la concentración del ADN extraído y se verificó la calidad de los plásmidos extraídos mediante corrida electroforética en geles de agarosa al 1%.

7. Transcripción *in vitro* (IVT)

Los ADN plasmídicos (*backbone* + inserto) generados fueron linearizados con la enzima de restricción *HpaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante y la correcta linealización fue verificada mediante corrida en un gel de agarosa al 1%. Las digestiones fueron purificadas, con el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, California, USA). A partir de 1 μg de ADN lineal y purificado, se realizó la IVT utilizando 1,5 μl de T7 ARN polimerasa (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) con 5 μl de buffer 10X, 2 μl de NTPs, 1,2 μl de Dithiothreitol (DTT) y 1 μl de Ribolock (40U/μl, Thermo Fisher, Vilnius, Lituania). Una vez culminada las 2 hs de IVT a 37°C, se trató con 1 μl con DNasa (Thermo Fisher Scientific) por 15 min a la misma temperatura. Una vez generados los ARNs se procedió a la purificación de los mismos por el método de fenol-cloroformo y su presencia e integridad se confirmó en una corrida electroforética en el gel de agarosa (Toni et al., 2018).

8. Transfección celular y línea celular empleada

Los ARNs generados en el punto anterior fueron transfectados en la línea celular Huh7.5 (Hardy, Marcotrigiano, Blight, Majors, & Rice, 2003). Esta línea celular es un clon de alta permisividad a VHC, derivado de una línea celular de hepatoma humano (Huh7) (Nakabayashi, Miyano, Sato, Yamane, & Taketa, 1982). Estas células fueron mantenidas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Paisley, UK) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, Thermo Scientific, Utah, USA), 0,1mM de AA no esenciales (NEAA, del inglés: Non-essential amino acids, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 1X de Penicilina/Streptomycin (Gibco BRL, Life Technologies) en incubadora a 37°C con 5% de CO₂.

La transfección se realizó con Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA) cuando la confluencia celular se encontraba entre 70%-90% y se empleó diferentes cantidades de ARN por pocillo de 9.5 cm² (placa de 6 pocillos) (1, 1.5, 2, 3 y 5 µg) junto con distintos volúmenes de lipofectamina (10 y 20 µl). El protocolo de transfección fue realizado según las instrucciones del fabricante y se dejó por 48 horas con OptiMEM a 1.5% de suero fetal bovino. También se incluyó en la transfección un control negativo que constó del no agregado del vector.

A las 48 horas post-transfección, se lavó el medio con PBS 1X y se comenzó a seleccionar las células que hubiesen incorporado los replicones con el antibiótico G418. Como se mencionó anteriormente la NPTII presente en el vector subgenómico confiere resistencia a la geneticina (G418) y permite la selección de clones celulares con expresión estable del replicón. Las concentraciones utilizadas de G418 fueron 50, 100, 200 µg/mL acorde a las instrucciones del fabricante. El medio con el antibiótico G418 se cambió cada 3 días previo a un lavado con PBS (solución buffer fosfato salina) 1X. Este protocolo fue realizado según protocolo previamente descrito (Kinge et al., 2014).

Lamentablemente en este punto no se logró la selección de clones celulares con expresión estable del replicón, por lo que no se pudo continuar con los estudios planeados. Estos estudios hubieran implicado realizar un ensayo de Inhibición de la replicación al 50% (IC50) en presencia de DAAs. Mediante este tipo de ensayo se pretendía poder comparar, la cinética de replicación de los diferentes genomas virales generados previamente (resistentes a ledipasvir y con mutaciones problema) mediante la evaluación de la actividad luciferasa que presenta el vector (equivalente a la replicación viral). Estos datos serían normalizando utilizando los datos generados por la actividad luciferasa del control sensible en ausencia de las drogas (vector wildtype), de forma de poder determinar la concentración de un DAA determinado a la cual un mutante disminuye un 50% su replicación. La droga a utilizar sería el inhibidor de la fosfoproteína (ledipasvir). A partir de los lisados celulares, se medirá la actividad luciferasa y se procederá a la extracción de ARN, para posteriormente analizar la estabilidad de la mutación introducida.

5.13. Puesta a punto de la producción de VHC en cultivo celular

Como parte de esta tesis nos planteamos también la puesta a punto de la producción de viriones de VHC en cultivo celular. Con este fin se utilizó el vector infeccioso de VHC J6/JFH-clon 2

(fig. 8) cedido por el Dr. Charles Rice del Laboratory of Virology and Infectious Disease). Este vector incluye el genoma completo de un recombinante intragenotípico 2a de VHC de la cepa JFH (Jones et al., 2010).

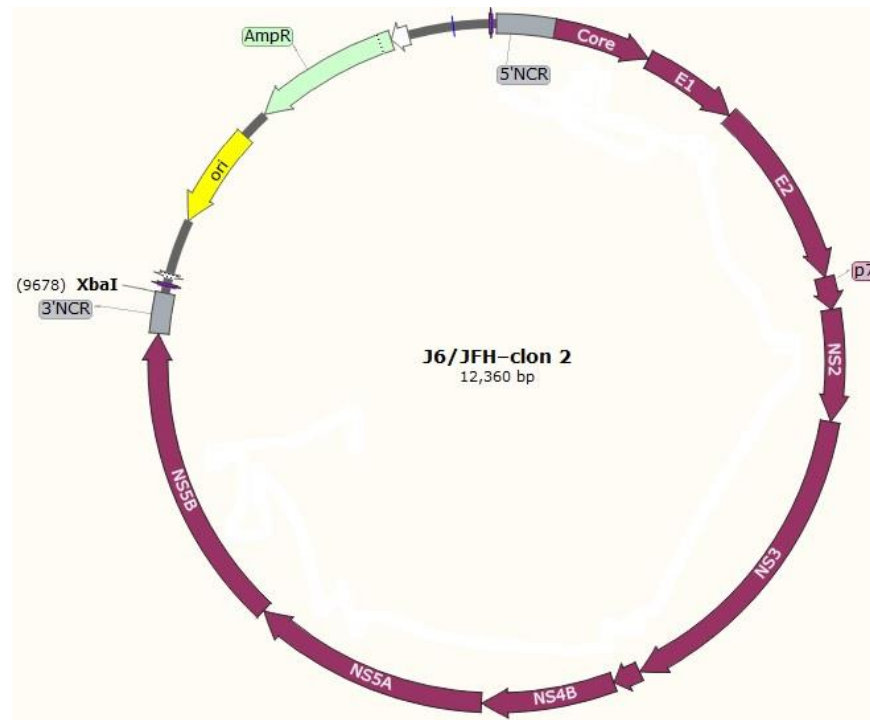


Figura 8. Representación esquemática del vector de VHC de genoma completo pJ6/JFH-clon 2. También se indican el sitio de corte de la enzima de restricción para linealizarlo. Creado con SnapGeneViewer v4.2.6

5.13.1. Cultivo celular y transfección del ARN viral

La puesta a punto consistió, en primer lugar, en el trabajo con la línea celular Huh7.5 (en las mismas condiciones ya mencionadas). También se procedió a la amplificación del vector J6/JFH en *E. coli* con el mismo protocolo utilizado para amplificar el vector subgenómico y su consiguiente purificación. Posteriormente, el ADN plasmídico fue linealizado con la enzima de restricción *XbaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

A partir de 1µg de ADN lineal, se realizó la IVT utilizando el mismo protocolo de IVT previamente mencionado. El ARN purificado fue transfectado en placa de 6 pocillos utilizando 2 µg con 10ul de lipofectamina 2000 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). A las 48 hs post-

transfección se lavó con PBS 1X y se incubó con medio DMEM completo (descrito anteriormente). Cabe mencionar que se trabajó con un control negativo (sin ARN) para evaluar el efecto citotóxico que podría tener la lipofectamina empleada como vehículo para la transfección. La determinación de efecto citotóxico se realizó por inspección visual de los cultivos transfectados. Estas líneas celulares (transfectadas con ARN y control sin trasfectar) fueron divididas antes de llegar a una confluencia del 90%. En cada pasaje se recolectó el sobrenadante y las células no sembradas. Los cultivos fueron mantenidos hasta los 24 días post-transfección y cada 3 días se realizó el cambio de medio previo lavado con PBS 1X, además de la visualización al microscopio óptico invertido (Olympus CK2, Japón) para observar la aparición de efecto citopático, que en el caso de VHC es la muerte celular

5.13.2. Cuantificación viral

Con el fin de estimar la cantidad de virus generado a partir de la transfección, se realizó un protocolo denominado TCID₅₀ (por su nombre en inglés *-tissue culture infectious dose 50%*). Este método cuantifica la cantidad de virus necesaria para destruir o producir cualquier otro tipo de efecto citopático en el 50% de las células o cultivo infectados. A partir de esto se aplica una fórmula matemática basada por el protocolo de Reed y Muench (Reed & Muench, 1938), para poder estimar la cantidad de virus en la muestra original.

Cabe destacar que este clon infeccioso es capaz de generar efecto citopático induciendo la muerte y lisis celular pero de forma lenta, lo cual podría dificultar el ensayo de titulación viral propuesto. Se decidió cuantificar la cantidad de viriones que se recolectaron al día 20 post-transfección (que fue donde se observó efecto citopático al microscopio óptico). Con este fin, se realizaron infecciones con diluciones seriadas del sobrenadante recolectado al día 20 en una placa de 96 pocillos con células en 70% de confluencia (10.000 células/pocillo) en un medio con 10% SFB. Las diluciones del sobrenadante en medio de cultivo DMEM sin SBF se realizaron desde la dilución 10⁻¹ hasta la 10⁻⁸ recorriendo todo a lo ancho de la placa de 96 con el objetivo de dejar las infecciones en un medio con una concentración final de 5% de SFB. Se realizaron 12 réplicas de cada una de las diluciones. A los 14 días post-infección, cuando se observó la presencia de efecto citopático mediante microscopio invertido, se lavaron las células con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído por 30 minutos, para posteriormente ser teñidas con cristal-violeta. Posteriormente se pretendía continuar con el protocolo basado de Reed y Muench (Reed &

Muench, 1938), pero considerando los resultados obtenidos que se discutirán oportunamente, no fue posible lograr la titulación deseada.

5.13.3. Verificación de la presencia de viriones de VHC en los sobrenadantes

Con el objetivo de verificar la presencia de viriones de VHC en los sobrenadantes del cultivo transfectado se realizó una PCR de una región conservada de la polimerasa viral (Región de Okamoto) a partir de los sobrenadantes del cultivo transfectado (20 días post-transfección) para poder corroborar la presencia de viriones de VHC. Para ello se tomó 5 µl de sobrenadante tanto de los pocillos transfectados con J6/JFH como de un pocillo control y se realizó una incubación a 65°C por 5 min para liberar el ARN viral. Este ARN fue utilizado como molde para una *one-step* PCR para amplificar la región de Okamoto de NS5B. La mix de reacción se realizó en un volumen final de 30 µl que contenía 15 µl de Buffer (2X, 0,4mM de cada dNTP y 3,2mM MgSO₄), 1 µl de cada uno de los *primers* (10 µM), 0,2 µl de Ribolock (40U/µl, Thermo Fisher, Vilnius, Lituania), 0,6µl de mix de enzimas retrotranscriptasa SuperScript III/Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 7,2 µl de agua DEPC y 5 µl de ARN. El ciclo de RT-PCR consistió en retrotranscripción en una incubación a 48°C por 45 min, seguida de una pre-desnaturalización a 94°C por 2 min, y 40 ciclos de: 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 68°C por 15 seg, y finalmente una extensión final de 68°C por 5 min. Los *primers* utilizados comprenden la región de Okamoto de la región NS5B. El *primer forward* fue diseñado en el marco de esta tesis para amplificar específicamente el subtipo 2a (5'-GCRGCCTGTCGAGCYGC-3'), mientras que el reverso fue modificado de uno ya descrito en la literatura (5'-CGGCYTGCAAGGCTGCGG-3') (Cantaloube et al., 2005). El resultado de esta PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1 %. El tamaño esperado para dicha amplificación fue de 136 pb.

6. Resultados

Sección 1

6.1. Relaciones filogenéticas de las cepas del VHC provenientes de pacientes uruguayos crónicamente infectados *naïve* a DAAs

6.1.1 Características de la población de estudio

Con el fin de estudiar VHC en pacientes uruguayos, se recolectaron 31 muestras provenientes de pacientes crónicos. Estos pacientes tenían como característica común que estaban infectados con VHC genotipo 1 y que aún no habían sido tratados con DAAs. Es importante destacar que algunos de ellos habían sido no respondedores a la biterapia (INF α y RBV). En la tabla 1 se detallan las características demográficas y virológicas resumidas que presentaban los pacientes seleccionados para el desarrollo de este proyecto de maestría mientras que en la Tabla suplementaria S1 se encuentran los datos desglosados.

Tabla 3. Características de la población estudiada

Característica		Número (%) de pacientes n=31
Sexo	Masculino	20 (64.5)
	Femenino	11 (35.5)
Edad (años), rango		47 (30 – 71)
Genotipo de VHC ^a	1a	20 (64.5)
	1b	11 (35.5)
CV (log10), mediana		5.6 (4.8 – 6.4)
Tratamiento	<i>Naïve</i>	15 (48.4)
	Con IFN y RBV	16 (51.6)
Co-infección con VIH	Si	2 (6.4)
	No	27 (87)
	ND	2 (6.4)

^a Según informado por centro asistencial

CV: carga viral

ND: no determinado

6.1.2. Confirmación de genotipos y subtipos asignados

Con el propósito de confirmar la asignación de genotipos y subtipos de VHC de las muestras a emplear, las cuales habían sido previamente genotipificadas en el sector asistencial, se

amplificaron dos regiones del genoma viral, las cuales serán foco de estudio de esta tesis. Por un lado se realizó la amplificación de una región parcial del gen NS5A (952 pb) y por el otro de una región del gen que codifica para la polimerasa del VHC (NS5B), denominada región de Okamoto (360 pb). La región de Okamoto de NS5B ha sido históricamente amplificada con el propósito de genotipificar (Cantaloube et al., 2005).

6.1.2.a Likelihood mapping de las regiones de NS5A y NS5B

Previo a la asignación de genotipos y con el fin de determinar si la información filogenética contenida en las regiones seleccionadas era suficiente para este propósito, se realizaron los estudios de *likelihood mapping*. Este ensayo se realizó con el set de datos seleccionado (tabla suplementaria S2) utilizando como modelo evolutivo el GTR + γ + I (*General Time Reversible* + distribución gamma + sitios invariables), el cual fue el modelo que mejor se adaptaba a nuestros datos de secuencia.

Para realizar el análisis se utilizó el mismo set de datos para ambas regiones analizadas (59 secuencias de genomas completos, a las que se les incluyó las secuencias de NS5A y NS5B provenientes de las 31 cepas de pacientes uruguayos). Estos sets de datos comprendían 952 nt (6367-7319 nt) de NS5A y 360 nt (8265-8625 nt) de NS5B, respectivamente. Los resultados de este análisis se representan como puntos distribuidos en un triángulo equilátero, donde una distribución en los vértices habla de la cantidad de árboles resueltos, mientras que la presencia de puntos en el centro del triángulo refiere a la cantidad de árboles sin resolver (fig. 9).

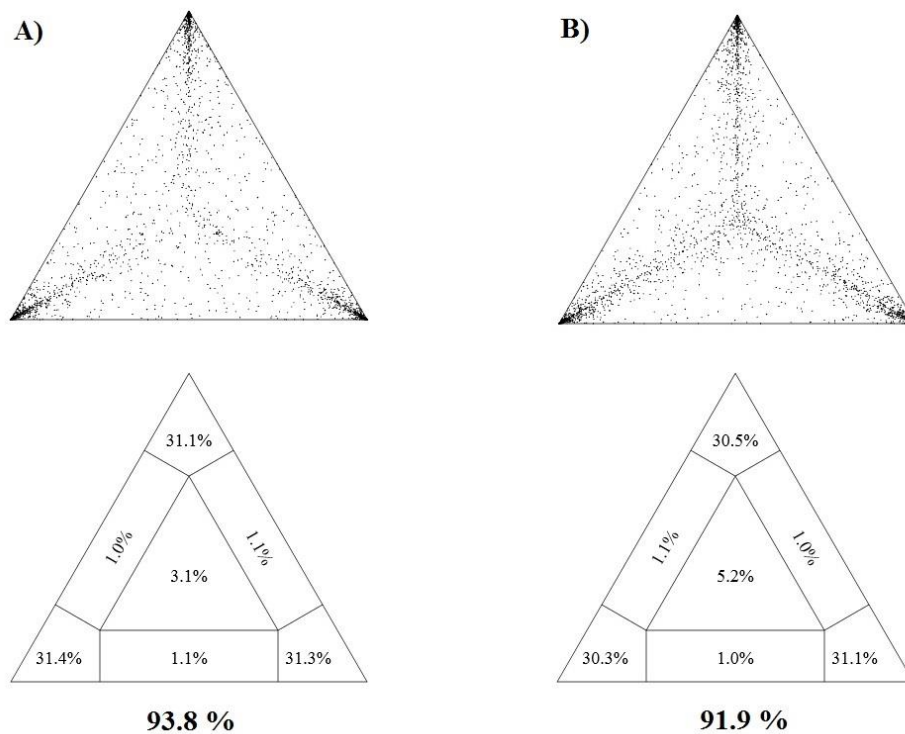


Figura 9. Análisis de *Likelihood Mapping*. A) Análisis realizado sobre el alineamiento correspondiente a NS5A (952 nt). B) NS5B (n 360 nt). Los análisis fueron realizados con el programa Tree Puzzle v5.3 (Schmidt et al. 2002) utilizando 1000 cuartetos al azar y los parámetros del modelo evolutivo GTR + γ + I (modelo mixto de tasa de heterogeneidad: 1 invariable y 5 tasas gamma).

Como se puede observar en la figura 9A, el set de datos para NS5A muestra un 93.8% de todos los árboles filogenéticos resueltos, mientras que para NS5B este valor es del 91.9%. En ambos casos, estos resultados, confirman que con el set de datos elegido, que incluye las 31 cepas uruguayas junto a 59 secuencias representativas de todos los genotipos y subtipos de VHC, presenta valores superiores al 80% de árboles resueltos, sugiriendo que las secuencias utilizadas contienen la suficiente señal filogenética para los análisis de genotipificación.

6.1.2.b Análisis de Saturación de sustituciones en las secuencias analizadas

Debido a que las cepas de VHC analizadas en esta tesis provienen de pacientes con infección crónica, donde el virus ha permanecido en el hospedero por mucho tiempo, es necesario analizar la existencia de una posible saturación de sustituciones (SS). La SS se debe a una ganancia de mutaciones a lo largo del tiempo que podrían impedir el cálculo correcto de las distancias genéticas, debido a que no se podría distinguir las mutaciones que el virus adquirió para la

adaptación en el hospedero enmascarando las mutaciones propias sobre dicha posición. El fenómeno de la saturación ocurre en mayor medida en patógenos que evolucionan rápido (Strimmer et al., 2012) y está bien establecido que VHC posee una tasa de evolución de 10^{-3} hasta 10^{-4} sustituciones por sitio por año (Magiorkinis et al., 2009; Pybus et al., 2001; Allain et al., 2000). La existencia de una saturación de sustitución podría disminuir la señal filogenética y por ende afectar la calidad y exactitud de los resultados filogenéticos.

Por lo tanto, con el objetivo de analizar la SS, en las secuencias utilizadas para los estudios filogenéticos, se utilizó el programa DAMBE (Xia et al., 2013; Lemey et al., 2012). En la Figura 9, se muestran los resultados obtenidos al analizar las secuencias provenientes de los pacientes uruguayos

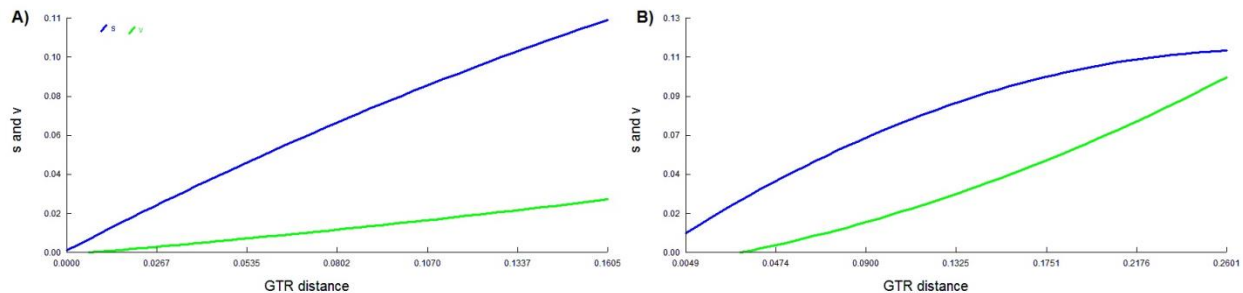


Figura 9. Análisis de Saturación de sustitución. A) Secuencias uruguayas de NS5A; B) Secuencias uruguayas de NS5B. Se grafica las transiciones (en azul) y las transversiones (en verde) en función de la divergencia. Se empleó el modelo de sustitución nucleotídica GTR para computar las distancias genéticas.

En las gráficas se puede observar la relación entre las transiciones (purina a purina o pirimidina a pirimidina) y transversiones (purina a pirimidina y viceversa) de todas las posiciones del codón versus la distancia genética usando el modelo evolutivo GTR + γ + sitios invariables. Las transiciones son más probables que las transversiones. Los resultados muestran que a pesar de que las cepas analizadas provienen de pacientes crónicamente infectados con VHC, las regiones analizadas de NS5A y NS5B no han alcanzado aún la SS, lo cual se evidencia por una mayor tasa de transiciones que transversiones.

En conclusión, los resultados indican que todas las secuencias uruguayas contienen información confiable para realizar los estudios filogenéticos ya que no se observa SS.

Adicionalmente se realizó un test para evaluar la SS a partir del set de datos completo usando el método de Xia (Xia, 2013). Este test provee un índice de la SS (Iss) y lo compara con un valor crítico de Iss (Iss.c). En la tabla 04 se muestran los resultados obtenidos de estos análisis, donde se puede observar que en el grupo de 32 secuencias el resultado de Iss es levemente menor al Iss crítico solo bajo la asunción de una topología muy asimétrica. Esto podría sugerir que nuestro set de datos sería pobre para realizar estudios filogenéticos (Iss>Iss crítico; p>0.05). Sin embargo cabe destacar que los análisis de *Likelihood mapping* (fig. 8) indican buena señal filogenética para ambos sets de datos. Adicionalmente, la topología del árbol filogenético realizado a continuación (fig. 10) presenta una estructura más similar a una simétrica y bajo la suposición de este estilo de topología, todos los valores de Iss son significativamente menores que el Iss crítico. Por lo tanto, según estos resultados se puede asumir que el genotipificado sería correcto.

Tabla 04. Test de saturación de sustituciones en NS5A y NS5B.

	n secuencias	Symmetrical topology			Asymmetrical topology	
		* Iss	[#] Iss.cSym	P	Iss.cAsym	P
NS5A	4	0,434	0,819	0	0,787	0
	8	0,427	0,787	0	0,681	0
	16	0,433	0,77	0	0,571	0
	32	0,448	0,746	0	0,439	0,7354
NS5B	4	0,354	0,785	0	0,756	0
	8	0,361	0,739	0	0,628	0
	16	0,359	0,694	0	0,485	0
	32	0,365	0,687	0	0,358	0,8151

*Iss: índice de saturación de sustitución; [#]Iss.c: valor crítico de Iss; p: valor p de tests de dos colas.

6.1.2.c Análisis filogenéticos de las regiones NS5A y NS5B del genoma de VHC

Una vez culminado todos los análisis correspondientes para definir si las regiones a ser estudiadas contienen la información filogenética necesaria para definir una correcta asignación del genotipo/subtipo se procedió a realizar el estudio filogenético. Con este fin, las 31 secuencias, tanto de NS5A como de NS5B, obtenidas de los pacientes uruguayos (números de acceso al NCBI: MH070029-MH070090) fueron alineadas con las otras 59 secuencias aisladas en otras regiones geográficas y que representaban todos los genotipos y subtipos existentes hasta el momento de su realización. Las cepas incluidas en dichos análisis se encuentran en material

suplementario (Tabla suplementaria S2). Los árboles filogenéticos fueron realizado bajo el mismo modelo evolutivo usado en los ensayos de *Likelihood Mapping* y los tests de saturación (GTR + γ + I) con 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* como medida de robustez de cada nodo. Los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud para las regiones NS5A y NS5B se muestra en la Figura 10 (A) y (B) respectivamente.

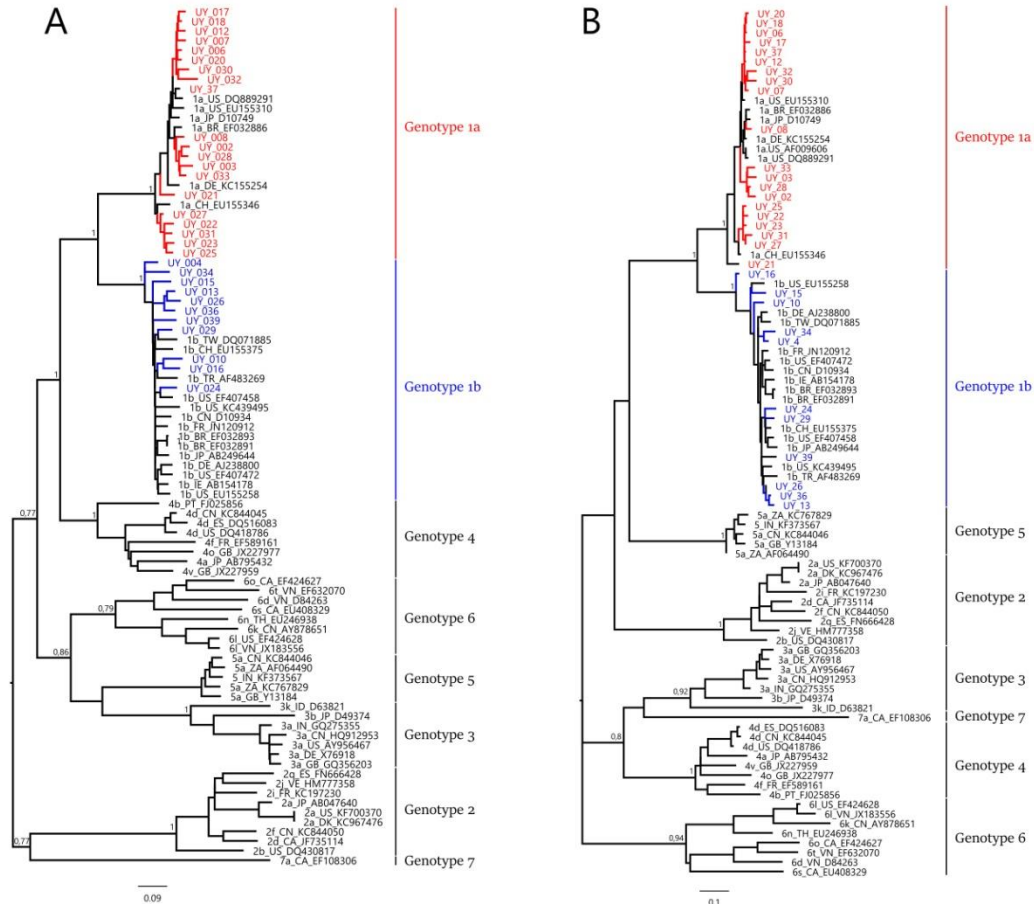


Figura 10. Árboles filogenéticos de Máxima Verosimilitud de las regiones NS5A y NS5B de VHC. Los árboles filogenéticos de Máxima Verosimilitud fueron construidos usando el modelo GTR + I + γ . En rojo se muestran las cepas 1a provenientes de pacientes uruguayos, en azul las muestras uruguayas 1b y en negro secuencias referencia para los distintos genotipos. (A) Árbol filogenético correspondiente a la región NS5A (952 pb). (B) Árbol filogenético correspondiente a la NS5B (360 pb).

Los árboles filogenéticos obtenidos tanto para la región NS5A como para la región NS5B muestran que, como era de esperar, cada genotipo se agrupa en un clado independiente con alto soporte estadístico. Como se puede observar en los árboles las cepas uruguayas incluidas en este estudio (n=31) fueron asignadas al genotipo 1. De estas 20 corresponden al subtipo 1a y 11 al

subtipo 1b. No se observó discordancia entre ambas regiones estudiadas, lo cual descarta un posible evento de recombinación entre ellas.

Con respecto a la asignación previa realizada por la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas (o servicios asociados), en 26 casos los resultados fueron concordantes, pero se identificó una discordancia de subtipos en 5 muestras que presentaban una asignación del subtipo contrario. Las muestras 7, 22 y 25 habían sido tipificadas como 1b, y nuestros estudios mostraron que eran subtipo 1a. Por lo contrario las muestras 10 y 29 se habían tipificado 1a y resultado ser 1b.

6.1.3. Estudios filogenéticos de la región NS5A de cepas subtipo

Con el fin de profundizar en las relaciones evolutivas entre las cepas circulantes en nuestro país y las circulantes en otros países del mundo, se realizaron los estudios filogenéticos de la región NS5A utilizando únicamente cepas del subtipo 1a, subtipo predominante en Uruguay y países linderos. En este estudio se incluyeron, de la región sudamericana únicamente cepas provenientes de Brasil ya que al momento eran las únicas secuencias regionales disponibles. Asimismo se había reportado que las cepas brasileras se agrupaba en un único sub clado (Martínez et al., 2019; Peres-da-Silva, De Almeida, & Lampe, 2015) y al ser un país vecino nuestras cepas podrían agruparse en el mismo.

El set de datos para este estudio (tabla suplementaria S3), estuvo compuesto por 257 secuencias, incluidas las 20 secuencias uruguayas cuyo genotipo fue identificado previamente como 1a (figura 11). Nuevamente con el fin de establecer si el set de secuencias seleccionado presentaba suficiente información para poder resolver las relaciones filogenéticas, se realizó el análisis de *Likelihood mapping*. Los resultados de este estudio se pueden observar en la Figura 11A, donde se evidencia un 95.5% de árboles totalmente resueltos.

En la Figura 11B, se puede observar el árbol de máxima verosimilitud construido a partir de las secuencias de NS5A, donde se puede observar la presencia de 2 clados distintos (1 y 2). Las secuencias brasileras agrupan todas juntas en un sub clado dentro del clado 1, mientras que las cepas uruguayas (en rojo) no se agrupan en un clado particular sino que se encuentran dispersas en los diferentes clados. Es importante destacar que se evaluó en este caso también la existencia de SS en las muestras utilizadas, lo que fue descartado ya que los valores de Iss observados son menores que los de los Iss críticos (tabla suplementaria S4).

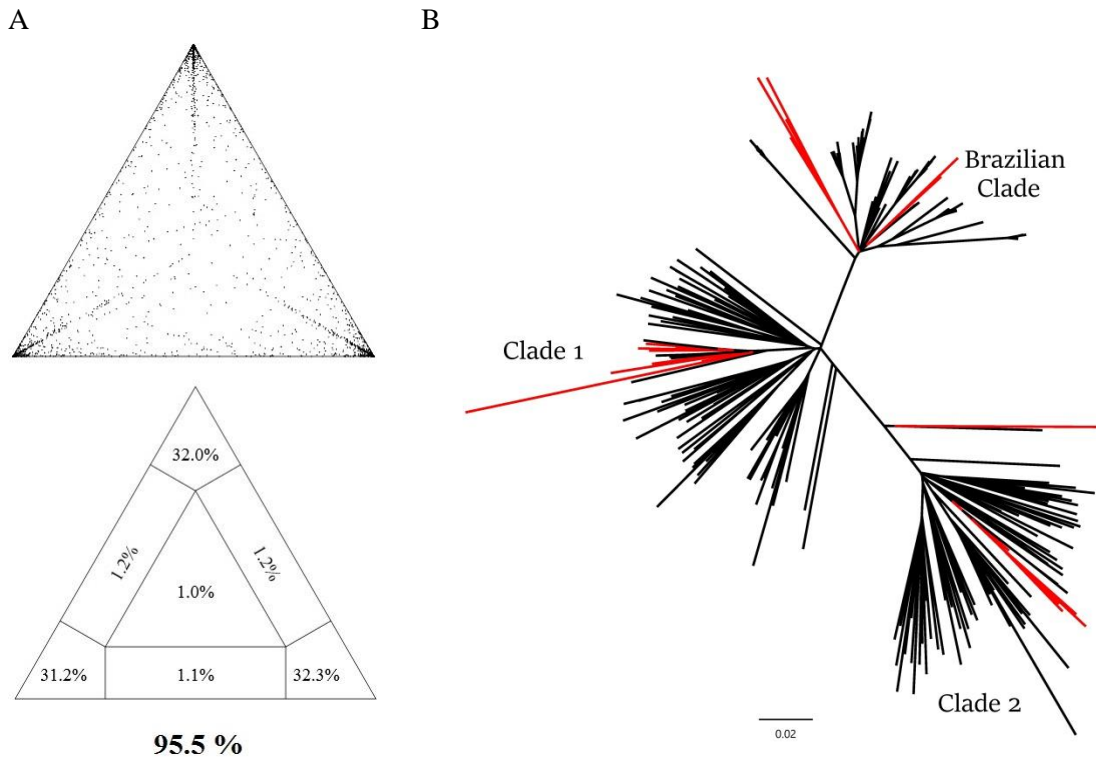


Figura 11. Relaciones evolutivas de la región NS5A subtipo 1a del mundo. El análisis fue realizado con secuencias la región NS5A de VHC del genotipo 1a de cepas uruguayas, brasileñas y mundiales. Se utilizaron 257 secuencias con un largo de 1119 nt. A) Análisis de *Likelihood Mapping* que muestra que el 95.5% de los árboles filogenéticos se resuelven correctamente. Dicho análisis fue realizado con el modelo de sustitución GTR + I + γ con 1000 cuartetos al azar. B) Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de la región NS5A de cepas uruguayas y del mundo de subtipo 1a usando el modelo GTR + I + γ . Las cepas uruguayas se muestran en rojo. La barra inferior denota distancia.

Sección 2

6.2. Análisis de sustituciones a nivel de las regiones NS5A y NS5B, que podrían influir en la respuesta al tratamiento (INF o DAAs)

Ha sido reportado a lo largo de los años, que diferentes sustituciones a nivel de las regiones que codifican para NS5A y NS5B, se encuentran asociadas a la resistencia al tratamiento tanto con INF α como a las nuevas Drogas Antivirales Directas (DAAs). En esta tesis se ha focalizado en el estudio de la región ISDR de NS5A la cual ha sido asociada a la respuesta al tratamiento con INF α , así como en las sustituciones a lo largo de NS5A y NS5B que han sido asociadas a resistencia a DAAs.

6.2.1. Estudio de Sustituciones en la región ISDR de la NS5A y su relación con la respuesta al tratamiento con IFN

Durante el tiempo en que la única terapia disponible era INF y RBV, varios autores sugirieron que la región ISDR de la NS5A podría ayudar a predecir el resultado del tratamiento con IFN, basado en el número de sustituciones presentes en la misma (Pascu et al., 2004; Enomoto et al., 1996;). Estos autores sugirieron que la presencia de más de 2 sustituciones en la región ISDR, en comparación con la secuencia consenso, se asociaba con una mayor tasa de respuesta virológica sostenida al tratamiento con IFN. Por otro lado, la presencia de menos de 2 sustituciones, se asociaba a la no respuesta al tratamiento.

Con el propósito de poder establecer, en pacientes uruguayos de genotipo 1a, la existencia de una relación entre las mutaciones presentes en la región ISDR y la respuesta a la terapia, se estudiaron las sustituciones a nivel aminoacídico en dicha región en comparación con la cepa referencia del genotipo 1a (H77, NC_004102). Con este fin se realizó el alineamiento, y la traducción *in silico*, de las secuencias de VHC de las muestra uruguayas genotipo 1a con la cepa referencia. Las secuencias provenientes de los pacientes uruguayos se dividieron en 2 grupos: provenientes de pacientes que no recibieron tratamiento (sin tratar) y provenientes de pacientes que fueron no-respondedores a la terapia basada en IFN/RBV. Hay que considerar que el grupo sin tratar corresponde a un grupo heterogéneo, ya que se agrupan cepas que podrían resultar sensibles al tratamiento con IFN con otras que podrían presentar resistencia. El resultado de estos alineamientos se muestra en las Figura 12A. Como se puede observar en el alineamiento, la

posición 2217 (marcada con la flecha), es presuntamente una posición polimórfica dado que la sustitución de la A2217T se da en el 65% de las muestras uruguayas y por tanto no debería ser tomada en cuenta para un conteo de sustituciones. A simple vista se puede observar un número mayor de sustituciones en los pacientes no tratados con respecto a los pacientes no respondedores.

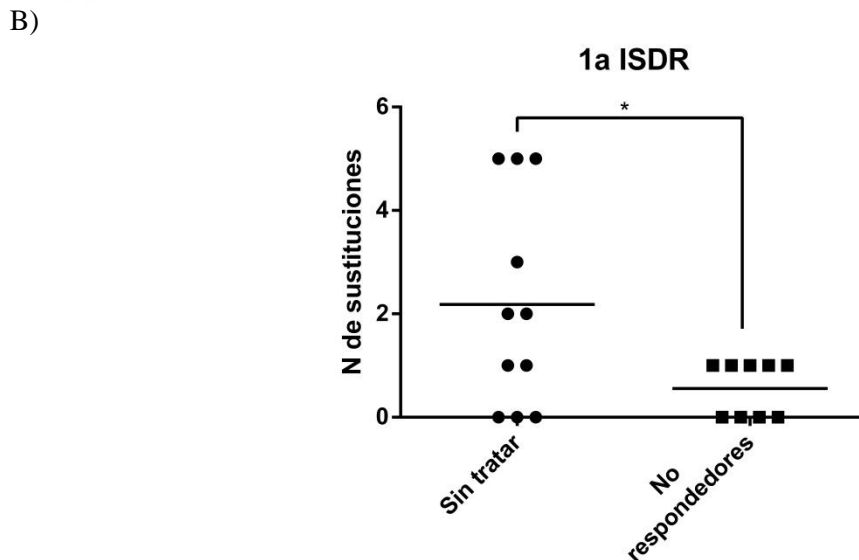
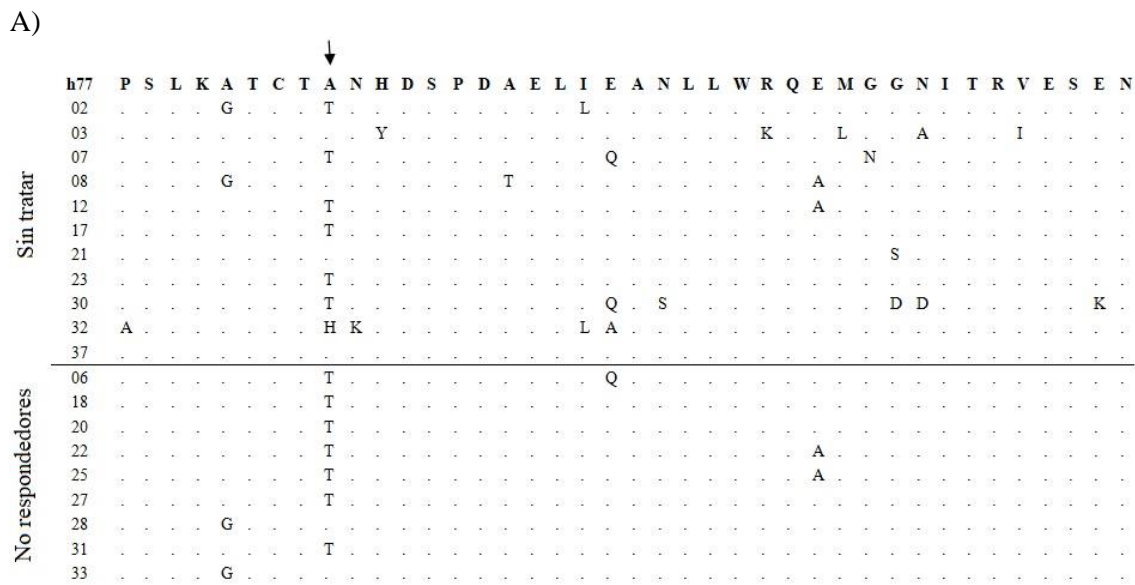


Figura 12. Sustituciones en la región ISDR de la NS5A. A) Alineamiento de las regiones ISDR provenientes de 21 pacientes subtipo 1a junto con la secuencia de referencia H77. La línea horizontal separa las cepas provenientes de los pacientes que no han sido tratados (n= 11) de los pacientes no respondedores a IFN/RBV (n=9). Los puntos (.) representan el mismo aminoácido referente a la cepa H77; la posición polimórfica 2217 se marcada con la flecha. B) se grafica el número de sustituciones en función de los “Sin tratar” y los “No respondedores”. Se muestra una diferencia significativa $p=0.05$ (*) usando el test estadístico t-test con correlación de Welch.

Cuando se realiza el estudio del número de sustituciones en los grupos de pacientes establecidos observado en la Figura 12B, se puede evidenciar, para el grupo de los pacientes que no habían recibido tratamiento, un promedio de 2.2 sustituciones, observándose una amplia variabilidad en el número de sustituciones en las diferentes muestras. Por el contrario en el grupo de pacientes no respondedores a IFN α y RBV se observa que el número de sustituciones es más homogéneo, con un promedio de 0.55 sustituciones en dicha región. Los estudios estadísticos indican que las diferencias en el número de sustituciones entre ambos grupos de pacientes es significativa. Cabe mencionar que el mismo análisis se realizó para las muestras de genotipo 1b, y a pesar de que no se contaba con un número representativo ni equitativo de pacientes en ambos grupos, no se evidenciaron diferencia significativa (resultado no mostrado).

Para determinar si el aumento de sustituciones a nivel de la región ISDR en pacientes no respondedores vs no tratados, se correlacionaba con un aumento de sustituciones globales a nivel de NS5A (en pacientes con subtipo 1a), se cuantificó el número de sustituciones aminoacídicas a nivel de la secuencia completa de NS5A obtenida en cada uno de los pacientes estudiados. A diferencia de lo observado a nivel de la región ISDR, para el caso de la región NS5A completa, no se observó diferencia significativa entre muestras provenientes de pacientes sin tratar vs las de no respondedores, mostrado en la Figura 13.

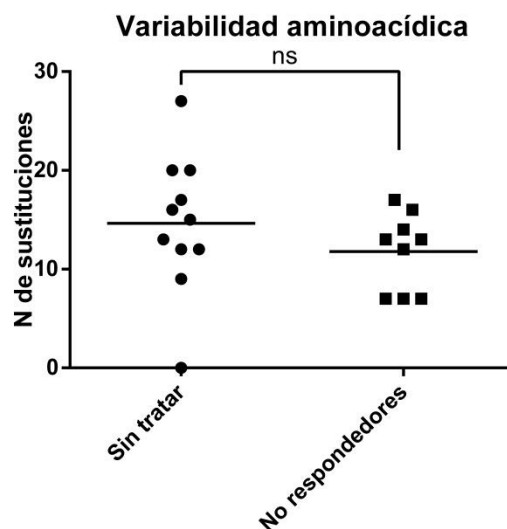


Figura 13. Número de sustituciones aminoacídicas en la región de NS5A en función del tratamiento. Se analizó las sustituciones aminoacídicas de la secuencia casi completa (958 nucleótidos) en función de los pacientes que nunca han sido tratados (n=11) y los tratados con IFN y RBV que respondieron al

tratamiento (n= 9) donde no se detectó ninguna diferencia significativa. ns: no significativo con el test estadístico t-test con correlación de Welch.

6.2.2. Estudio del perfil de RAS a DAAs a nivel de la región NS5A

Con el advenimiento de las nuevas DAAs, se comenzó a observar la emergencia de ciertas sustituciones las cuales se asociaban a la resistencia (RASs), y que en algunos casos hacían peligrar la eficacia de este tipo de terapias. Asimismo estas variantes resistentes fueron reportadas también en pacientes que eran *naïve* al tratamiento. En este marco, nos propusimos estudiar la presencia de sustituciones a nivel de la región NS5A en cepas de VHC provenientes de pacientes uruguayos que nunca habían sido tratados con DAAs. Las secuencias de aminoácidos (AA) obtenidas de estos pacientes fueron alineadas con la “secuencia consenso mundial” generada con este fin (residuos 23 a 354 relativos a la secuencia proteica de NS5A).

Los resultados de este estudio permitieron la identificación de RASs a diferentes inhibidores de NS5A en 2 de las 25 cepas secuenciadas (8%). Como se puede observar en la Tabla 5 ambas sustituciones fueron encontradas a nivel del aminoácido 31 (L31M y L31V) las cuales han sido reportadas que confieren resistencia a los inhibidores de NS5A. Un paciente mostro la presencia de la sustitución L31M, la cual confiere resistencia a DCV, LDV y EBV, y el segundo paciente mostro la sustitución L31V, la cual genera resistencia solo a LDV.

Tabla 5. Sustituciones aminoacídicas en NS5A de pacientes *naïve* al tratamiento con DAAs.

Subtipo	Muestra	RAS	RAP	Resistencia a DAA	Referencia
1a	003		H58P	-	HARVONI prescription*
	020		K24Q	-	(Lahser et al., 2016; Wyles et al., 2017)
	032		H58P	-	HARVONI Prescription*
1b	016	L31V		LDV	(Wyles et al., 2017)
	039	L31M		DCV, LDV, EBV	(Wyles et al., 2017; Zeuzem et al., 2017)

Daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV), elbasvir (EBV).*Harvoni Prescription, Center for Drug evaluation and research, Application number 205834Orig1s000

Además se encontraron polimorfismos Asociados a Resistencia (RAPs) en 3 cepas del genotipo 1a. Las RAPs, como fue explicado anteriormente, son cambios aminoacídicos que no confieren resistencia pero que ocurren en posiciones en las cuales se han reportado otros cambios que sí la generan. Se encontraron RAPs en 3 pacientes: 2 exhibían la sustitución H58P y uno la K24Q.

Aunque estas sustituciones no han sido reportadas como resistentes, otras sustituciones a nivel de esos mismos AA (H58D y K24R) han sido asociadas con resistencia a DCV y LDV (Zeuzem et al., 2017).

Se reportó además, la presencia de la sustitución E62D en una de las muestras estudiadas (subtipo 1a). Esta sustitución es considerada una sustitución secundaria ya que si bien no confiere resistencia por sí misma, cuando se encuentra en combinación con otra RASs potencia su efecto de resistencia (Sun et al., 2012).

Finalmente, se identificaron un gran número de sustituciones que no han sido asociadas con un fenotipo resistente. Dichas sustituciones se muestran en la tabla suplementaria S5.

6.2.3. Estudio del perfil de RAS a DAAs a nivel de la región NS5B

Con el objetivo de estudiar las sustituciones a lo largo de la proteína NS5B de muestras de VHC provenientes de pacientes uruguayos infectados crónicamente, las secuencias de AA fueron alineadas con la “secuencia consenso mundial”.

Es importante destacar que en 26 de las 31 muestras analizadas se obtuvo la secuencia casi completa 23 secuencias abarcaron los residuos aminoacídicos 36 al 539, mientras que las 3 secuencias restantes comprenden la región entre los del AA 36 al 557 de la proteína NS5B. Este hecho limitó el estudio de forma significativa nuestro estudio ya que existen un número importante de RASs observadas a partir del residuo 553.

Los resultados mostrarán la presencia de RASs a inhibidores de NS5B en 6 de las 26 muestras secuenciadas (23.10%) (Tabla 6). La sustitución C451R, asociada a resistencia DSV, fue identificada en 2 de las cepas estudiadas, mientras que la sustitución A421V asociada a resistencia a BCV se observó solo en una. De las 3 secuencias en las que pudimos obtener una secuencia más larga, se identificaron las RASs S556G (subtipo 1a) y la Q556R (subtipo 1b) que generan resistencia a DSV.

Por otro lado, se encontraron 2 RAPs: la A421V (en 2 muestras en el subtipo 1b) y la A553G (en una cepa del subtipo 1a). La sustitución A421V si bien ha sido asociada a resistencia a beclabuvir (BCV) en pacientes infectados con el subtipo 1a, este fenotipo resistente no ha sido demostrado

en el subtipo 1b(Kim, Han, & Ahn, 2016). En la posición 553, También se encontró la RAP A553G en el subtipo 1a donde la sustitución asociada a resistencia es la A553T (Bourlière et al., 2017).

Al igual que para el caso de las sustituciones en NS5A, se observaron un gran número de polimorfismos no asociados a un fenotipo de resistencia para NS5B (tabla suplementaria S6).

Tabla 6. Sustituciones aminoacídicas en NS5B de pacientes *naïve* al tratamiento con DAAs.

Subtipo	Muestra	RAS	RAP	Resistencia a DAA	Referencia
1a	03	C451R		DSV	(Jean Michel Pawlotsky, 2016)
	20	A421V		BCV	(Kim et al., 2016)
	22	C451R		DSV	(Jean Michel Pawlotsky, 2016)
	37	S556G		DSV	(Kati et al., 2015)
A553G			-	(Lontok et al., 2015)	
1b	26		A421V	-	(Kim et al., 2016)
		S556R		DSV	(Kati et al., 2015);(S. Zeuzem et al., 2017)
	36	S556G		DSV	(Kim et al., 2016)
			A421V		(Kim et al., 2016)

BCV: Beclabuvir; DSV: Dasabuvir

6.2.3. Mapeo de sustituciones no asociadas a priori con resistencia a DAAs

Como un primero abordaje a establecer si alguna de las sustituciones encontradas, no asociadas *a priori* con resistencia a DAAs, podrían por su localización tener un potencial efecto de resistencia se procedió al mapeo de las mismas en la estructura 3D utilizando en software VMD (Humphrey et al., 1996). En este punto se trabajó únicamente con las sustituciones a nivel de NS5B ya que se contaba con la estructura 3D de la proteína. Al día de hoy no se cuenta con estructura 3D completa de la NS5A.

En la Figura 14 se observa el resultado del mapeo de las sustituciones encontradas a nivel de NS5B en la estructura 3D de la proteína junto con un inhibidor de la polimerasa no-nucleosídico genérico. En la figura 12a se pueden observar en rojo las RASs ya descritas previamente (C316Y, A421V, C445F, C451Y, S556R), las cuales se encuentran muy cercanas al inhibidor de la polimerasa utilizado en este ensayo. De las sustituciones encontradas en los pacientes uruguayos

que no se han reportado como resistentes (tabla suplementaria S6) en amarillo se marcan aquellas (en amarillo) que debido a su localización podrían conferir un fenotipo de resistencia (V179I, S180R, L425M, Y452R) (fig. 12b).

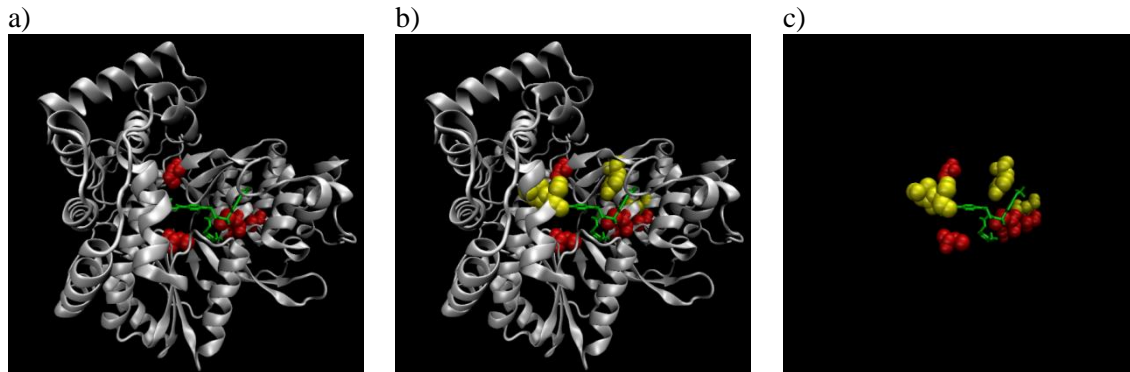


Figura 14. Mapeo de las sustituciones, no asociadas *a priori* con resistencia, encontradas en la ARN polimerasa ARN dependiente (NS5B) de las cepas de VHC uruguayas. La estructura 3D que se muestra en la figura fue obtenida del Protein Data Bank (PDB ID: 3QGI). Se observa la NS5B cristalizada (en blanco) junto a un inhibidor no-nucleosídico (representado en verde). En a) se marcan en rojo sustituciones ya reportadas como resistentes (C316Y, A421V, C445F, C451Y, S556R). En b) se agregan las sustituciones, *a priori* no asociadas a resistencia (V179I, S180R, L425M, Y452R) en amarillo y en c) se muestra el inhibidor junto a las sustituciones marcadas en a) y b) sin la NS5B con el fin de apreciar de mejor manera su localización.

Sección 3

6.3. Estudio de variantes minoritarias de la cuasiespecie viral por secuenciación profunda

Con el fin de estudiar la presencia de RASs en variantes minoritarias de la población viral se implementaron abordajes de secuenciación profunda. Como se mencionó en materiales y métodos, para este análisis se seleccionaron 11 muestras provenientes de 10 pacientes, algunas de las cuales habían sido sometidos a tratamiento con DAAs, otras a IFN y RBV o que nunca habían sido tratados. Cabe aclarar que de uno de estos pacientes se contaba con 2 muestras: una obtenida posterior al tratamiento con la terapia clásica INF/RBV previo al tratamiento con DAAs (muestra 27) y otra posterior a haber recibido tratamiento con LDV/SOF (muestra 38). En la tabla 7 se muestran las características de los pacientes seleccionados.

Tabla 7. Características de las muestras seleccionadas para el estudio de secuenciación profunda.

Muestra	Tratados	Tratamiento recibido	Carga viral ^a
1	si	PRT	6.37
12	no	-	6.65
20	si	PR	6
25	si	PR	6.9
27	si	PR	6.3
38 (post_27)	si	LDV/SOF	7.1
34	si	PR	5.6
36	no	-	5.3
37	si	PR	6.9
39	si	PR	6.49
42	si	LDV/SOF	6.2

PR: IFN α -peg + RBV; LDV: ledipasvir; SOF: sofosbuvir; PRT: PR + telaprevir

^aLogaritmo en base 10 de la carga viral en unidades internacionales por mililitro (UI/mL).

6.3.1. Control de calidad de librerías y resultados de la secuenciación masiva

Una vez generadas las librerías a partir de los productos de PCR de las regiones NS5A y NS5B, se analizó la integridad de los ADNs utilizando el Bioanalyser. Este análisis permitió verificar la distribución de los fragmentos con sus adaptadores, los cuales presentaban un tamaño promedio estimado de 525 pb (figura suplementaria S01).

Con respecto al rendimiento obtenido con el kit de secuenciación utilizado, el mismo fue de 8.9 Gb, valor muy bueno considerando el rendimiento teórico del mismo. Del total de las bases secuenciadas, el 78.4% presentó una calidad promedio de $\geq Q30$ (fig. sup. S1), lo cual se encuentra dentro de los valores esperados de calidad según las especificaciones de Illumina para este kit y el secuenciador utilizado ($>75\%$). Por otro lado, posterior a la secuenciación, el análisis de los resultados crudos permitió determinar que el 97% de los *reads* mostraron contener los adaptadores en los extremos, lo que demuestra que el indexado de las secuencias funciono correctamente además se obtuvo un tamaño adecuado de los reads (245-249 pb) (fig. sup. S2).

Posteriormente a verificar que los resultados crudos fueron satisfactorios, se procedió al trimado de las secuencias con el objetivo de depurar secuencias contaminantes y de baja calidad que podrían afectar el análisis de las muestras). La calidad de los *reads* filtrados se analizó con el programa FastQC (Andrews, 2015) mostrando óptimos resultados en todas las muestras a lo largo de las diferentes posiciones, con un promedio de Q37 por *read*. En la figura X puede observarse, a modo de ejemplo, un FastQC de la muestra 27 donde se observan los resultados pre (fig. 15a) y post trimado (Fig. XB). Como se puede observar en la Figura 15b la gran mayoría de los reads superan el valor de Q37 (mostrado en color verde) a diferencia de lo que se observa para la primera. En la Figura 15c se grafican los valores de calidad de los *reads* post-trimado, donde se observa que para la muestra 27, la mayoría exhiben un Q37. Este análisis fue realizado para cada una de las muestras individualmente.

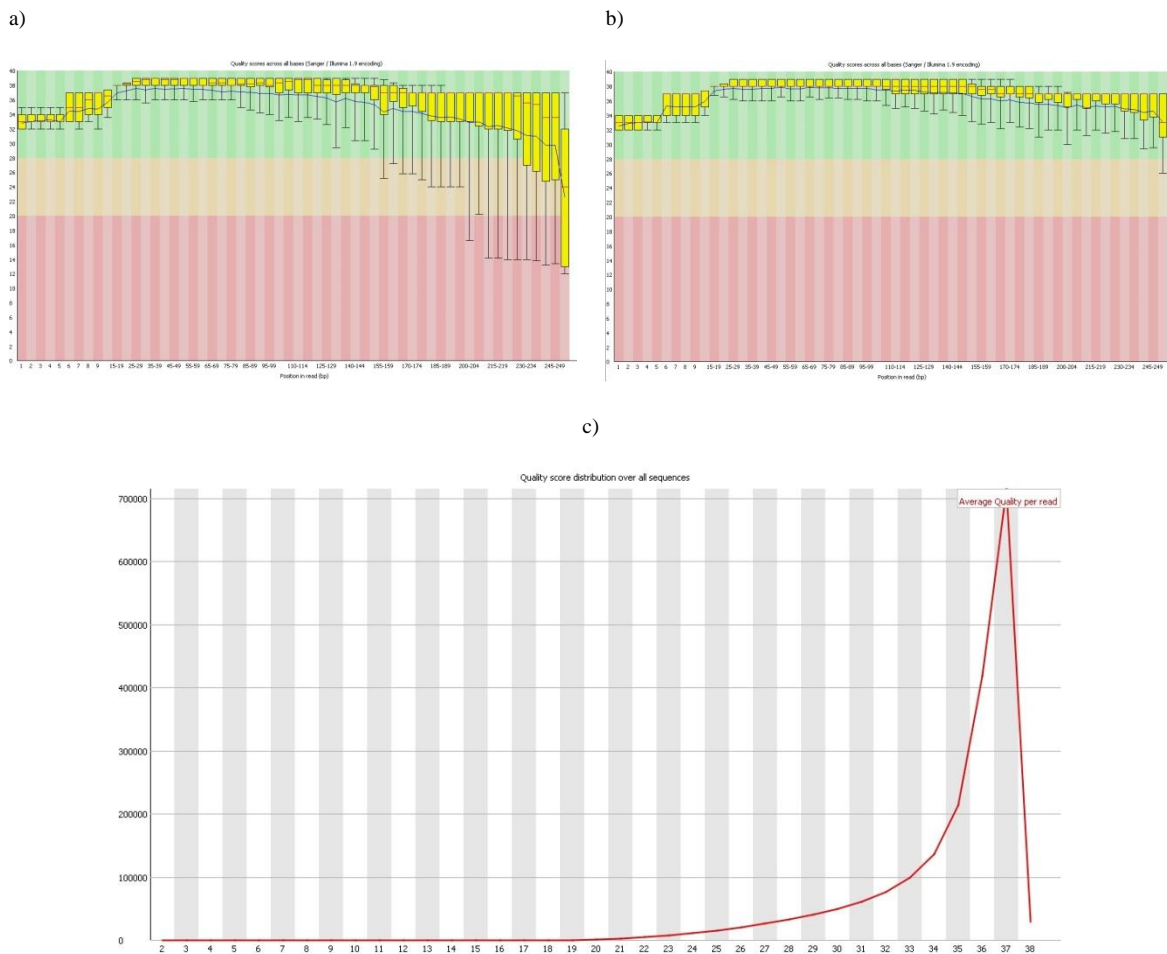


Figura 15. Control de calidad de los datos de secuenciación masiva de la muestra 27. Valores de calidad en cada una de las posiciones de los *reads*: a) Resultados crudos y b) Resultados post-trimado para cada una de las posiciones de los *reads*. La mayoría se encuentran en el área verde, y por encima de Q30. c) Valores de calidad promedio de los *reads* filtrados, donde la mayoría presenta valores altos (Q37).

6.3.2. Alineamientos

A continuación, los datos ya filtrados (calidad, largo y sin contaminantes), se alinearon con las secuencias consensos de cada muestra de NS5A y NS5B obtenida por secuenciación Sanger. Los porcentajes de *reads* de cada muestra que alinearon con NS5A y NS5B variaron entre 23,7-66,9% (tabla 08). En dicha tabla, se detallan la cantidad de *reads* sin filtrar y post trimado, junto con el porcentaje de esos *reads* que corresponden efectivamente al alineamiento con las regiones de interés, NS5A y NS5B.

Tabla 08. Detalle de los *reads* crudos y después del filtrado, así como aquellos que mapearon con la región de estudio por cada muestra.

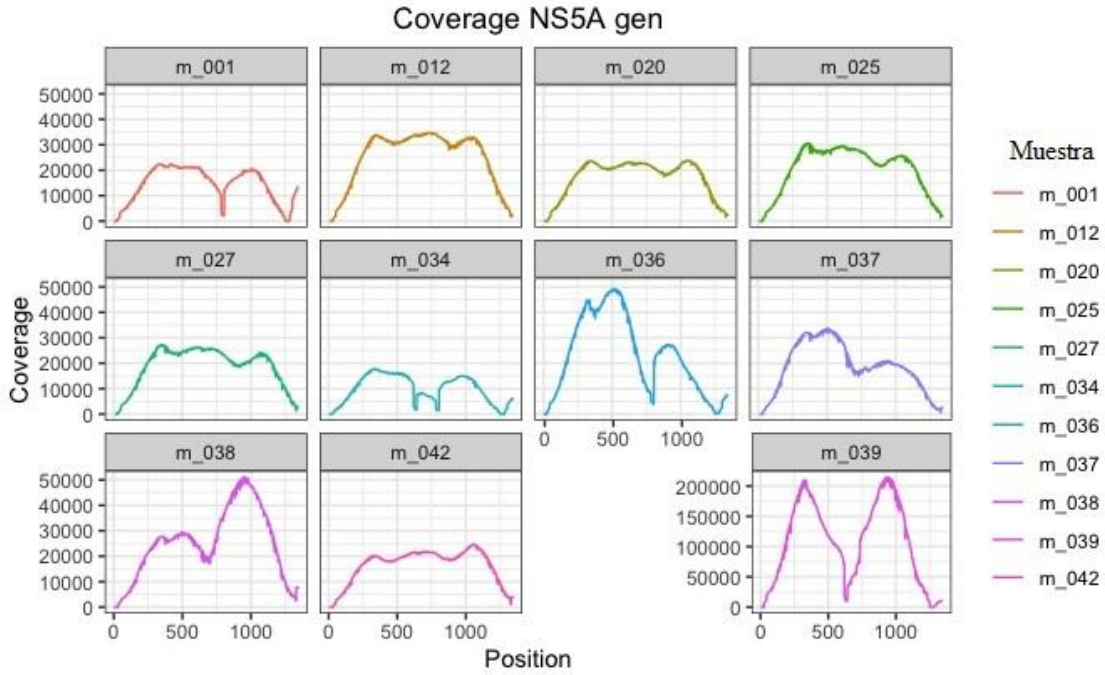
Muestra	<i>Reads</i> sin filtrar [n]	<i>Reads</i> post-trimado final [n]	<i>Reads</i> mapeados 5A y 5B [%]
1	2731852	1389018	40,38
12	2431694	949009	44,03
20	27187048	946263	44,11
25	3951016	2070769	23,7
27	3940796	1905200	30,21
34	2073176	983335	28,26
36	1642836	317495	30,59
37	2137842	1227693	51,73
38	2043616	977721	63,34
39	3561138	1764747	62,79
42	2102770	1149235	66,92

6.3.3. Cobertura

Analizando las coberturas a lo largo de la región NS5A para todas las muestras, se observa una cobertura en promedio de 20.000X, con excepción de la muestra 39 que alcanza valores 10 veces mayores (200.000X). Cabe destacar que la cobertura no fue homogénea en todas las muestras ya que, como se evidencia en la Figura 16a, algunas presentan una forma de “M” (muestras 01, 34, 36, 38 y 39).

Para el caso de la región NS5B se destaca que se obtuvo una mayor cobertura que para NS5A, con unos valores promedios de 50.000 (fig. 16b). Al igual que para NS5A es posible observar un patrón en “M”, pero en este caso en todas las muestras.

a)



b)

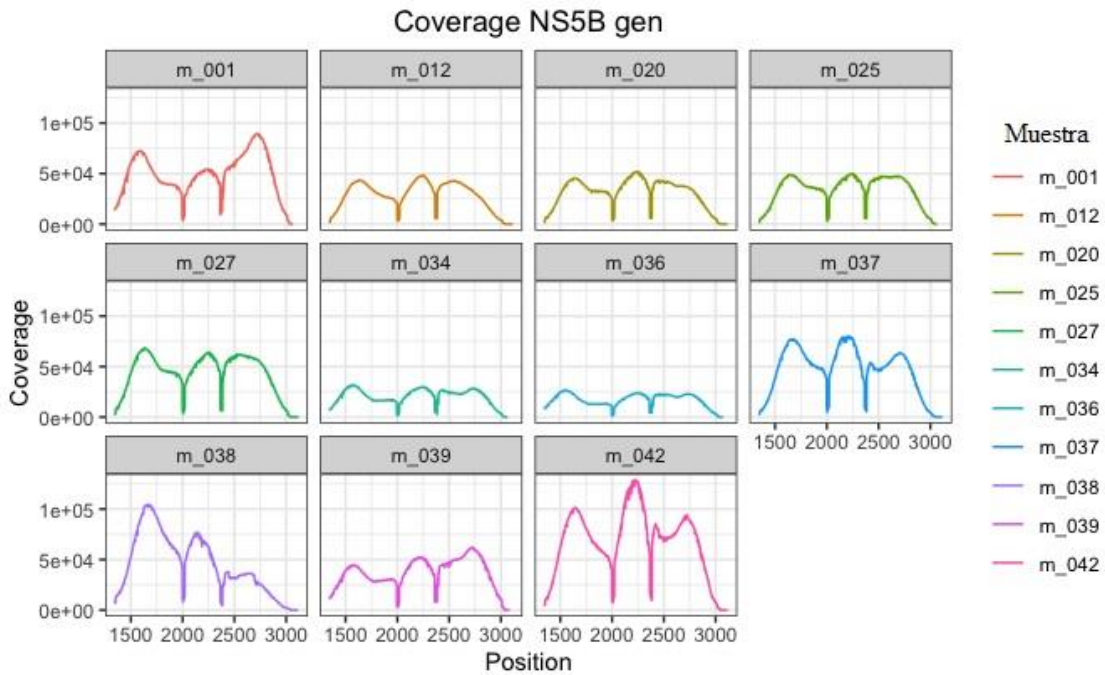


Figura 16. Cobertura a lo largo de los genes NS5A y NS5B. Cada color representa una muestra. En a) se observa la cobertura de NS5A y en b) la de NS5B.

6.3.4. Secuencias consenso generadas a partir de la secuenciación masiva

A partir de los datos obtenidos de la secuenciación masiva se procedió a reconstruir las secuencias consenso y se verificó la similaridad de las mismas con las secuencias consenso obtenidas por Sanger para cada una de las muestras. Esta comparación se realizó en el programa MEGA7 (Kumar et al., 2016), donde se alinearon las secuencias consenso obtenidas por Sanger con las secuencias consenso obtenidas por Masiva de las regiones genómicas NS5A (1211 pb en promedio de cada muestra) y NS5B (1648 pb). Cabe aclarar en este punto que los resultados de la secuenciación masiva fueron realizados a partir de los mismos fragmentos de RT-PCR que fueron secuenciados por Sanger. De todas formas, la secuenciación masiva permitió obtener tamaños de secuencias más largos que los obtenidos a partir de Sanger (75 nucleótidos más para NS5A y 40 nucleótidos más para NS5B).

Los resultados obtenidos muestran que existe una gran concordancia entre las secuencia consenso obtenidas por ambos métodos de secuenciación para las regiones genómicas estudiadas. Para NS5A la comparación tanto nucleotídica como aminoacídica, mostró un promedio de 97.97% y 98.6% de similaridad, respectivamente. Del mismo modo, para NS5B, la comparación resulta en un promedio de 98.9% y 99.4% de similaridad a nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente (fig. 17).

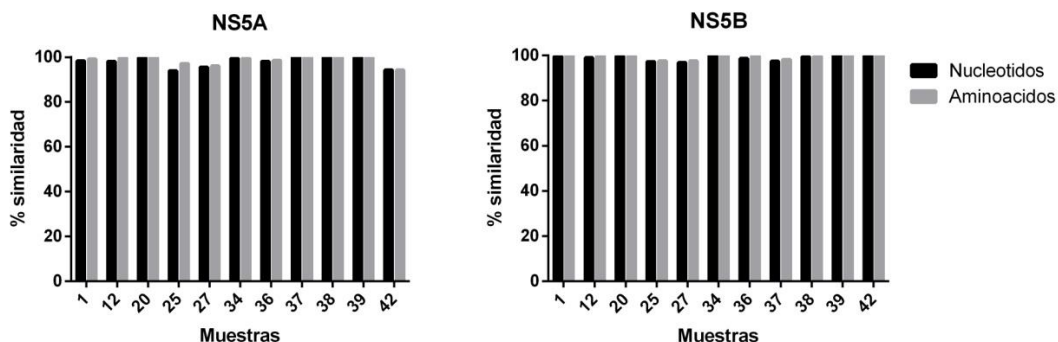


Figura 17. Similaridad nucleotídica y aminoacídica entre las secuencias consensos de NS5A y NS5B obtenidas por secuenciación Sanger vs masiva. En negro se muestra el porcentaje de similaridad en nucleótidos mientras que en gris el de aminoácidos para cada una de las muestras analizadas.

6.3.5. Identificación de cambios minoritarios y de baja frecuencia en NS5A y NS5B

La mayoría de los estudios sobre sustituciones que ocurren en las regiones NS5A y NS5B se han centrado en el análisis de las secuencias consenso. Pero existe un número de sustituciones que se encuentran en menor proporción y enmascaradas por la presencia de las secuencias mayoritarias. Por esta razón se procedió a estudiar la cantidad de cambios que no formaban parte de la secuencia consenso, y analizar en qué frecuencia se encontraban. En primer lugar, se filtraron las variantes con una profundidad mayor a 1000X ya que éstas podrían corresponderse con el error del equipo.

Para cada muestra se consideraron como cambios minoritarios a aquellos presentes en un 0,1-1,0%, como de baja frecuencia a aquellos presentes entre 1,0-15%, y como mayoritarios a todos los que se encontraran en >15%.

El análisis del número de cambios a nivel nucleotídico, evidenció que existen un número significativo de cambios que se encuentran en poblaciones minoritarias (fig. 18). Además como se puede observar en la gráfica, el número de variantes (tanto minoritarias como mayoritarias) es similar entre las muestras analizadas tanto en la región NS5A como NS5B. Apreciándose que NS5B presenta un número mayor de cambios totales en relación a NS5A, pero, dado que no se normaliza por el largo de las regiones, estos resultados no son comparables. Cabe destacar que, en todos los casos, existen un número mucho mayor de cambios presentes como minoritarios en comparación a los mayoritarios.

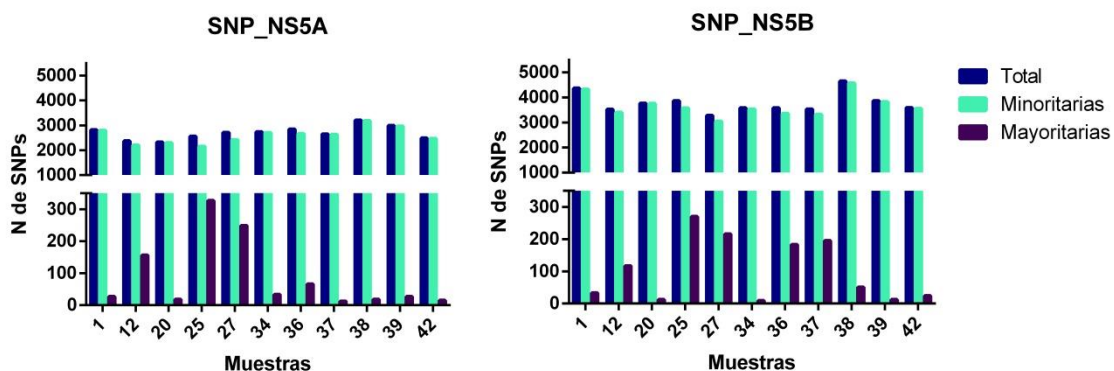


Figura 18. Gráfico del número de cambios nucleotídicos (N de SNPs) en función de las muestras. Se representa el número de variantes totales, minoritarias y mayoritarias para NS5A y NS5B. Se consideró un umbral de profundidad mayor a 1.000X para el conteo.

6.3.6. Identificación de RASs como variantes minoritarias

Para poder realizar una búsqueda de variantes minoritarias por secuenciación profunda y poder determinar que los cambios observados lleven a sustituciones aminoacídicas ya reportadas como RASs, es necesario tener una cobertura de por lo menos 10.000X para asegurar que las variantes que estén en un porcentaje de 0.1-1.0 % no se deban a errores en la secuenciación.

Con el fin de estudiar RASs a nivel de variantes minoritarias y de baja frecuencia en NS5A se consideraron solamente las posiciones aminoacídicas 58, 92 y 93, ya que fueron las únicas posiciones que cumplieron con los requisitos de profundidad mencionados anteriormente. Para el caso de NS5A es importante destacar que, a nivel de la secuencia consenso obtenida por Sanger, ninguna muestra mostro la presencia de RASs, con excepción del paciente 39 que presento la sustitución L31M. Los resultados obtenidos por secuenciación masiva muestran a nivel de la región NS5A la presencia de RASs en todas las muestras, independientemente de que el paciente hubiera recibido o no tratamiento con DAAs (Tabla 09). Estas RASs encontradas fueron todas a nivel de poblaciones minoritarias (0.1-1.0%) con excepción de las RASs H58D (muestra 27) la cual se encontró como variante de baja frecuencia (7%) y la Y93H (muestra 42) que se encontró como variante mayoritaria (45.26%).

En cuanto al estudio de RASs en la región NS5B (Tabla 10), se analizaron un mayor número de posiciones dado que esta región presentó mayores valores de profundidad (fig. 16). Las posiciones amoniacídicas estudiadas en este caso fueron la 159, 237, 282, 316, 321, 395, 446, 448, 495 y 499, y para el caso de la muestra 39 además se estudió la posición 553. Se tomaron en cuenta las sustituciones que presentan resistencia a los DAAs: DSV y SOF, las únicas aprobadas para su uso.

En este caso hay que destacar que tres de las muestras incluidas presentaban RASs en su secuencia consenso Sanger: la muestra 01 presenta la RAS Y448C y las muestras 36 y 37 presentaron la RAS S556G. Al igual en lo observado para NS5A se evidenció, la presencia de RASs como cambios minoritarios en todas las muestras independientemente del tratamiento recibido por el paciente previo a la toma de muestra. Se encontró además la sustitución Y448H en muestra 39 como cambio de baja frecuencia (3.95%).

Tabla 9. RASs a nivel de NS5A presentes como variantes minoritarias o de baja frecuencia.

Muestra	aa	Basal	Profundidad	%	Sustitución	Resistencia a DAA	Referencia
1*	58	P	12220	0,17	S	LDV	1
	92	A	21222	0,10	T	LDV	1
	93	Y	21404	0,40	S	OMV	2
12	58	H	17463	0,14	D	DCV/LDV/OMV/ELB	1
	93	Y	32054	0,20	C	DCV/LDV/OMV/ELB	1
			32054	0,10	S	LDV/VEL	1
20	58	H	13696	0,11	D	DCV/LDV/OMV/ELB	1
	92	A	22468	0,10	T	LDV	1
	93	Y	22798	0,23	C	DCV/LDV/OMV/ELB	1
25	58	H	13526	0,11	D	DCV/LDV/OMV/ELB	1
	93	Y	26920	0,18	C	DCV/LDV/OMV/ELB	1
27	58	H	13813	7,23	D	DCV/LDV/OMV/ELB	1
	92	A	25106	0,10	T	LDV	1
	93	Y	25579	0,19	C	DCV/LDV/OMV/ELB	1
			25579	0,14	S	LDV/VEL	1
34	58	P	9448	0,17	S	DCV	2
	92	A	16984	0,11	T	LDV	2
	93	Y	17159	0,18	S	OMV	2
36	58	P	23392	0,23	S	DCV	2
	92	A	42873	0,16	T	LDV	1
	93	Y	43073	0,11	H	DCV/LDV/OMV/ELB	1
			43168	0,31	S	OMV	2
37	58	H	15887	0,14	D	DCV/LDV/OMV/ELB	1
			29644	0,25	C	DCV/LDV/OMV/ELB	1
	93	Y	29644	0,13	F	LDV/VEL	1
			29644	0,16	S	LDV/VEL	1
38*	58	H	13453	0,16	D	DCV/LDV/OMV/ELB	1
			25137	0,34	C	DCV/LDV/OMV/ELB	1
	93	Y	25137	0,14	F	LDV/VEL	2
			25137	0,17	S	LDV/VEL	2
39	92	A	188448	0,12	T	LDV	2
	93	Y	190083	0,10	H	DCV/LDV/OMV/ELB	1
			191056	0,41	S	OMV	2
42*	58	H	12011	0,11	D	DCV/LDV/OMV/ELB	1
			20460	0,24	C	DCV/LDV/OMV/ELB	1
	93	Y	20364	45,26	N	DCV/LDV/OMV/ELB	1
			20460	0,14	S	LDV/VEL	1

Daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV), elbasvir (EBV), velpatasvir (VEL), ombitasvir (OMV). *Fueron sometidas a DAAs [1]: (Law, 2019); [2]: (B. R. Jones, Howe, Harrigan, & Joy, 2018). En **Negrita** se detalla variante de baja frecuencia.

Tabla 10. RASs a nivel de la región NS5B presentes como variantes minoritarias o de baja frecuencia.

Muestra	aa	Basal	Deep	%	Sustitución	Resistencia a DAA	Referencia
01*	159	L	48693	0,11	F	SOF	3
	282	S	56792	0,29	G	SOF	1
	414	M	85754	0,11	T	DSV	2
			85737	0,14	V	DSV	2
12	237	E	25435	0,13	G	SOF	3
	316	C	43476	0,27	Y	DSV	3
	321	V	41266	0,32	A	SOF	3
	495	P	23368	0,20	S	DSV	2
20	237	E	32669	0,17	G	SOF	3
	321	V	47610	0,31	A	SOF	3
	395	A	43641	0,11	G	DSV	2
	495	P	29972	0,14	S	DSV	2
			29836	0,17	L	DSV	2
25	237	E	32549	0,36	G	SOF	3
	316	C	47654	0,10	Y	DSV	3
		F	47654	0,13	F	SOF	3
	321	V	45483	0,33	A	SOF	3
	395	A	43259	0,18	G	DSV	2
	446	E	54720	0,10	K	DSV	1
	448	Y	54694	0,11	C	DSV	1
	495	P	36512	0,17	S	DSV	2
36310			0,12	L	DSV	2	
27	237	E	40926	0,18	G	SOF	3
	316	C	63275	0,12	Y	DSV	3
	321	V	60549	0,33	A	SOF	3
	448	Y	69726	0,10	C	DSV	1
	495	P	45094	0,15	L	DSV	2
34	159	L	19880	0,18	F	SOF	3
	411	N	26518	0,13	S	DSV	1
	445	C	27909	0,79	F	DSV	2
	448	Y	28694	0,74	C	DSV	1
			28562	0,15	H	DSV	1
36	159	L	16306	0,10	F	SOF	3
	411	N	26558	0,16	S	DSV	3
	448	Y	25475	0,12	C	DSV	1
37	237	E	51984	0,11	G	SOF	3
	314	L	68767	0,11	H	DSV	1
	316	C	66499	0,11	Y	DSV	3
	321	L	60985	0,44	A	SOF	3

	446	E	70621	0,10	Q	DSV	1
	495	P	45930	0,28	L	DSV	2
			46276	0,11	S	DSV	2
	159	L	86443	0,20	F	SOF	3
	237	E	60411	0,28	G	SOF	3
	314	L	53648	0,12	H	DSV	1
	316	F	51394	0,18	F	SOF	3
		C	51394	0,11	Y	DSV	3
38*	321	V	46730	0,41	A	SOF	3
	414	M	43946	0,25	I	DSV	2
	446	E	40143	0,12	Q	DSV	1
	448	Y	39107	0,26	C	DSV	1
			39314	0,21	H	DSV	1
	495	P	18889	0,23	S	DSV	2
			18772	0,30	L	DSV	2
	411	N	61431	0,17	S	DSV	2
	445	C	66850	0,20	F	DSV	3
39	448	Y	67125	3,95	H	DSV	1
			67232	0,10	C	DSV	1
	553	A	10933	0,36	V	DSV	1
	237	E	66179	0,24	G	SOF	3
42*	448	Y	102805	0,11	C	DSV	1
	495	P	73790	0,16	S	DSV	2
			73361	0,16	L	DSV	2

DSV: dasabuvir; SOF: sofosbuvir. *Fueron sometidas a DAAs. En **Negrita** se detalla variante de baja frecuencia. [1]: (Law, 2019); [2]: (B. R. Jones et al., 2018); [3]: (Bagaglio et al., 2018).

6.3.7. Hacia una transferencia Básica-Asistencial: aporte de la secuenciación masiva al estudio de un caso clínico.

El propósito de esta sección es mostrar los resultados obtenidos del estudio de un caso clínico, donde se integró la información clínica del paciente, provista por la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas, con los resultados obtenidos a partir de los estudios de secuenciación (Sanger y masiva).

A continuación pasamos a detallar las características clínicas del paciente así como los regímenes terapéuticos a los cuales fue sometido.

a) Características clínicas del paciente seleccionado:

58 años, sexo masculino, sin factores de riesgo para enfermedad hepática ni consumo de alcohol nocivo. En mayo del 2012 fue diagnosticado como VHC positivo (genotipo 1a). La biopsia hepática reveló, ese mismo año, que no presentaba fibrosis significativa. Tampoco presentaba co-infección con Virus de la Hepatitis B ni Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).

b) Tratamiento con biterapia clásica

En referencia al tratamiento, en octubre del 2012 comienza con tratamiento con IFN α -peg (180 μ g/semana) más RBV (1000 mg/día). El tratamiento fue bien tolerado por parte del paciente y no requirió ninguna modificación de dosis. A las 4 semanas de comenzado el tratamiento, presentó carga viral aún detectable, y al cabo de 12 semanas solo se constató una disminución de la carga viral de 2 órdenes, por lo que se consideró como “no-respondedor” y se suspendió el tratamiento. Desde dicha fecha al 2016 se le hizo seguimiento clínico y paraclínico sin evidenciar progresión de la enfermedad.

c) Tratamiento con DAAs y estudios de secuenciación Sanger

A comienzos del 2016, cuando el paciente presentaba una carga viral de 6.3 log, se realizaron los estudios moleculares correspondientes para la detección de RASs en el Laboratorio de Virología Molecular (muestra 27). Se analizó las secuencias consensos de NS5A y NS5B obtenidas por Sanger no detectándose RASs a ninguna DAA, por lo que en abril del 2016 comenzó el tratamiento con el inhibidor de NS5A (LDV) y un inhibidor de NS5B (SOF) (400 mg/día y

90mg/día) más RBV (1000 mg/día). El uso de RBV responde al hecho de haber sido no respondedor a la biterapia clásica (Fondo Nacional de Recursos, 2019). A las 4 semanas intra-tratamiento con DAAs + RBV no se detectó presencia de VHC, como tampoco finalizado el mismo a las 12 semanas. En el transcurso de este tiempo el paciente tuvo una buena adhesión y toleró bien el plan terapéutico y no recibió ningún medicamento que pudiese interferir con el mismo. Sin embargo a las 12 semanas del fin del tratamiento (24 semanas de comenzado) el estudio molecular para VHC fue positivo y la cuantificación de la carga viral fue de 7.1 Logs. Bajo estas circunstancias, el paciente fue definido como “recaedor” a la terapia con DAAs.

A las 12 semanas post finalización del tratamiento con DAAs una nueva muestra fue evaluada en el LVM en búsqueda de RASs a nivel de la secuencia consenso (muestra 38), no evidenciándose ninguna que pudiese explicar la falla en el tratamiento.

d) Estudios de secuenciación masiva

Con el fin de aportar información que pudiera ser relevante a fin de explicar las causas de las fallas terapéuticas, en el marco de esta tesis realizamos el secuenciado profundo de estas muestras con el objetivo de identificar la existencia de RASs que se encontraran en frecuencias minoritarias (0,1-1.0%) y que no hubiesen podido ser detectadas por metodología convencional de Sanger. En la Figura 19 se ilustra un esquema cronológico de los tratamientos a los que fue sometido el paciente y la evaluación molecular.

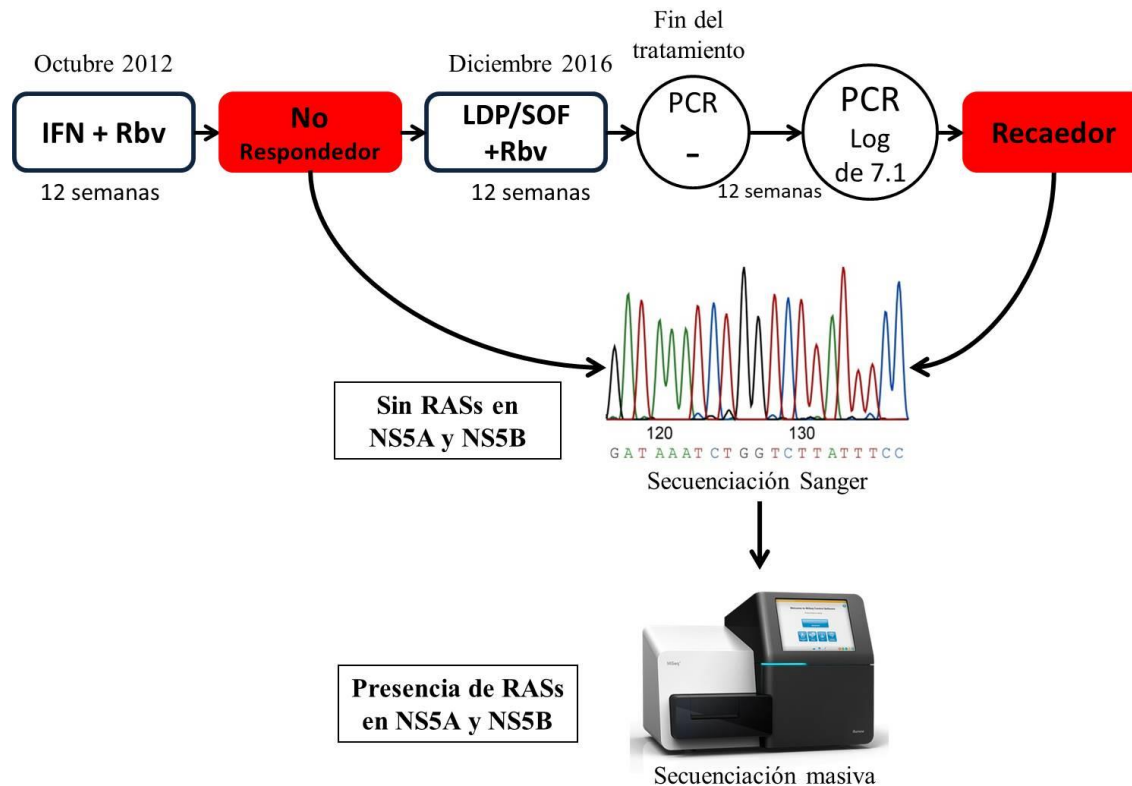


Figura 19. Esquema representativo en orden cronológico de los tratamientos a los que fue sometido el paciente y las muestras analizadas.

Los resultados de la secuenciación profunda, a diferencia de lo observado con los resultados de Sanger, muestran la existencia de RASs como variantes minoritarias. En las tablas 9 y 10 se muestran las sustituciones que fueron reportadas como resistentes a nivel de NS5A y NS5B y que fueron encontradas tanto en la muestra pre (27) como en la post (38) tratamiento con LDV/SOF.

En la Figura 20A se muestran las RASs halladas en la región del NS5A antes y después del tratamiento con DAAs. En dicha figura se observa que previo al tratamiento con DAAs se encontraron las RASs H58D, A92T e Y93C/S todas presentando resistencia para LDV (tratamiento al que fue sometido el paciente). La RAS H58D se encontró como una variante de baja frecuencia (7.23%), mientras que las variantes A92T, Y93C e Y93S se encontraron como variantes minoritarias (0.10%, 0.19% y 0.14%, respectivamente). Posterior al tratamiento, el cual ejerció una presión selectiva para NS5A a través del LDV la RAS H58D disminuyó a un 0.16% mientras que no se detectó la RAS A92T. Por lo contrario, la sustitución Y93C aumentó a un 0.34%, la Y93S a 0.17% y surgió una nueva sustitución asociada a resistencia a LDV, la Y93F en un 0.14%.

En la Figura 20B, se muestran las RASs en NS5B encontradas en las muestras pre y post tratamiento por secuenciación masiva. Previo al tratamiento con DAAs se observó la presencia de las RASs C316Y en un 0.12%, la Y448C en un 0.1% y la P495L en un 0.15%. Todas ellas confieren resistencia a DSV. También se encontraron las RASs E237G (0,18%) y V321A (0,33%) asociadas a resistencia a SOF (droga a la cual fue expuesto el paciente).

El análisis de la muestra post tratamiento mostró un aumento en la frecuencia de la mayoría de estas RASs ya sea para DSV como para SOF. En el caso de las RASs a DSV se evidenció un aumento de Y448C (0.26%) y P495L (0.30%), así como una leve disminución de la RAS C316Y (0.11%). Además se observó la aparición de las RASs L314H (0.12%), M414I (0.25%), E446Q (0.12%), Y448H (0.21%) y P495S (0.23%). Para el caso de RAS a SOF se vio un aumento de la E237G (0.28%) y V321A (0.41%) junto con la aparición de la L159F (0.2%) y C316F (0.18%).

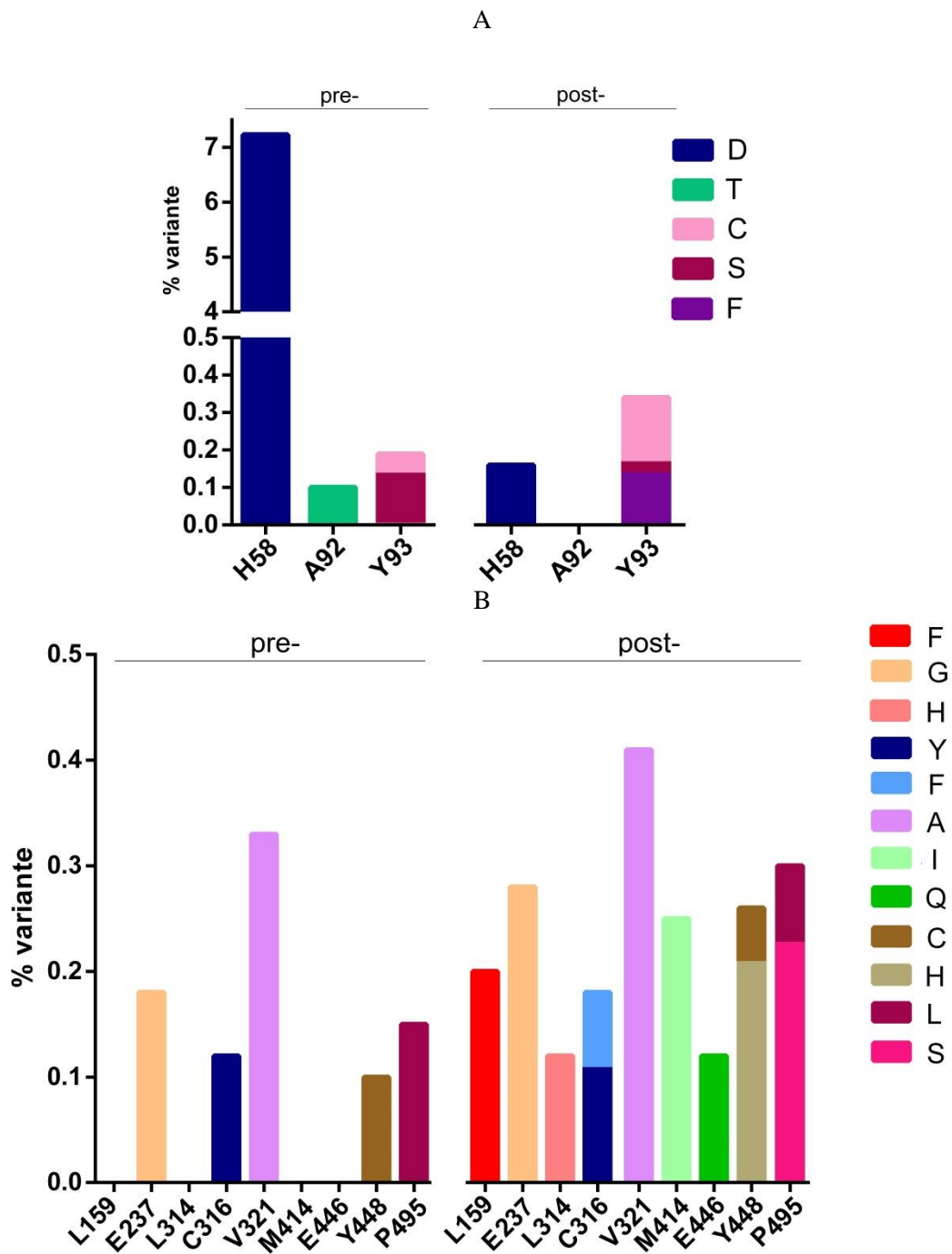


Figura 20. Variantes minoritarias y de baja frecuencia detectadas por secuenciación profunda en las muestras del paciente recaedor a la terapia con DAAs. En a) y b) se observan las variantes halladas pre- y post- tratamiento con LDV/SOF+RBV para las regiones NS5A y NS5B, respectivamente. Las sustituciones detalladas corresponden a RASs ya reportadas. Todas las sustituciones encontradas en NS5A confieren resistencia a LDV. En B) las RASs específicas para SOF son L159F, E237G y V321A.

Sección 4

6.4.1. Desarrollo de una estrategia experimental que nos permita caracterizar posibles sustituciones de resistencia a ledipasvir a nivel de NS5A.

En esta tesis se identificaron, a nivel de la secuencia consenso diversas sustituciones que no habían sido reportadas previamente como RASs (tabla suplementaria S5), así como un número menor de RAPs.

A raíz de esto, se planteó desarrollar en nuestro laboratorio una estrategia que nos permitiera estudiar el perfil de resistencia de estas sustituciones. Con este objetivo se seleccionó la RAP K24Q, encontrada en la región NS5A de la muestra 20 (Tabla 05, de la sección 1) a fin de determinar su perfil de resistencia frente al antiviral LDV (inhibidor de NS5A). Dicha sustitución no ha sido explorada en estudios de perfil de resistencia al momento de desarrollar dicha tesis. En esta posición la sustitución que si había sido reportada como resistente a LDV era la K24R.

Para poder evaluar correctamente la sustitución problema (K24Q) se propuso compararla con dos sustituciones que previamente si habían sido asociadas a resistencia a LDV: la K24R, RAS en la posición problema ($>2fold\ resistance$), y la RAS Y93H, una sustitución ampliamente reportada ($>2fold\ resistance$). Así poder comparar el comportamiento de dicha sustitución frente a concentraciones crecientes del antiviral en cultivo celular.

Para valorar la sustitución de interés, se utilizó un vector subgenómico de VHC del genotipo 1a que solo codificaba para las proteínas no estructurales NS3 a NS5B, en el cual se introdujeron las mutaciones deseadas (de interés y controles) por el método de *overlap-extension* PCR (*OE-PCR*). En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los pasos empleados para obtener los vectores subgenómicos mutantes.

Como se desprende de la Figura 21, el proceso de mutagénesis por *Overlap-Extension* PCR fue exitoso. En el gel de la (fig. 21A) es posible apreciar que los tamaños de los productos P1 y P2 obtenidos coinciden con los tamaños esperados según se detalla en la tabla 2 de Materiales y Métodos. Es importante destacar, que en el carril de la *OE* se pueden observar, además del producto deseado (3000pb), los fragmentos P1 (1287pb) y P2 (1791pb) empleados como molde.

Una vez obtenido el producto de las *OE*-PCR de las 3 mutantes, se procedió a la obtención del *backbone* y a la simultánea digestión de los productos *OE* (fig. 21B), protocolo que también resultó exitoso. Posteriormente se ligaron los fragmentos *OE* (mutados, digeridos y purificados) al *BB*, fueron transformados en bacterias quimiocompetentes. En dichas transformaciones se obtuvo más de 200 colonias para cada uno de los mutantes K24R, K24Q, Y93H, mientras que, se obtuvieron solamente 3 colonias en la placa correspondiente al control negativo (*BB* ligado sin inserto).

Se picaron alrededor de 10 colonias de cada transformación y previo a realizar la extracción de plásmidos, se verificó la presencia de inserto mediante *boiling* PCR con *primers* internos a los fragmentos *OE* (136 pb). Esta verificación fue necesaria ya que el *BB* podría haber recircularizado y el mero crecimiento de la bacteria no es un indicativo de que tenga el inserto. En la Figura 21C se muestran los resultados obtenidos de esta PCR para el mutante Y93H, en el cual como se observa en el gel se obtuvieron 8/10 colonias positivas (con inserto) (carriles 1-3 y 6-10). Para las sustituciones K24R y K24Q se obtuvieron 9/10 y 8/10 colonias positivas, respectivamente (datos no mostrados). El control negativo de PCR empleado provino de la colonia que creció cuando solo se transformó el *BB* (sin inserto), mientras que el control positivo consistió en el uso del vector subgenómico como molde.

Una vez verificado que los vectores contenían el inserto con la mutación, se procedió a la purificación de los vectores y la secuenciación del inserto. El análisis de la secuencia de nucleótidos mostró que todas las secuencias contenían las mutaciones deseadas (fig. sup. S4). Posteriormente los vectores fueron linearizados con la enzima de restricción *HpaI* que genera un único corte (fig. 6). Con los vectores linearizados se realizó una transcripción *in vitro* (IVT) generando los ARN correspondientes. En la Figura 21D se observa el gel de agarosa donde se corrieron: el producto de la IVT del vector subgenómico (ARN), el vector *wildtype* en forma lineal (ADN) que presenta una menor migración que el ARN, y en el último carril se observa el vector subgenómico sin digerir (ADN circular).

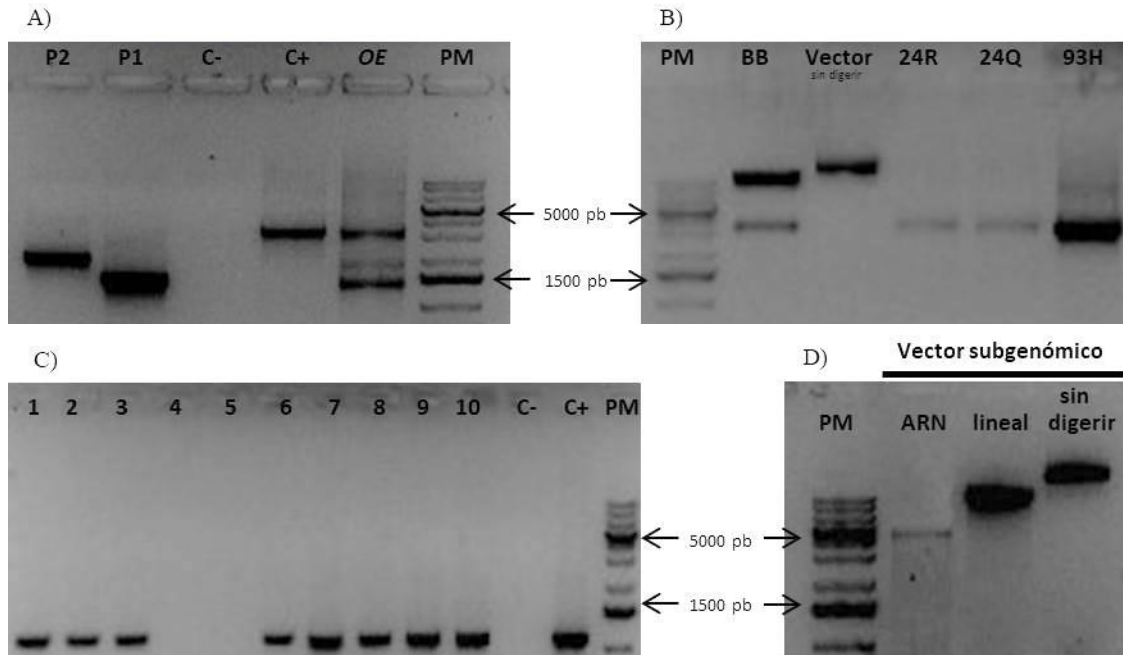


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de las etapas para la obtención de los ARN subgenómicos controles y mutantes. A) Fragmentos obtenidos (P1 -1298pb y P2 - 1719pb) en el proceso de generación del mutante Y93H, el control negativo de PCR (C-), el control positivo (C+) (usando como molde el vector subgenómico *wildtype* con los *primers* externos de la OE-PCR, 3000 pb) y el producto resultado de la *overlap-extension* PCR (OE-PCR). B) Digestión del vector subgenómico y los productos de OE-PCR con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NsiI*. En BB se observan los productos de digestión: el *backbone* (BB) (10000 pb) y el fragmento escindido (3000 pb), en el carril siguiente se encuentra el vector sin digerir a modo de control y en los 3 carriles finales se observan las digestiones de las OE PCR. C) *boiling* PCR para identificar las colonias con vector con inserto, mostrando como ejemplo los clones mutantes Y93H (carriles 1 al 10), así como los controles negativo y positivo (carriles 11 y 12) Tamaño del fragmento amplificado es de 136 pb. D) Gel no desnaturizante de ARN mostrando los resultados de la IVT: ARN del vector subgenómico, vector lineal de ADN (Lineal) y vector sin digerir como controles de tamaño.

Los ARN purificados (de los vectores subgenómicos controles y mutantes) se transfectaron en la línea celular Huh7.5 cuando las células se encontraban en un 70% de confluencia, en una placa de 6 pocillos (9.5 cm²). A las 48 horas se removió el medio de transfección, se lavó con PBS 1X y se dejó en medio completo con el antibiótico G418 para que solo crecieran las células resistentes al mismo y así poder seleccionar aquellas que hubieran incorporado el vector subgenómico.

Las transfecciones fueron realizadas numerosas veces con diferentes cantidades de lipofectamina (10 y 20 µl) y con distintas cantidades de ARN (1, 1.5, 2, 3 y 5 µg). Asimismo se probaron distintas concentraciones de antibiótico (50, 100, 200 µg/mL) administradas en distintos tiempos (48, 72 y 96 horas post transfección). Después de mantener las células en dichas condiciones por

2 semanas, no se obtuvieron células capaces de resistir a la G418. Por esta razón no fue posible continuar con los ensayos planificados de IC50.

Los resultados esperados incluían la obtención de clones de células Huh7.5 transfectados establemente con los vectores subgenómicos mutantes y sin mutar, de modo de poder someterlos a concentraciones crecientes del antiviral LDV para poder calcular el valor IC50, y compararlo con los de las RASs controles.

6.4.2 Puesta a punto de la producción de VHC en cultivo celular

6.4.2.a Cultivo celular y transfección del ARN viral

Tener un vector subgenómico implica que no es posible la producción de una progenie viral y por lo tanto los experimentos quedan restringidos a estudiar estrictamente la producción de las proteínas no estructurales como es el caso del vector subgenómico HSG-Feo H77.

Es por esto que también se disponía de un vector infeccioso de genoma completo capaz de generar viriones infectivos de VHC. Debido a que en el laboratorio no poseíamos la experiencia de trabajar con este virus en cultivo celular, se propuso comenzar con la puesta a punto de este nuevo sistema: desde la generación de ARN, la transfección a las células Huh7.5, observación de efecto citopático y la cuantificación de la progenie viral generada. Cabe resaltar que no se empleó este sistema de vector infeccioso para los ensayos anteriores, en primer lugar porque usualmente los ensayos de IC50 se realizan con vectores subgenómicos (Cheng et al., 2016; Kinge et al., 2014), y en segundo lugar, porque las sustituciones caracterizadas en las muestras provenientes de pacientes uruguayos correspondían al genotipo 1 de VHC, mientras que el clon infeccioso es de genotipo 2.

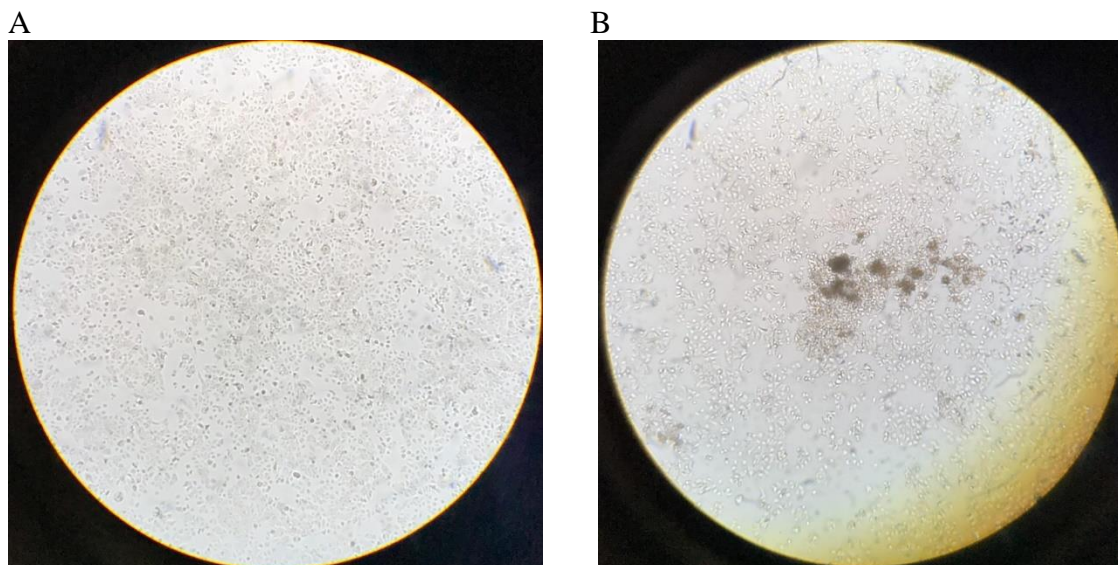


Figura 22. Imagen de células Huh7.5 a los 20 días post-transfección. Células transfectadas solamente con el vehículo (*mock*) (A) vs células transfectadas con ARN del vector J6/JFH – clon 2 (B) a los 20 días. Las células fueron divididas cada 3-4 días durante la duración del experimento. Imagen obtenida del microscopio invertido a magnificación 4X.

En la Figura 22 se observan las células a los 20 días post-transfección. Las células transfectadas *mock* evidenciaron una confluencia de casi el 100%, mientras que aquellas transfectadas con el ARN del vector infeccioso presentaban un leve efecto citopático y exhibían una menor confluencia acompañada de acúmulos de células muertas no adheridas al sustrato de la placa.

6.4.2.b Cuantificación viral

Con el fin de titular el virus al día 20 post-transfección se realizó el ensayo TCID₅₀ (fig. 23). Se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) del sobrenadante del cultivo transfectado con VHC (día 20) y se realizaron las infecciones correspondientes en placa de 96. A los 14 días de iniciado el experimento se observó una menor tinción únicamente en la dilución 10^{-1} (Fig. 23B y 23D) lo cual refleja que hay un menor número de células adheridas como resultado de la infección viral.

Dado que el efecto citopático resultante de la infección fue muy poco visible, y no se detectó en diferentes diluciones, no fue posible cuantificar los viriones generados. Independientemente de los anterior, es interesante destacar que en las 4 esquinas de ambas placas de IC50 (*mock* e infectada), se observa también menor tinción lo cual presumiblemente se corresponda con el efecto borde debido principalmente al hecho de que el ensayo se extendió a 14 días sin cambio de medio (Woodroffe & Ginsberg, 1998).

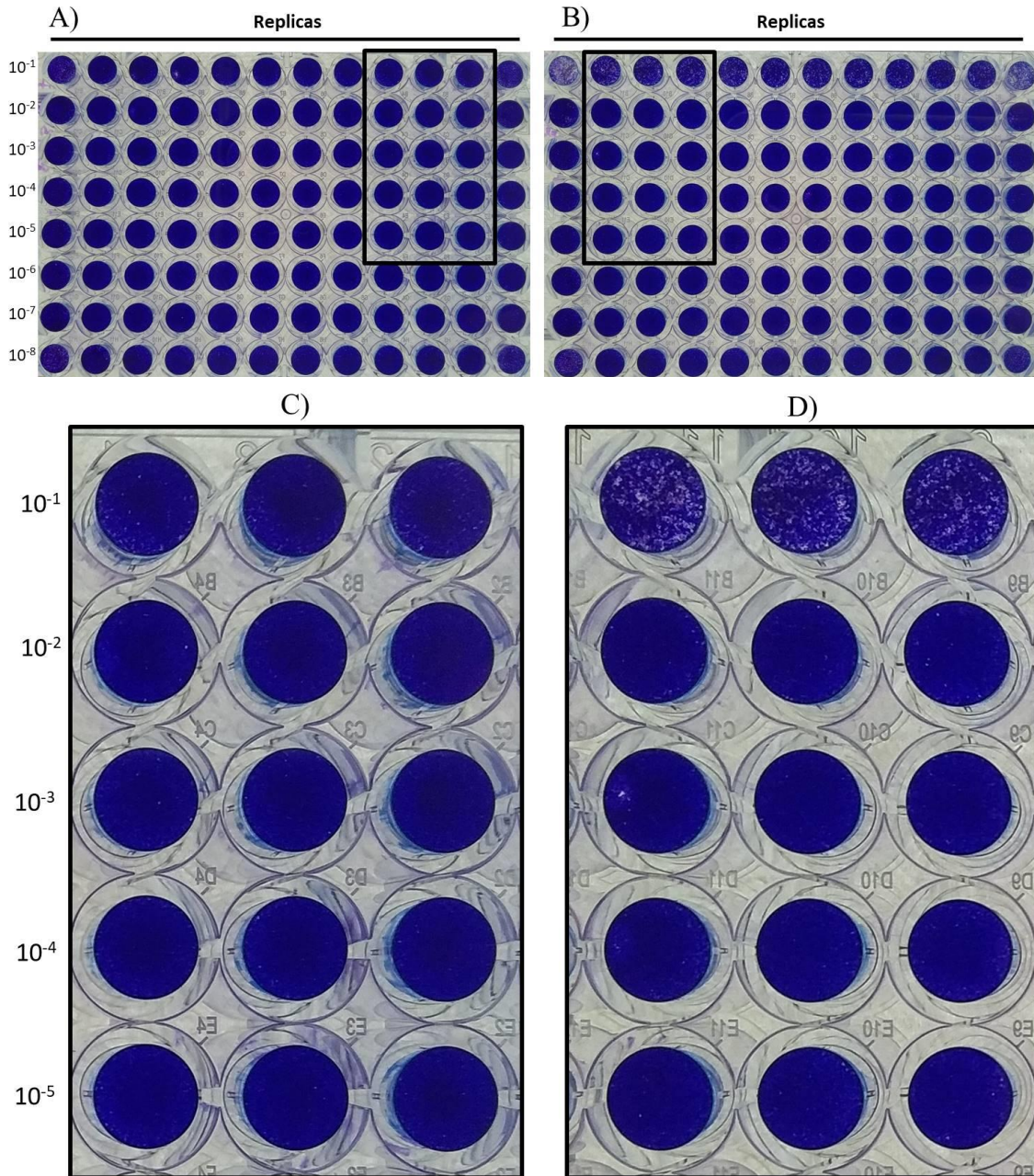


Figura 23. TCID₅₀ de células Huh7.5 infectadas con los sobrenadantes del día 20 post-transfección. Se observan las placas de 96 pocillos del control (*mock*) (A) y de VHC J6/JFH-clon 2 (B), donde cada fila fue sembrada con diluciones seriadas del sobrenadante correspondiente (10⁻¹ al 10⁻⁸). En C y D se indican imágenes magnificadas de las primeras diluciones con el fin de ilustrar el efecto en la concentración 10⁻¹.

6.4.2.c Presencia de ARN de viriones de VHC en los sobrenadantes

Debido a que no se pudo realizar la titulación viral a partir del ensayo TCID₅₀, se propuso verificar la presencia de ARN viral en los sobrenadantes obtenidos post-transfección, mediante la

amplificación de una región del genoma viral, como modo indirecto de corroborar la presencia viral producto de una transfección efectiva. Con este propósito se realizó la amplificación de la región de Okamoto por RT-PCR a partir de los sobrenadantes correspondiente a los días 13 y 20 post-transfección. Como control se empleó el sobrenadante al día 20 de células que no fueron transfectadas con el ARN del vector infeccioso (*mock*). En la figura 24 se puede observar la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos (136 pb) donde se observa que sólo hay ARN viral en los sobrenadantes de los cultivos transfectados con el clon infeccioso.



Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR *one-step* para la región de Okamoto. En el carril 1 se observa el PM, los siguientes carriles corresponden a los resultados obtenidos a partir de los sobrenadantes correspondientes a transfecciones con el ARN de J6/JFH-clon 2 a los 13 y 20 días post-transfección y el sobrenadante de células transfectadas *Mock*. Como control positivo se utilizó ADN del vector infeccioso como molde y como control negativo de PCR, agua DEPC. La banda esperada es de 136 pb.

7. Discusión

7.1. Relaciones filogenéticas de las cepas del VHC provenientes de pacientes uruguayos crónicamente infectados naïve a DAAs

Existen diversos métodos para genotipificar y subtipificar al VHC (secuenciación Sanger, *real time* PCR, entre otras) a partir de diferentes regiones del genoma viral. Sin embargo es relativamente frecuente la asignación incorrecta de genotipos y de subtipos pudiendo llevar a clasificaciones erróneas (Némoz et al., 2018; Neukam et al., 2017). Nuestro laboratorio reportó previamente la asignación errónea de genotipos y subtipos usando diferentes metodologías en nuestro país, por lo cual esto continúa siendo un tema de interés tanto a nivel clínico como básico (Echeverría, 2019).

En este trabajo nos centramos en el estudio de las regiones NS5A y NS5B del genoma de VHC. Los resultados obtenidos en los estudios de *Likelihood Mapping*, y respaldado por la ausencia de saturación de sustituciones en las muestras de VHC uruguayas, nos permitieron concluir que ambas regiones utilizadas contenían la información suficiente para la realización de los estudios filogenéticos (Schmidt et al., 2002). Esto nos permitió realizar una confiable y correcta asignación tanto de genotipos como de subtipos. De hecho, la región de la NS5B se emplea usualmente para la asignación de los genotipos en la clínica y la academia (Ohno et al., 1997; Okamoto et al., 1992). Por otro lado, a pesar de que los resultados de *Likelihood Mapping* mostraron mejor poder de resolución a partir de la región de NS5A que la de NS5B, hay que destacar que la región seleccionada de NS5B es considerablemente más pequeña comprendiendo un 62% menos de nucleótidos analizados.

En el caso de las muestras analizadas en esta tesis hay que destacar que la genotipificación/subtipificación establecida en este trabajo difirió en algunos casos de la asignación realizada previamente por la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas. Cuando se analizó la asignación previa de los subtipos realizada por la Clínica de Gastroenterología se observó que se adjudicó una correcta asignación para un 84% de las muestras analizadas, identificando en este trabajo 5/31 subtipos con asignación discordante a la original. Este hecho es relativamente frecuente, lo que motiva la búsqueda de nuevas formas y seguras de genotipificación a nivel Nacional.

Con respecto al estudio genético realizado a nivel de las regiones NS5A y NS5B del genoma de VHC, es necesario destacar que estas regiones se encuentran contiguas en el genoma, y dado que no se detectaron incongruencias filogenéticas se puede descartar la ocurrencia de eventos de recombinación entre las mismas, no descartándose la existencia de recombinación en alguna región río arriba de NS5A.

Desde un punto de vista epidemiológico regional, es de gran interés conocer los genotipos y subtipos de las cepas circulantes de VHC. Además a nivel clínico la asignación de genotipos y subtipos confería en el pasado una gran importancia para determinar la duración del tratamiento basado en IFN y RBV, y también resultaba relevante para prever la progresión de la enfermedad y la respuesta a la terapia. Hoy en día, con la aprobación de DAAs pangenotípicos se podría pensar que conocer el genotipo carecería de importancia, sin embargo, la realidad es que estas drogas no son actualmente de uso habitual y menos en países de medianos y bajos ingresos donde este virus es endémico (Edlin et al., 2016).

Con el fin de profundizar en las relaciones evolutivas entre las cepas uruguayas y las obtenidas a nivel regional y mundial, se realizó el estudio filogenético de la región NS5A del genotipo 1a, el más prevalente en nuestro país. Estos estudios evidenciaron que las cepas uruguayas de VHC difieren filogenéticamente de las que circulan en Brasil. Además, a diferencia de las cepas brasileras las cuales agrupan en un clado separado dentro del clado 1 del subtipo 1a, las cepas uruguayas están distribuidas a lo largo de los clados mostrando un origen multidiverso que podría acompañarse a los movimientos demográficos de nuestro país. Estos resultados apoyan la noción de que Uruguay no debería basarse exclusivamente en los resultados de los reportes regionales y que los estudios a nivel país revierten de gran importancia. Lo que también aportan información clave en la elección del tipo de antiviral utilizar para poder anticipar un menor fallo terapéutico al mismo tiempo generando un ahorro económico

7.2. Análisis de sustituciones a nivel de las regiones NS5A y NS5B, que podrían influir en la respuesta al tratamiento (INF o DAAs)

Hace una década, el único tratamiento disponible para combatir al VHC consistía en la biterapia de IFN α y RBV, de hecho el uso de esta terapia “clásica” sigue en uso al día de hoy como

alternativa para los casos que no se pueda acceder al tratamiento con DAAs, especialmente en países de bajos ingresos como lo son los sistemas de salud latinoamericanos.

En Uruguay al comienzo de esta tesis la terapéutica brindada por el FNR era INF/ RBV aunque actualmente a partir de Junio de 2019 la terapia con DAAs (DCV/SOF) se encuentran disponibles para todos los pacientes, independiente del grado de fibrosis hepática. De todas formas, a pesar de las altas tasas de respuesta virológicas logradas con tratamientos basados en DAA, todavía 1-10% de los pacientes no logra eliminar la infección. Por estos motivos, tener la capacidad de predecir el pronóstico es de suma importancia para ambas estrategias terapéuticas. En este trabajo nos focalizamos en estudiar las regiones NS5A y NS5B y su relación con la respuesta a las diferentes terapias antivirales disponibles en nuestro país a lo largo del transcurso de esta tesis.

A nivel de la región NS5A, se analizó la región ISDR, región que había sido asociada previamente a la respuesta con INF. A partir de los resultados obtenidos y analizando las sustituciones en esta región se evidenció una diferencia significativa a nivel del número de sustituciones, entre los pacientes no respondedores y pacientes no tratados. Se pudo evidenciar una correlación entre un menor número de cambios AA y la resistencia al tratamiento con la biterapia clásica (INF/RBV). Estos resultados apoyan la teoría que la región del ISDR tiene capacidad pronostica pese a que a nivel mundial esto sigue despertando controversia (Gale et al., 1997; Lusida et al., 2001). Cabe destacar que si se analiza las sustituciones a lo largo de la región NS5A completa, no se observa diferencia significativa entre muestras que no fueron tratadas con la biterapia con respecto a los no-respondedores al tratamiento. Destacando aún más la diferencia significativa observada para ambos grupos a nivel de la región ISDR.

Como mencionamos anteriormente, el advenimiento de las nuevas terapias con DAAs constituye una de los grandes hitos en el manejo de pacientes infectados con VHC, logrando la cura en más del 90% de los pacientes. En este contexto las investigaciones se han focalizado en la pre-existencia y emergencia de sustituciones de resistencia que puedan hacer peligrar la efectividad de este tipo de tratamiento.

La presencia de RASs que confieren resistencia a los inhibidores de DAAs ha sido ampliamente reportada tanto en pacientes *naïve* como en pacientes recaedores en Europa y Asia. (Brandão et al., 2018; Cento et al., 2017; Fridell et al., 2011; Kozuka et al., 2018; Paolucci et al., 2013; Sun et

al., 2012). En cambio, a nivel de Sudamérica existe poca bibliografía relacionada a RASs a DAAs en pacientes *naïve* a estos tratamientos, salvo por reportes de Brasil y recientemente de Argentina. Además, cada país presentaba un perfil filogenético con un patrón de RASs distintos (Malta et al., 2017; Trinks et al., 2017; Peres-da-Silva et al., 2015). Hasta el momento no se disponía de datos sobre la frecuencia y tipo de RAS circulantes en Uruguay, por lo que este trabajo buscó estudiar la frecuencia y el perfil de RASs en NS5A y NS5B circulantes a partir de muestras de pacientes infectados con VHC *naïve* a DAAs. La falta de estudios en Uruguay en relación a la pre-existencia de RASs podría llegar a conducir a que nuestro perfil de resistencia debería parecerse a los patrones de los países vecinos, como lo son en Brasil y Argentina.

Los resultados de este estudio indican la presencia de RASs a inhibidores de NS5A en dos cepas de VHC provenientes de pacientes *naïve* al tratamiento, ambas con la sustitución a nivel del aminoácido L31. Por un lado la sustitución L31M, confiere resistencia a DCV, LDV y EBV en los subtipos 1a y 1b, mientras que la sustitución L31V solo lo hace a DCV en ambos subtipos, a LDV en subtipo 1b y a EBV en subtipo 1a (Wyles et al., 2017). Es importante destacar que la presencia del tipo de RASs para NS5A varía dependiendo la región geográfica de origen de las cepas. Tal es el caso de la sustitución L31M que fue encontrada en 2.2% de los pacientes infectados con el genotipo 1a en Europa y en el 4,1% en Oceanía (Zeuzem et al., 2017).

Por otro lado, no encontramos la presencia de las sustituciones M28T/V, Q30R/H o Y93H, la cuales habían sido previamente reportadas en Brasil (Malta et al., 2017; Peres-da-Silva et al., 2015). Con respecto a Argentina el último estudio reporta que la RAS más frecuente es la L31M (7.5%) para ambos subtipos, en una frecuencia similar a la encontrada en este trabajo. Sin embargo ellos reportan además la presencia de las RASs H58R e Y93H (Martínez et al., 2019), no reportadas en este estudio.

En América del Sur, la presencia de RASs a nivel de NS5A se encuentra entre un 6% y un 25% de los individuos estudiados (Bartels et al., 2013; Sarrazin, 2016; S. Zeuzem et al., 2017). Nuestros resultados se encuentran en ese rango evidenciándose la presencia de RAS en NS5A en el 8% de los pacientes estudiados.

Con respecto a las RAPs en NS5A se identificaron en un 9% de las muestras analizadas: 2 H58P y 1 K24Q. Dichas sustituciones ya se han reportadas en diversos artículos pero en frecuencias mucho mayores (Götte et al., 2016; Lin et al., 2005).

Con respecto a NS5B, análisis globales (sin incluir a Sudamérica), revelan que las sustituciones de resistencia a nivel de NS5B son infrecuentes (Noble et al., 2017; Sede et al., 2015) (Welzel et al., 2017). Sin embargo, este trabajo muestra la presencia de RAS en 6/26 pacientes *naïve* al tratamiento (23.1%). Las sustituciones encontradas en este trabajo fueron la sustitución C451R (en dos pacientes) y la S556G (en otros 2 pacientes). Ambas RASs han sido asociadas a resistencia a DSV en genotipos 1a y 1b (Kati et al., 2015), Además 1 paciente presentó la sustitución A421V asociada a resistencia a BCV (Kim et al., 2016). Este perfil de RASs halladas en las cepas uruguayas contrasta con las halladas en Brasil, donde se describió la presencia de V321A, A421G, M414V, Y448H, L159F y C316N, ninguna de las cuales fue identificada en este estudio, con excepción de la RAS A421V (Noble et al., 2017). Por otro lado en argentina no reportan las RASs encontradas en este trabajo mientras que si reportan RASs en las posiciones L159F y C316N (Martínez et al., 2019).

Es importante destacar que la gran mayoría de las sustituciones encontradas a nivel de NS5B que *a priori* no generan resistencia, se localizan lejanas al sitio de acción de los DAAs, lo que podría estar indicando que las mismas no juegan un rol en la resistencia a la terapia con este tipo de DAAs. Sin embargo se encontraron 5 sustituciones que parecen localizar cercanas a sustituciones ya reportadas como resistentes. Estudios más profundos son necesarios para poder establecer realmente el potencial resistente de estas sustituciones. Poder mapear las sustituciones podría representar un método muy sencillo para pre-seleccionar sustituciones interesantes previo a su evaluación en estudios *in vitro* o *in vivo* en busca de nuevas RASs. Asimismo se encontró únicamente la RAP A421V (en 2 pacientes genotipo 1b) sustitución que ya se ha reportado que genera resistencia en BCV pero en el genotipo 1a (Kim et al., 2016).

De igual forma el presente estudio complementa un estudio anterior realizado por nuestro laboratorio donde se describe por primera vez la circulación de RASs a inhibidores de NS3 en Uruguay (Echeverría et al., 2016) y pretende aportar información de relevancia a fin de contribuir a la selección de la terapia más efectivas.

En suma, se evidenció un patrón diferente en el perfil de RASs tanto para NS5A como de NS5B con respecto al perfil reportado en la región (Brasil y Argentina). Incluso, para el caso de NS5A, es concordante con los resultados obtenidos en los estudios filogenéticos donde se observa claramente que muchas de las cepas uruguayas mostraron el poco parentesco con las cepas brasileras (fig. 11).

La presencia de RAS en NS5A y/o NS5B influiría en el resultado final del tratamiento y la detección de estas sustituciones pre-existentes antes del tratamiento podría jugar un rol en el régimen del tratamiento a utilizar. Sin embargo, algunos autores marcan que la presencia de RASs en la secuencia consenso en NS5B no estaría teniendo un impacto en la respuesta virológica (Peiffer et al., 2018; Fourati et al., 2015). De todas formas el impacto de las RASs sobre la respuesta a la terapia con DAAs puede ser aminorado por el uso en combinación con otros DAAs para distintas proteínas, ya sea modificando la extensión de los tratamientos o incluso agregando RBV (Sorbo et al., 2018).

7.3. Estudio de variantes minoritarias de la cuasiespecie viral por secuenciación profunda

La falla al tratamiento con DAAs ha sido asociada, en parte, con la selección de RASs durante el tratamiento, pero también con la pre-existencia de RASs basales en personas que aún no han sido tratadas (Brandão et al., 2018). De todas formas, ciertos pacientes que no presentaban RASs en las secuencias consensos, podrían presentar distintos tiempos de respuesta al tratamiento e incluso no responder al tratamiento y esto podría ser debido a la presencia de variantes en proporciones minoritarias (Perales et al., 2018). La característica de circular como cuasiespecie viral dada la naturaleza del genoma del virus (ARN), lleva a que las RASs puedan encontrarse en proporciones minoritarias y ser enmascaradas por la población mayoritaria.

La secuenciación de Sanger ha sido el método estándar en el análisis de secuencias, tanto para la clínica como para la ciencia básica, sin embargo los métodos de secuenciación profunda han tomado importancia dado que resultan en una enorme cantidad de información y nos permiten tener una visión más global de la cuasiespecie viral. Estas técnicas de secuenciación han sido importantes en el área de la virología y permitieron el descubrimiento de nuevos virus (Lipkin et al., 2015), análisis más profundos de epidemiología molecular (Redd et al., 2013) y patogénesis,

así como también han contribuido a explicar mecanismos mediante los cuales los virus pueden escapar de las presiones inmunológicas del hospedero y antivirales (Domingo et al., 1997).

Para realizar una óptima secuenciación profunda se precisa de una estricta y rigurosa técnica y planificación, que van desde la correcta elaboración de las librerías hasta el posterior análisis bioinformático. En cuanto a la elaboración de las librerías, fue realizado con éxito ya que se obtuvo resultados de calidad que comprendieron un rendimiento de más del 70% del total de bases secuenciadas con una calidad de $\geq Q30$. Un punto crucial, antes de comenzar la secuenciación propiamente dicha, es realizar un filtrado de *reads* que pudiesen interferir en el análisis, es por esto que tan solo se seleccionaron aquellos que superaban un valor de calidad preestablecido Q mayor a 30. La cantidad de *reads* filtrados que mapearon con las regiones de NS5A y NS5B, fue en promedio de 45%. Los *reads* que no mapearon con las regiones de NS5A y NS5B correspondieron a *reads* mapeados para las regiones NS3 e IRES, regiones que fueron incluidas en este mismo ensayo y analizadas en el marco de la tesis de Doctorado de otro miembro del laboratorio (Echeverría, 2019).

La cantidad de *reads* mapeados fue de aproximadamente 1.200.000, número que fue similar para ambas regiones estudiadas (NS5A y NS5B), aunque se aprecia una mayor cobertura para la región NS5B. Algo a destacar sobre las gráficas de cobertura, es que presentaron una forma de “M” y según las posiciones de estos sitios, son sitios de menor cobertura que puede deberse a regiones específicas con alto o muy bajo contenido en los nucleótidos GC (Chen et al., 2013).

A partir de los resultados de la secuenciación masiva, se reconstruyeron las secuencias consenso de cada una de las muestras, las cuales fue comparadas con la secuencias consenso obtenidas por secuenciación de Sanger. Estos análisis mostraron en todas las muestras y regiones estudiadas, una similaridad nucleotídica de aproximadamente un 98% y una similiaridad aminoacídica de un 99% entre la secuencia consenso derivada de masiva y la derivada de Sanger. Estos resultados muestran que la secuenciación profunda sirve tanto para la búsqueda de variantes minoritarias como también para determinar la secuencia mayoritaria. Incluso, a pesar de que ambos resultados de secuenciación partieron del mismo producto de PCR, la técnica de secuenciación profunda mostró un mayor alcance en los largos de las secuencias mostrando que esta técnica posee una mayor sensibilidad.

La susceptibilidad a las drogas antivirales ha sido tradicionalmente analizada por la detección de mutaciones mediante secuenciación Sanger (Gibson et al., 2014), pero desafortunadamente este tipo de secuenciación tan solo es capaz de detectar variantes que se encuentren presentes por encima del 15-20% dentro de la cuasiespecie viral. Sin embargo, con la utilización de secuenciación profunda se pueden detectar variantes que se encuentren en proporciones tan bajas como 0.1-1.0% de la población viral (minoritarias). De hecho, esta técnica se ha estado utilizando desde hace unos años para analizar la variabilidad intracuasiespecie en pacientes infectados con VHC (Martró et al., 2016; Bartolini et al., 2013; Beerenwinkel et al., 2012).

En el presente trabajo se identificaron varias sustituciones de resistencia en una proporción entre 0,1-.01% para todas las muestras analizadas indistintamente de haber sido o no tratados con DAAs. Esto sugeriría que estas RASs ya se encuentran presentes en la mayoría de las cuasiespecies y por lo tanto podrían emerger como población mayoritaria ante un cuello de botella. Sin embargo, algunas de estas variantes (en particular las de la región NS5B) presentan bajo *fitness* viral por lo que su frecuencia tendería a restablecerse una vez desaparezca la presión selectiva. Como se mencionó anteriormente, ya se han reportado trabajos de secuenciación profunda para la búsqueda de RASs en las regiones genómicas de la NS3, NS5A y NS5B, pero de todas formas la únicas RASs que parecen tener un mayor peso en la elección y duración del tratamiento son las presentes en NS5A (Chung et al., 2018).

7.3.2 Estudio de Caso Clínico

Es importante destacar que los resultados de secuenciación masiva, además de la detección de RASs como variantes minoritarias de 11 muestras, nos permitieron el estudio de un caso particular donde los resultados a nivel de masiva se integraron con datos clínicos. La elaboración de este estudio significó una gran colaboración con el personal de la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas proporcionando de una forma más unificada la relación de los estudios moleculares con la selección terapéutica.

En el presente estudio de caso, se identificaron por secuenciación masiva RASs pre y post tratamiento con LDV/SOF+RBV, tanto en NS5A y NS5B. Es importante destacar que estas RASs no habían sido identificadas por el método de secuenciación convencional.

En cuanto a NS5A se encontró una RASs como variante de baja frecuencia previo al tratamiento y el resto como variantes minoritarias. Para NS5A se hubiese esperado que todas las RASs identificadas antes del tratamiento aumentarían una vez terminada de ejercer la presión selectiva del LDV, ya que existen reportes que a nivel de la secuencia consenso que las variantes que son resistentes a inhibidores en NS5A persisten por hasta un año (Pawlotsky, 2016). De todas formas, la muestra se obtuvieron 12 semanas después de “fin del tratamiento”, tiempo suficiente para que las variantes resistentes sean sustituidas por variantes con mejor *fitness replicativo*, conociendo la elevada tasa de evolución que presenta el VHC (Geller et al., 2016). Pese a que las RAS H58D y A92T disminuyeron en frecuencia, se observó un aumento en las sustituciones Y93C/S y la emergencia de la Y93F.

En relación a lo observado para NS5B se evidenció, posterior al tratamiento, un aumento sustancial en todas las RASs para SOF, inclusive la emergencia de sustituciones que no se detectaban antes del tratamiento. Por otro lado, se vio un aumento en las RASs para DSV pese a que este DAA no fue utilizado como tratamiento.

Debido a que el paciente fue no respondedor a esta terapia (LDV/SOF) y en base a los resultados obtenidos por secuenciación Sanger en el Laboratorio de Virología Molecular en el marco de esta tesis de Maestría es esperable que se someta a un tratamiento con VEL/SOF. En relación a esto, es importante destacar que los resultados de masiva mostraron la presencia de RASs asociadas a resistencia a VEL, la Y93C (0.34%) y la Y93F (0.14%). Asimismo, el paciente presentó también las siguientes RASs: E237G (0.28%), V321A (0.41%), L159F (0.2%) y C316F (0.18%) con reportada resistencia para SOF (Feld et al., 2015; Perales et al., 2018).

Existe una continua controversia a nivel clínico en relación a las variantes que se encuentren por debajo del 15% y si estas tienen que ser consideradas como una guía en el tratamiento. Sin embargo es importante destacar que tener a disposición una metodología de secuenciación que posibilite la búsqueda de variantes minoritarias otorga una nueva herramienta a la hora de la elección de un tratamiento más dirigido.

7.4.1. Desarrollar una estrategia experimental que nos permita caracterizar posibles sustituciones de resistencia a ledipasvir a nivel de NS5A y producción de VHC en cultivo celular

Es importante destacar que el abordaje en cultivo celular del VHC es relativamente nuevo y el desarrollo de un sistema de cultivo celular para la replicación del VHC fue indispensable para el estudio del ciclo viral y para el descubrimiento de drogas antivirales. Los primeros estudios sobre este virus fueron llevados a cabo en hepatocitos de humano o chimpancé pero con poca reproducibilidad, viabilidad y baja eficiencia. Estas infecciones de hepatocitos primarios podían prolongarse hasta 4 meses (Taylor et al., 2013). El primer sistema de replicación *in vitro* fue desarrollado recién en 1999 en células hepáticas Huh7 (Lohmann et al., 1999) pero este sistema fue útil solo para estudiar la replicación del genoma viral. En el 2003 se reportó el primer sistema *in vitro* para el estudio de la entrada y neutralización, basado en pseudopartículas de VHC funcional a través de un retrovirus con las glicoproteínas de VHC (Bartosch et al., 2003). Finalmente, el primer clon infeccioso de VHC cultivado *in vitro*, que puede realizar el ciclo viral completo en células, fue desarrollado en el 2005 a partir de la cepa JFH1 de genotipo 2a proveniente de un paciente con hepatitis fulminante (Wakita et al., 2005). Este virus podía replicar en células Huh7 a partir de ARN y podía generar partículas infectivas. Este sistema permitió por primera vez estudiar al VHC en todos los pasos del ciclo viral.

Con el objetivo de comenzar a implementar estas nuevas estrategias experimentales se procedió a estudiar el posible rol de la sustitución K24Q en la generación de resistencia a LDV, a partir de clones subgenómicos de VHC con la mutación de interés.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que se generaron exitosamente los vectores subgenómicos con los cambios de interés en la región NS5A, lo cual evidencia que el protocolo de mutagénesis empleado funcionó perfectamente. Aunque se generaron los ARNs subgenómicos sin aparentes problemas, no fue posible estudiar el perfil de resistencia al LDV de la sustitución K24Q ya que no se logró realizar la selección de células resistentes a G418. Esto pudo deberse a diferentes causas. Entre ellas, que el ARN producido o la transfección no hayan sido óptimos. Sin embargo, esto parecería no coincidir con los resultados obtenidos para el vector infeccioso de genoma completo para el cual la IVT y la purificación de ARN se realizaron en paralelo, y las condiciones de transfección empleadas fueron también probadas con el vector subgenómico. Otra opción, aunque menos factible, podría ser que el vector haya adquirido mutaciones que pudiesen

afectar la permanencia del ARN en la célula ya interfiriendo con el gen de resistencia al antibiótico o alguna mutación deletérea en la polimerasa viral que le impida perpetuarse en las células. A partir de la secuenciación realizada no es posible confirmar esta última hipótesis ya que solo se secuenció una región específica de NS5A con el fin de verificar la presencia de las mutaciones generadas. Finalmente, la falla en este experimento puede corresponderse con un protocolo de selección de clones estables que deba ser optimizado, ya sea en el tamaño de pocillos empleados, la cantidad de células sembradas, los subcultivos realizados, la frecuencia y dosis de selección con antibiótico, entre otros.

Por otro lado, también se propuso comenzar a trabajar con vectores capaz de generar viriones infectivos de VHC, sistema que difiere del vector subgenómico ya que este solo podría ser capaz de codificar las proteínas no estructurales NS3, NS5A y NS5B. A partir de los primeros ensayos con el vector infeccioso J6/JFH se observó que el ARN producido a partir de éste es capaz de generar efecto citopático en células Huh7.5 induciendo la muerte y lisis celular pero de forma lenta, lo cual concuerda con varios artículos que han trabajado con este clon infeccioso (C. T. Jones et al., 2010; Taylor, 2013). Este ciclo viral lento dificultó significativamente el ensayo de titulación viral propuesto. Es por esta razón que en otros trabajos, para titular los viriones de VHC se realiza el ensayo de TCID₅₀ a través de una inmuno-tinción con anticuerpos específicos anti-VHC, los cuales no pudimos adquirir hasta el momento (Neveu et al., 2012; Scheel & Rice, 2013).

Por otra parte, el diseño de *primers* para amplificar la región de Okamoto para el genotipo 2a fue exitoso y permitió la puesta a punto de condiciones de *One-step* PCR. Con ésta se logró verificar la presencia de ARN viral en los sobrenadantes de cultivos transfectados. Es importante recordar que esos *primers* amplifican una región de tan sólo 136pb, y fueron diseñados para ser empleados en un futuro, para una Real Time PCR que permita cuantificar las moléculas de ARN viral, como un abordaje inicial y sencillo para caracterizar la producción viral en cultivo celular. De todos modos, es claro que mediante este protocolo no estaríamos cuantificando viriones infectivos sino genomas virales, los cuales no todos son viables.

Finalmente, cabe resaltar, que estos ensayos fueron pioneros en nuestro laboratorio para dar inicio a nuevos experimentos sobre la replicación de este virus en cultivo celular.

8. Conclusiones

En el marco de esta tesis se continuó con la cooperación y se estrecharon los vínculos con la clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas y el Laboratorio de Virología Molecular.

A partir de las muestras de los pacientes infectados crónicamente con VHC se pudo determinar que las regiones de NS5A y NS5B presentan buena señal filogenética para la realización de los estudios correspondientes, detectando a su vez una asignación incorrecta de subtipo previamente establecido por la Clínica de Gastroenterología por parte de los servicios tercerizados. Se determinó que de las muestras que presentaron el genotipo 1 fueron en su mayoría del genotipo 1a (64.5%) y el resto del subtipo 1b correlacionándose con la distribución epidemiológica de América Latina. Sin embargo, las cepas uruguayas del VHC exhiben una gran variabilidad que difiere de la exhibida por las cepas brasileras.

A lo largo de los años el tratamiento del VHC ha mejorado sustancialmente. El antiguo tratamiento consistía en terapia basada en IFN mientras que la terapia actual se basa en DAAs. En esta tesis valoramos las posibles dificultades que existen a la hora de aplicar tratamientos efectivos en pacientes infectados crónicamente con VHC. En relación al tratamiento clásico basado en IFN evidenciamos una diferencia significativa en la región del ISDR en NS5A, que podría constituir un posible predictor de falla terapéutica. Por otra parte, respecto al tratamiento con DAAs, que puede verse afectado por la presencia de RASs, determinamos que en pacientes portadores de VHC existe la circulación de RASs en NS5A y NS5B en pacientes *naïve* al tratamiento. Con respecto a esto, se puede decir que este trabajo es el primero en nuestro país y uno de los primeros en Sudamérica en reportar la circulación de RASs en NS5A y NS5B. A su vez, creemos que este abordaje resulta de gran importancia a la hora de identificar pacientes con menor probabilidad de responder a la terapia con DAAs, y así poder realizar el redireccionamiento del tratamiento de forma oportuna.

Se cree que la presencia de variantes minoritarias de RASs podría influir en el pronóstico del tratamiento y en esta tesis realizamos el estudio mediante secuenciación profunda de las muestras de pacientes infectados con VHC, logrando establecer la presencia de estas en cepas sin sustituciones de resistencia en sus secuencias consenso, independientemente de haber sido tratados o no con DAAs. Asimismo se realizó un estudio de caso que permitió aunar nuestros

resultados con información clínica obtenida de un paciente antes y después de recibir tratamiento con DAAs aportando a colegas del área clínica una posible alternativa a su fallo en el tratamiento y guiando en tiempo real posibles alternativas terapéuticas.

El cambio sustancial en el desarrollo de nuevos antivirales se debió gracias a los nuevos sistemas de cultivo celular y al estudio de características que influyen en la resistencia a los mismos. Siguiendo con esta línea es que desarrollamos la puesta a punto de un sistema para introducir mutaciones específicas en un vector subgenómico del VHC con el fin de estudiar el perfil de sensibilidad de sustituciones en NS5A al inhibidor LDV. Finalmente, como otro hito de este trabajo destacamos la realización por primera vez en Uruguay de la producción del VHC en cultivo celular, desplegando de esta forma un abanico de nuevas oportunidades de desarrollo en el área de la virología experimental que acompañaría al estudio clásico de virología evolutiva.

9. Perspectivas

Gracias a la colaboración realizada con la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas hemos decidido expandir este vínculo y continuar con la transferencia de información en cuanto a la genotipificación de nuevas secuencias de VHC y de posibles búsquedas de sustituciones de resistencia en pacientes *naïve* y complicados a la hora del tratamiento con DAAs.

A partir del aporte de resultados que nos brindó el estudio mediante secuenciación profunda, es de nuestro interés continuar con el Caso Clínico, el cual será complementado mediante la integración de datos clínicos proporcionados por los médicos de la clínica que trabajaron en este proyecto. Asimismo, resaltar mi condición de estudiante avanzado de medicina, y la oportunidad que esta tesis representó para el desarrollo e integración de ambas formaciones académicas que persigo. A estos resultados obtenidos también se adicionarán los resultados obtenidos de secuenciación profunda de la Dra. Natalia Echeverría en el marco de su tesis de doctorado con el fin de unificar los datos y concluir en un trabajo multidisciplinario.

Finalmente, como mencione anteriormente el hito de haber conseguido la generación de progenie viral infectante en células en cultivo abre un espectro de nuevos objetivos. Por un lado continuar con la optimización del sistema para poder culminar con el objetivo propuesto de evaluar en cultivo diferentes mutaciones con potencial de resistencia. Mientras que por otro lado, en marco del proyecto: CSIC I+D "En busca del talón de Aquiles traduccional del virus de la Hepatitis C", actualmente estamos trabajando en la realización de experimentos preliminares para comenzar con la producción de virus con mutaciones específicas a nivel del sitio interno de unión al ribosoma.

10. Bibliografia

- AASLD/IDSA HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. (2018). *Clinical Liver Disease*. <https://doi.org/10.1002/cld.791>
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., ... Davison, A. J. (2017). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3358-5>
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Ech, M., ... Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Alazard-Dany, N., Denolly, S., Boson, B., & Cosset, F. L. (2019). Overview of hcv life cycle with a special focus on current and possible future antiviral targets. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v11010030>
- Allain, J.-P., Dong, Y., Vandamme, A.-M., Moulton, V., & Salemi, M. (2000). Evolutionary Rate and Genetic Drift of Hepatitis C Virus Are Not Correlated with the Host Immune Response: Studies of Infected Donor-Recipient Clusters. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.6.2541-2549.2000>
- Alter, M., Kuhnert, W., & Finelli, L. (2003). Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus. *MMWR Recomm Rep.*;52(RR-3):
- Andrews, S. (2015). FASTQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. *Babraham Institute*.
- Arafa, N., El Hoseiny, M., Rekacewicz, C., Bakr, I., El-Kafrawy, S., El Daly, M., ... Fontanet, A. (2005). Changing pattern of hepatitis C virus spread in rural areas of Egypt. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.03.021>
- Asselah, T. (2014). Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV infection: An oral combination therapy with high antiviral efficacy. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.042>
- Bagaglio, S., Uberti-Foppa, C., Olgiati, A., Messina, E., Hasson, H., Ferri, C., & Morsica, G. (2018). Natural polymorphisms in the resistance associated sites of HCV-G1 NS5B domain and correlation with geographic origin of HCV isolates. *Virology Journal*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1054-z>
- Bartels, D. J., Sullivan, J. C., Zhang, E. Z., Tigges, A. M., Dorrian, J. L., De Meyer, S., ... Kieffer, T. L. (2013). Hepatitis C Virus Variants with Decreased Sensitivity to Direct-Acting Antivirals (DAAs) Were Rarely Observed in DAA-Naive Patients prior to Treatment. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.02294-12>
- Bartolini, B., Giombini, E., Zaccaro, P., Selleri, M., Rozera, G., Abbate, I., ... Capobianchi, M. R. (2013). Extent of HCV NS3 protease variability and resistance-associated mutations assessed by next generation sequencing in HCV monoinfected and HIV/HCV coinfecting patients. *Virus Research*. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.08.001>
- Bartosch, B., Dubuisson, J., & Cosset, F. L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20021756>
- Bedossa, P. (1994). Intraobserver and Interobserver Variations in Liver Biopsy Interpretation in Patients with Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.1840200104>
- Beerenwinkel, N., Günthard, H. F., Roth, V., & Metzner, K. J. (2012). Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00329>
- Benova, L., Mohamoud, Y. A., Calvert, C., & Abu-Raddad, L. J. (2014). Vertical transmission of hepatitis C virus: Systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu447>
- Bentham, M. J., Foster, T. L., McCormick, C., & Griffin, S. (2013). Mutations in hepatitis C virus p7 reduce both the egress and infectivity of assembled particles via impaired proton channel function. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/vir.0.054338-0>

- Bokharaei-Salim, F., Keyvani, H., Salehi-Vaziri, M., Sadeghi, F., Monavari, S. H., Mehrnoush, L., & Alavian, S. M. (2014). Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus subtype 1b and response to peg-IFN α -2a/RBV combination therapy in Azerbaijani patients. *Archives of Virology*, 159(11), 2893–2899. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2133-0>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borgia, S. M., Hedskog, C., Parhy, B., Hyland, R. H., Stamm, L. M., Brainard, D. M., ... Shafran, S. D. (2018). Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: Expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy401>
- Bourlière, M., Gordon, S. C., Flamm, S. L., Cooper, C. L., Ramji, A., Tong, M., ... Zeuzem, S. (2017). Sofosbuvir, velpatasvir, and voxilaprevir for previously treated HCV infection. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal613512>
- Bowen, D. G., & Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature04079>
- Brandão, R., Marcelino, R., Gonçalves, F., Diogo, I., Carvalho, A., Cabanas, J., ... Gomes, P. (2018). Characterization of NS5A and NS5B resistance-associated substitutions from genotype 1 hepatitis C virus infected patients in a Portuguese cohort. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v10050223>
- Bukh, J., Purcell, R. H., & Miller, R. H. (1992). Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.187>
- Burbelo, P. D., Dubovi, E. J., Simmonds, P., Medina, J. L., Henriquez, J. A., Mishra, N., ... Kapoor, A. (2012). Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00250-12>
- Buti, M. (2008). ¿Es el tipo de interferón pegilado importante en la respuesta al tratamiento de la hepatitis crónica C? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1157/13116747>
- Castells, M., Bello, G., Ifrán, S., Pereyra, S., Boschi, S., Uriarte, R., ... Colina, R. (2015). Epidemic history of major genotypes of hepatitis C virus in Uruguay. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.021>
- Cento, V., Nguyen, T. H. T., Di Carlo, D., Biliotti, E., Gianserra, L., Lenci, I., ... Ceccherini-Silberstein, F. (2017). Improvement of ALT decay kinetics by all-oral HCV treatment: Role of NS5A inhibitors and differences with IFN-based regimens. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177352>
- Charlton, M., Everson, G. T., Flamm, S. L., Kumar, P., Landis, C., Brown, R. S., ... Afdhal, N. (2015). Ledipasvir and Sofosbuvir Plus Ribavirin for Treatment of HCV Infection in Patients with Advanced Liver Disease. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.010>
- Chen, T., Ding, E. L., Seage III, G. R., & Kim, A. Y. (2009). Meta-Analysis: Increased Mortality Associated with Hepatitis C in HIV-Infected Persons Is Unrelated to HIV Disease Progression. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/644771>
- Chen, Y. C., Liu, T., Yu, C. H., Chiang, T. Y., & Hwang, C. C. (2013). Effects of GC Bias in Next-Generation-Sequencing Data on De Novo Genome Assembly. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062856>
- Cheng, G., Tian, Y., Doehle, B., Peng, B., Corsa, A., Lee, Y. J., ... Delaney, W. (2016). In vitro antiviral activity and resistance profile characterization of the hepatitis C virus NS5A inhibitor ledipasvir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.02524-15>
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359–362. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523562>
- Chung, R. T., Ghany, M. G., Kim, A. Y., Marks, K. M., Naggie, S., Vargas, H. E., ... Workowski, K. A. (2018). Hepatitis C guidance 2018 update: Aasld-idsa recommendations for testing, managing, and treating Hepatitis C Virus infection. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy585>

- De Francesco, R., & Migliaccio, G. (2005). Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature04080>
- División Epidemiológica, M. (2017). Boletín epidemiológico Mayo 2017, , División Epidemiología Dirección General de la Salud, Ministerio de Salud, 1–35. Retrieved from [http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Boletín epidemiológico Mayo 2017.7 corregido por Quian _1_.pdf](http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Boletín%20epidemiológico%20Mayo%202017.7%20corregido%20por%20Quian_1_.pdf)
- Domingo, E., Menéndez-Arias, L., & Holland, J. J. (1997). RNA virus fitness. *Reviews in Medical Virology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1654\(199707\)7:2<87::AID-RMV188>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1654(199707)7:2<87::AID-RMV188>3.0.CO;2-0)
- Dubuisson, J., & Cosset, F. L. (2014). Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle - An update. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.031>
- Echeverría, N. (2019). *Variabilidad genética , resistencia al tratamiento y eficiencia traduccional del Virus de la Hepatitis C: Caracterización de factores virales y del hospedero Variabilidad genética , resistencia al tratamiento y eficiencia traduccional del Virus de la Hep.*
- Echeverría, N., Betancour, G., Gámbaro, F., Hernández, N., López, P., Chiodi, D., ... Moreno, P. (2016). Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: Their relevance for developing countries. *Virus Research*. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.07.008>
- Edlin, B. R. (2016). Access to treatment for hepatitis C virus infection: time to put patients first. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30005-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30005-6)
- Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., ... Sato, C. (1996). Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM199601113340203>
- Esposito, I., Marciano, S., Haddad, L., Galdame, O., Franco, A., Gadano, A., ... Trinks, J. (2019). Prevalence and factors related to natural resistance-associated substitutions to direct-acting antivirals in patients with genotype 1 hepatitis C virus infection. *Viruses*, *11*(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/v11010003>
- Feld, J. J., Jacobson, I. M., Hode, C., Asselah, T., Ruane, P. J., Gruener, N., ... Zeuzem, S. (2015). Sofosbuvir and velpatasvir for hcv genotype 1, 2, 4, 5, and 6 infection. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512610>
- Ferenci, P. (2015). Treatment of hepatitis C in difficult-to-treat patients. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.53>
- Fondo Nacional de Recursos. (2019). Tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis c., 1–25. Retrieved from http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n_trat_hepatitisc.pdf
- Fourati, S., & Pawlotsky, J. M. (2015). Virologic tools for HCV drug resistance testing. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v7122941>
- Fridell, R. A., Wang, C., Sun, J. H., O'Boyle, D. R., Nower, P., Valera, L., ... Gao, M. (2011). Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in Humans: In Vitro and In Vivo Correlations. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.24594>
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Rajender Reddy, K., Smith, C., Marinos, G., Gonçalves, F. L., ... Yu, J. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020047>
- Gale, M. J., Korth, M. J., & Katze, M. G. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: A potential mechanism of interferon resistance. In *Clinical and Diagnostic Virology*. [https://doi.org/10.1016/S0928-0197\(98\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0928-0197(98)00034-8)
- Gale, M. J., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., ... Katze, M. G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8493>
- Galli, A., & Bukh, J. (2014). Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C

- virus. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.005>
- Geller, R., Estada, Ú., Peris, J. B., Andreu, I., Bou, J. V., Garijo, R., ... Sanjuán, R. (2016). Highly heterogeneous mutation rates in the hepatitis C virus genome. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.45>
- Gentles, R. G., Sheriff, S., Beno, B. R., Wan, C., Kish, K., Ding, M., ... Kadow, J. F. (2011). Investigation of the mode of binding of a novel series of N-benzyl-4-heteroaryl-1-(phenylsulfonyl)piperazine-2-carboxamides to the hepatitis C virus polymerase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.011>
- Ghasemi, F. (2018). Development of Preventive Vaccines for Hepatitis C Virus E1/E2 Protein. *Iranian Journal of Pathology*, 13(02), 113–124. <https://doi.org/10.30699/ijp.13.2.113>
- Gibson, R. M., Schmotzer, C. L., & Quiñones-Mateu, M. E. (2014). Next-generation sequencing to help monitor patients infected with HIV: Ready for clinical use? *Current Infectious Disease Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11908-014-0401-5>
- Götte, M., & Feld, J. J. (2016). Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: Structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.60>
- Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K., & Razavi, H. (2014). Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.027>
- Guillou-guillemette, H. Le, Vallet, S., Payan, C., Pivert, A., & Goudeau, A. (2007). Genetic diversity of the hepatitis C virus and antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*.
- Hardy, R. W., Marcotrigiano, J., Blight, K. J., Majors, J. E., & Rice, C. M. (2003). Hepatitis C Virus RNA Synthesis in a Cell-Free System Isolated from Replicon-Containing Hepatoma Cells. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.2029-2037.2003>
- Honda, M., Beard, M. R., Ping, L. H., & Lemon, S. M. (1999). A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *Journal of Virology*.
- Hoofnagle, J. H. (2013). LiverTox. In *Drug-Induced Liver Disease*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387817-5.00040-6>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1987). Virus interference. I. The interferon. *Journal of Interferon Research*. <https://doi.org/10.1089/jir.1987.7.429>
- J.Cantaloube, P., G., H., A., P., B., P., D. M., & X., D. L. (2005). Genotype distribution and molecular epidemiology of hepatitis C virus in blood donors from Southeast France. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Jaeckel, E., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Santantonio, T., Mayer, J., Zankel, M., ... Manns, M. P. (2001). Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011232>
- Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., ... Hodges, M. R. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209026>
- Jones, B. R., Howe, A. Y. M., Harrigan, P. R., & Joy, J. B. (2018). The global origins of resistance-associated variants in the non-structural proteins 5A and 5B of the hepatitis C virus. *Virus Evolution*. <https://doi.org/10.1093/ve/vex041>
- Jones, C. T., Catanese, M. T., Law, L. M. J., Khetani, S. R., Syder, A. J., Ploss, A., ... Rice, C. M. (2010). Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1604>
- Kalaghatgi, P., Maria Sikorski, A., Knops, E., Rupp, D., Sierra, S., Heger, E., ... Lengauer, T. (2016).

- Geno2pheno[HCV] - A web-based interpretation system to support hepatitis c treatment decisions in the era of direct-acting antiviral agents. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155869>
- Kati, W., Koev, G., Irvin, M., Beyer, J., Liu, Y., Krishnan, P., ... Collins, C. (2015). In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis c virus polymerase inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.04619-14>
- Kazuhiko Hayashi. (2009). Prevalence of Hepatitis C Virus Genotype 1a in Japan and Correlation of Mutations in the NS5A Region and Single-Nucleotide Polymorphism of Interleukin-28B With the Response to Combination Therapy With Pegylated-Interferon-Alpha 2b and Ribavirin, *1304*(March), 1298–1304. <https://doi.org/10.1002/jmv>
- Kim, S., Han, K., & Ahn, S. H. (2016). Hepatitis C Virus and Antiviral Drug Resistance. *Gut and Liver*, *10*(6), 890–895. <https://doi.org/10.5009/gnl15573>
- Kinge, C. N. W., Espiritu, C., Prabdial-Sing, N., Sithebe, N. P., Saeed, M., & Rice, C. M. (2014). Hepatitis C virus genotype 5a subgenomic replicons for evaluation of direct-acting antiviral agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.03534-14>
- Kowdley, K. V., Gordon, S. C., Reddy, K. R., Rossaro, L., Bernstein, D. E., Lawitz, E., ... Fried, M. W. (2014). Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402355>
- Kozuka, R., Hai, H., Motoyama, H., Hagihara, A., Fujii, H., Uchida-Kobayashi, S., ... Tamori, A. (2018). The presence of multiple NS5A RASs is associated with the outcome of sofosbuvir and ledipasvir therapy in NS5A inhibitor-naïve patients with chronic HCV genotype 1b infection in a real-world cohort. *Journal of Viral Hepatitis*. <https://doi.org/10.1111/jvh.12850>
- Kuiken, C., Yusim, K., Boykin, L., & Richardson, R. (2005). The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth485>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lahser, F. C., Bystol, K., Curry, S., McMonagle, P., Xia, E., Ingravallo, P., ... Asante-Appiah, E. (2016). The combination of grazoprevir, a hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor, and elbasvir, an HCV NS5A inhibitor, demonstrates a high genetic barrier to resistance in HCV genotype 1a replicons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(5), 2954–2964. <https://doi.org/10.1128/AAC.00051-16>
- Law, M. (2019). Hepatitis C Virus Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1911, *1911*, 500. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8976-8>
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Lemon, S. M., McKeating, J. A., Pietschmann, T., Frick, D. N., Glenn, J. S., Tellinghuisen, T. L., ... Furman, P. A. (2010). Development of novel therapies for hepatitis C. *Antiviral Research*, *86*(1), 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.02.003>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, H., & Wren, J. (2014). Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu356>
- Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G., & Chen, Z. J. (2005). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508531102>
- Lin, C., Gates, C. A., Rao, B. G., Brennan, D. L., Fulghum, J. R., Luong, Y. P., ... Kwong, A. D. (2005). In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(44), 36784–36791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506462200>

- Lingala, S., & Ghany, M. G. (2015). Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterology Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.07.003>
- Lipkin, W. I., & Anthony, S. J. (2015). Virus hunting. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.006>
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L., & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.110>
- Lontok, E., Harrington, P., Howe, A., Kieffer, T., Lennerstrand, J., Lenz, O., ... Miller, V. (2015). Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.27934>
- Lusida, M. I., Nagano-Fujii, M., Nidom, C. M., Soetjipto, Handajani, R., Fujita, T., ... Hotta, H. (2001). Correlation between mutations in the interferon sensitivity-determining region of NS5A protein and viral load of hepatitis C virus subtypes 1b, 1c, and 2a. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3858-3864.2001>
- Macdonald, A., Crowder, K., Street, A., McCormick, C., & Harris, M. (2004). The hepatitis C virus NS5A protein blinds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19691-0>
- Magiorkinis, G., Magiorkinis, E., Paraskevis, D., Ho, S. Y. W., Shapiro, B., Pybus, O. G., ... Hatzakis, A. (2009). The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: A phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Medicine*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000198>
- Malta, F., Gaspareto, K. V., Lisboa-Neto, G., Carrilho, F. J., Mendes-Correa, M. C., & Pinho, J. R. R. (2017). Prevalence of naturally occurring NS5A resistance-associated substitutions in patients infected with hepatitis C virus subtype 1a, 1b, and 3a, co-infected or not with HIV in Brazil. *BMC Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2817-7>
- Manns, M. P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J.-M., Razavi, H., Terrault, N., & Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17006. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.6>
- Martínez, A. P., García, G., Ridruejo, E., Culasso, A. C., Pérez, P. S., Pereson, M. J., ... Di Lello, F. A. (2019). Hepatitis C virus genotype 1 infection: Prevalence of NS5A and NS5B resistance-associated substitutions in naïve patients from Argentina. *Journal of Medical Virology*, 91(11), 1970–1978. <https://doi.org/10.1002/jmv.25536>
- Martró, E., Saludes, V., Salvatierra, K., Rech, G., Sumoy, L., Artacho, A., ... López-Labrador, F. X. (2016). Assessment of the Illumina MiSeq massively parallel sequencing platform for simultaneous analysis of Hepatitis C virus resistance to all direct-acting antivirals combination regimes. *Journal of Clinical Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.08.028>
- McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., ... Albrecht, J. K. (1998). Interferon Alfa-2b Alone or in Combination with Ribavirin as Initial Treatment for Chronic Hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, 339(21), 1485–1492. <https://doi.org/10.1056/NEJM199811193392101>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., ... DePristo, M. A. (2010). The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Messina, J. P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G. S., Pybus, O. G., & Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.27259>
- Moradpour, D., & Penin, F. (2013). Hepatitis C virus proteins: From structure to function. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7-5>
- Moreno, P., Alvarez, M., Lopez, L., Moratorio, G., Casane, D., Castells, M., ... Colina, R. (2009). Evidence of recombination in Hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virology Journal*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-203>
- Morozov, V. A., & Lagaye, S. (2018). Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World Journal of Hepatology*, 10(2), 186–212. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i2.186>

- Murakami, K., Ishii, K., Ishihara, Y., Yoshizaki, S., Tanaka, K., Gotoh, Y., ... Suzuki, T. (2006). Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.038>
- Nakabayashi, H., Miyano, K., Sato, J., Yamane, T., & Taketa, K. (1982). Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*.
- Nakamoto, S., Imazeki, F., Arai, M., Yasui, S., Nakamura, M., Haga, Y., ... Yokosuka, O. (2015). Effect of hepatitis C virus genotype 1b core and NS5A mutations on response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 21177–21190. <https://doi.org/10.3390/ijms160921177>
- Negro, F., Forton, D., Craxì, A., Sulkowski, M. S., Feld, J. J., & Manns, M. P. (2015). Extrahepatic Morbidity and Mortality of Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.035>
- Némoz, B., Roger, L., Leroy, V., Poveda, J. D., Morand, P., & Larrat, S. (2018). Evaluation of the cobas® GT hepatitis C virus genotyping assay in G1-6 viruses including low viral loads and LiPA failures. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194396>
- Neukam, K., Martínez, A. P., Culasso, A. C. A., Ridruejo, E., García, G., & Di Lello, F. A. (2017). NS3 genomic sequencing and phylogenetic analysis as alternative to a commercially available assay to reliably determine hepatitis C virus subtypes 1a and 1b. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182193>
- Neveu, G., Barouch-Bentov, R., Ziv-Av, A., Gerber, D., Jacob, Y., & Einav, S. (2012). Identification and Targeting of an Interaction between a Tyrosine Motif within Hepatitis C Virus Core Protein and AP2M1 Essential for Viral Assembly. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002845>
- Noble, C. F., Malta, F., Lisboa-Neto, G., Gomes-Gouvêa, M. S., Leite, A. G. B., de Castro, V. F. D., ... Pinho, J. R. R. (2017). Natural occurrence of NS5B inhibitor resistance-associated variants in Brazilian patients infected with HCV or HCV and HIV. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3094-2>
- Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K., & Hotta, H. (2006). Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81701-0>
- Ohno, T., Mizokami, M., Wu, R. R., Saleh, M. G., Ohba, K. I., Orito, E., ... Lau, J. Y. N. (1997). New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Okamoto, H., Sugiyama, Y., Okada, S., Kurai, K., Akahane, Y., Sugai, Y., ... Mayumi, M. (1992). Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: Application to clinical surveys and tracing infectious sources. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-3-673>
- Okonechnikov, K., Conesa, A., & García-Alcalde, F. (2016). Qualimap 2: Advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv566>
- Paolucci, S., Fiorina, L., Mariani, B., Gulminetti, R., Novati, S., Barbarini, G., ... Baldanti, F. (2013). Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virology Journal*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-355>
- Pascu, M., Martus, P., Höhne, M., Wiedenmann, B., Hopf, U., Schreier, E., & Berg, T. (2004). Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: A meta-analysis focused on geographical differences. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.031336>
- Pawlotsky, J. M. (2006). Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_9
- Pawlotsky, Jean Michel. (2003). Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clinics in Liver Disease*, *7*, 45–66.
- Pawlotsky, Jean Michel. (2016). Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.003>

- Pawlotsky, Jean Michel, Negro, F., Aghemo, A., Berenguer, M., Dalgard, O., Dusheiko, G., ... Wedemeyer, H. (2018). EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>
- Peiffer, K. H., Vermehren, J., Kuhnhen, L., Susser, S., Dietz, J., Finkelmeier, F., ... Sarrazin, C. (2018). Interferon-free treatment choice according to baseline RASs leads to high SVR rates in HCV genotype 1 infected patients. *Journal of Infection and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.02.008>
- Perales, C., Chen, Q., Soria, M. E., Gregori, J., Garcia-Cehic, D., Nieto-Aponte, L., ... Quer, J. (2018). Baseline hepatitis C virus resistance-associated substitutions present at frequencies lower than 15% may be clinically significant. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2207–2210. <https://doi.org/10.2147/IDR.S172226>
- Peres-da-Silva, A., De Almeida, A. J., & Lampe, E. (2015). NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naive patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/dku462>
- Pickett, B. E., Sadat, E. L., Zhang, Y., Noronha, J. M., Squires, R. B., Hunt, V., ... Scheuermann, R. H. (2012). ViPR: An open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr859>
- Poynard, T., Colombo, M., Bruix, J., Schiff, E., Terg, R., Flamm, S., ... Albrecht, J. (2009). Peginterferon alfa-2b and Ribavirin: Effective in Patients With Hepatitis C Who Failed Interferon alfa/Ribavirin Therapy. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.039>
- Pybus, O. G., Charleston, M. A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E. C., & Harvey, P. H. (2001). The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1058321>
- Redd, A. D., Mullis, C. E., Manucci, J., Tobian, A. A. R., Selig, E. J., Laeyendecker, O., ... Quinn, T. C. (2013). Identification of HIV Superinfection in Seroconcordant Couples in Rakai, Uganda, by Use of Next-Generation Deep Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/jcm.01273-13>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Rehermann, B. (2013). Pathogenesis of chronic viral hepatitis: Differential roles of T cells and NK cells. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3251>
- S., B., C., E., I., G., J., G., K., M., H., N., ... H., R. (2016). Polaris observatory-global prevalence of hepatitis C. *Hepatology*.
- Sarrazin, C. (2016). *The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice*. *Journal of Hepatology* (Vol. 64). European Association for the Study of the Liver. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.09.011>
- Scheel, T. K. H., & Rice, C. M. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3248>
- Schmidt, H. A., Strimmer, K., Vingron, M., & Von Haeseler, A. (2002). TREE-PUZZLE: Maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.3.502>
- Sede, M. M., Laufer, N. L., & Quarleri, J. (2015). Previous failure of interferon-based therapy does not alter the frequency of HCV NS3 protease or NS5B polymerase inhibitor resistance-associated variants: longitudinal analysis in HCV/HIV co-infected patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.011>
- Shivkumar, S., Peeling, R., Jafari, Y., Joseph, L., & Pai, N. P. (2012). Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-8-201210160-00006>
- Sibley, A., Han, K. H., Abourached, A., Lesmana, L. A., Makara, M., Jafri, W., ... Schmelzer, J. D. (2015). The present and future disease burden of hepatitis C virus infections with today's treatment paradigm - Volume 3. *Journal of Viral Hepatitis*. <https://doi.org/10.1111/jvh.12476>

- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., ... Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.20819>
- Smith, D. B., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., ... Simmonds, P. (2016). Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000612>
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T., & Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>
- Sorbo, M. C., Cento, V., Di Maio, V. C., Howe, A. Y. M., Garcia, F., Perno, C. F., & Ceccherini-Silberstein, F. (2018). Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resistance Updates*. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2018.01.004>
- Strimmer, K., von Haeseler, A., & Salemi, M. (2012). Genetic distances and nucleotide substitution models. In *The Phylogenetic Handbook*. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511819049.006>
- Sulkowski, M. S., Gardiner, D. F., Rodriguez-Torres, M., Reddy, K. R., Hassanein, T., Jacobson, I., ... Grasela, D. M. (2014). Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306218>
- Sun, J. H., O'Boyle, D. R., Zhang, Y., Wang, C., Nower, P., Valera, L., ... Gao, M. (2012). Impact of a baseline polymorphism on the emergence of resistance to the hepatitis C virus nonstructural protein 5a replication complex inhibitor, BMS-790052. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.25581>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Taylor, D. R. (2013). Evolution of cell culture systems for HCV. *Antiviral Therapy*. <https://doi.org/10.3851/IMP2593>
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Toni, L. S., Garcia, A. M., Jeffrey, D. A., Jiang, X., Stauffer, B. L., Miyamoto, S. D., & Sucharov, C. C. (2018). Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>
- Trinks, J., Caputo, M., Hulaniuk, M. L., Corach, D., & Flichman, D. (2017). Hepatitis C virus pharmacogenomics in latin american populations: Implications in the era of direct-acting antivirals. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S125452>
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., ... Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1268>
- Wang, B., Yang, X., Lou, Li, W., Zhu, Y., Ge, X. Y., Zhang, L. B., ... Shi, Z. L. (2017). Detection and genome characterization of four novel bat hepadnaviruses and a hepevirus in China. *Virology Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0706-8>
- Wang, L. S., D'Souza, L. S., & Jacobson, I. M. (2016). Hepatitis C—A clinical review. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.24554>
- Welzel, T. M., Bhardwaj, N., Hedskog, C., Chodavarapu, K., Camus, G., McNally, J., ... Agarwal, K. (2017). Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.014>
- WHO. (2018). *World Health Statistics*.

- Wolffram, I., Petroff, D., Bätz, O., Jedrysiak, K., Kramer, J., Tenckhoff, H., ... Wiegand, J. (2015). Prevalence of elevated ALT values, HBsAg, and anti-HCV in the primary care setting and evaluation of guideline defined hepatitis risk scenarios. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.01.011>
- Woodroffe, R., & Ginsberg, J. R. (1998). Edge effects and the extinction of populations inside protected areas. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.280.5372.2126>
- World Health Organization. (2018). Progress Report on Access To Hepatitis C Treatment Focus on Overcoming Barriers in Low-and Middle-Income Countries, (March), 68. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260445/1/WHO-CDS-HIV-18.4-eng.pdf?ua=1>
- Worobey, M., & Holmes, E. C. (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2535>
- Wyles, D. L. (2017). Resistance to DAAs: When to Look and When It Matters. *Current HIV/AIDS Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11904-017-0369-5>
- Xia, X. (2013). DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst064>
- Xia, X., & Lemey, P. (2012). Assessing substitution saturation with DAMBE. In *The Phylogenetic Handbook*. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511819049.022>
- Yamada, G., Iino, S., Okuno, T., Omata, M., Kiyosawa, K., Kumada, H., ... Sakai, T. (2008). Virological response in patients with hepatitis C virus genotype 1b and a high viral load: Impact of peginterferon- α -2a plus ribavirin dose reductions and host-related factors. *Clinical Drug Investigation*. <https://doi.org/10.2165/00044011-200828010-00002>
- Yamane, D., McGivern, D. R., Masaki, T., & Lemon, S. M. (2013). Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7-11>
- Zeisel, M. B., Felmlee, D. J., & Baumert, T. F. (2013). Hepatitis C virus entry. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7-4>
- Zeuzem, S., Mizokami, M., Pianko, S., Mangia, A., Han, K. H., Martin, R., ... Sulkowski, M. (2017). NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.007>
- Zeuzem, S. V. F. (2000). NUMB ER 23 PEGINTERFERON ALFA-2a IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012073432301>

11. Material suplementario

11.1. Resultados suplementarios de sección 1

Tabla suplementaria S1. Características demográficas de los pacientes *naïve* al tratamiento

Código de Muestra	Genotipo	VIH	Edad	sexo	Carga viral ^a (log ₁₀)	Tratamiento
2	1a	-	53	F	3.75	-
3	1a	(+)	45	F	4.30	-
4	1b	-	71	F	ND	-
6	1a	-	45	M	7.00	PR
7	1b	-	37	F	8.00	-
8	1a	-	51	F	ND	-
10	1a	-	34	F	4.85	PR
12	1a	-	45	M	6.65	-
13	1b	-	64	M	4.70	PR
15	1b	-	30	M	ND	-
16	1b	-	63	F	6.29	-
17	1a	-	39	M	ND	-
18	1a	-	47	M	ND	PR
20	1a	-	40	M	6.00	PR
21	1a	-	32	M	6.01	-
22	1b	-	49	M	6.24	PR
23	1a	-	47	F	ND	-
24	1b	-	36	M	ND	-
25	1a	-	48	M	6.90	PR
26	1b	-	59	M	ND	IR
27	1a	-	54	M	6.30	PR
28	1a	-	42	M	4.36	PR
29	1a	-	64	F	5.10	PR
30	1a	-	37	M	5.30	-
31	1a	-	45	M	ND	PR
32	1a	-	ND	M	5.10	-
33	1a	(+)	51	M	ND	PR
34	1b	-	58	F	5.6	PR
36	1b	-	ND	F	5.3	-
37	1a	ND	ND	M	6.90	PR
39	1b	ND	ND	M	6.49	PR

^aLogaritmo en base 10 de la carga viral (CV) determinada en unidades internacionales por mililitro (UI/mL). CV al momento de toma de muestra.

F: sexo femenino; M: sexo masculino; ND: no se realizó; PR: IFN α -peg y RBV

El genotipado y subtipado en dicha tabla corresponde al realizado por el centro asistencial.

ND: no determinado.

Tabla suplementaria S2. Secuencias de las regiones NS5A y NS5B usadas como representativas para cada genotipo para realizar los análisis filogenéticos.

Genotipo	País de aislamiento	N° de acceso de GenBank	Genotipo	País de aislamiento	N° de acceso de GenBank
	Brazil	EF032886		United States	AY956467
	United States	DQ889291		India	GQ275355
1a	United States	EU155310	3a	United Kingdom	GQ356203
	Japan	D10749		China	HQ912953
	China	EU155346		Germany	X76918
	Germany	KC155254	3b	Japan	D49374
	Japan	AB249644	3k	Indonesia	D63821
	China	D10934	4a	Japan	AB795432
	Taiwan	DQ071885	4b	Portugal	FJ025856
	Ireland	AB154178		United States	DQ418786
	Germany	AJ238800	4d	Spain	DQ516083
	China	EU155375		China	KC844045
1b	France	JN120912	4f	France	EF589161
	Turkey	AF483269	4v	United Kingdom	JX227959
	United States	EF407458	4o	United Kingdom	JX227977
	United States	EF407472		South Africa	AF064490
	United States	EU155258		ZA	KC767829
	United States	KC439495	5a	China	KC844046
	Brazil	EF032891		United Kingdom	Y13184
	Brazil	EF032893	5	-	KF373567
	United States	KF700370	6k	China	AY878651
2a	Japan	AB047640	6d	Vietnam	D84263
	Denmark	KC967476	6o	Canada	EF424627
2b	United States	DQ430817		United States	EF424628
2d	Canada	JF735114	6l	Vietnam	JX183556
2f	China	KC844050	6t	Vietnam	EF632070
2i	France	KC197230	6n	Thailand	EU246938
2j	Venezuela	HM777358	6s	Canada	EU408329
2q	Spain	FN666428	7a	Canada	EF108306

Tabla suplementaria S3. Secuencias de la región NS5A subtipo 1a empleadas para revelar las relaciones evolutivas entre cepas uruguayas, brasileras y del resto del mundo.

País de aislamiento	N° de acceso del GenBank			
Australia	FJ932275	FJ932344	FJ932287	FJ932356
	FJ932278	FJ932346	FJ932292	FJ932358
	FJ932280	FJ932349	FJ932293	
Brazil	EU309615	EU309595	EU309654	EU309665
	EU309622	EU309588	EU309645	EU309663
	EU309628	EU309591	EU309609	EU309661
	EU309616	EU309599	EU309601	EU309672
	EU309619	EU309590	EU309606	EU309671
	EU309617	EU309597	EU309605	EU309668
	EU309624	EU309596	EU309611	EU309670
	EU309626	EU309650	EU309608	KJ747874
	EU309623	EU309644	EU309604	KJ747875
	EU309618	EU309649	EU309614	KJ747852
	EU309620	EU309658	EU309610	KJ747885
	EU309625	EU309646	EU309600	KJ747886
	EU309627	EU309648	EU309612	KJ747888
	EU309631	EU309652	EU309602	KJ747889
	EU309633	EU309656	EU309613	KJ747890
	EU309641	EU309653	EU309607	KJ747891
	EU309637	EU309651	EU309662	KJ747895
	EU309643	EU309647	EU309673	KJ747878
	EU309639	EU309655	EU309660	GQ848736
	EU309636	EU309657	EU309666	KJ747892
	EU309632	EU309587	EU309592	EU309593
	EU309629	EU309589	EU309598	EU309594
	EU309630	EU309635	EU309642	EU309586
	EU309640			
Canada	KX621485			
Germany	EU256107	EU687194	EU862832	JQ914273
	EU482831	EU687195	EU862833	KC155254
	EU482832	EU862823	EU862834	EU155378
	EU482873	EU862824	JQ914271	EU155379
	EU155380			
Japan	D10749			
Switzerland	EU255927	EU255956	EU255959	EU256071

	EU255929	EU255957	EU256069	EU256072
	EU255930	EU255958	EU256070	EU862836
	EU255945	EU255949	EU255954	EU255952
	EU255947	EU255951	EU255955	EU255953
Thailand	GQ913865	HM042041	HM042044	HM042047
	GQ913867	HM042042	HM042045	HM042048
	HM042038	HM042043	HM042046	HM042049
	HM042039	HM042040		
United Kingdom	AM600914	AM600924	AM600927	AM600936
	AM600916	AM600926	AM600929	AM600938
	AM600920	AM600934	AM600930	AM600942
	AM600922	AM600955		
United States	JX472013	JX472005	FJ958636	FJ958700
	KX621532	JX472007	FJ958634	FJ959020
	FJ896342	FJ896309	FJ958648	FJ959027
	EU239713	JX463563	FJ958785	KX621543
	EU255998	JX463558	FJ958791	KX621526
	EU155286	FJ896326	FJ958784	JX112543
	EU256019	EU256040	FJ958380	JX112550
	FJ896357	EU260396	FJ958499	JX112576
	FJ896366	EU155239	FJ958885	JX112590
	KX621536	EU256014	FJ958882	KP668763
	FJ896292	EU256039	FJ958707	KP668776
	JX463556	EU155310	FJ896327	KY189861
	EU482834	KP668727	JX463540	KY189856
	EU529679	KP668717	KP668733	NC004102
	EU255999	EU256032	KP668720	EU482871
	EU155294	EU482865	FJ896340	EU155297
	EU255997	EU255938		

Tabla Suplementaria S4. Test de saturación de sustituciones en NS5A subtipo 1a de mundo.

NS5A 1a mundial n° de secuencias	Symmetrical topology			Asymmetrical topology	
	Iss	Iss.cSym	P	Iss.cAsym	P
4	0,124	0,825	0	0,793	0
8	0,129	0,795	0	0,691	0
16	0,137	0,778	0	0,585	0
32	0,144	0,757	0	0,458	0

Iss: índice de saturación de sustitución; Iss.c: valor crítico de Iss; p: valor p de tests de dos colas.

11.2. Resultados suplementarios de sección 2

Tabla suplementaria S5. Sustituciones aminoacídicas de la proteína NS5A no asociadas previamente a ninguna resistencia a DAAs.

	Número de residuo	Wildtype	Cambio	n	Número de residuo	Wildtype	Cambio	n
Genotipo 1a	36	F	L	11	215	G	R	3
	37	V	I	1	219	A	T	1
	37	V	M	1	219	A	E	1
	37	V	L	1	226	V	M	4
	44	R	K	7	226	V	L	10
	46	V	T	1	237	P	A	1
	46	V	A	1	241	A	G	4
	48	R	K	3	245	T/A	A	6
	50	D	E	1	245	T/A	T	2
	52	I	V	1	245	T/A	H	1
	64	T	A	2	246	N	K	1
	64	T	S	1	247	H	Y	1
	68	K	R	1	252	A	T	1
	71	T	S	1	255	I	L	2
	73	R	K	1	256	E	A	1
	78	R/G	K	11	256	E	Q	3
	78	R/G	R	9	258	N	S	1
	81	R	K	1	264	E	A	4
	85	S	N	1	266	G	K	1
	90	M/I	I	19	266	G	N	1
	105	N	S	1	267	G	D	1
	107	K/T	K	9	267	G	S	1
	107	K/T	I	1	268	N	D	1
	107	K/T	E	3	269	M	L	1
	107	K/T	T	6	272	N	A	1
	114	S	A	1	275	E	K	1
	117	E	D	1	276	V	I	1
	123	Q/R	Q	13	280	I	V	5
	123	Q/R	R	7	285	D	E	4
	126	D	E	1	288	V	A	1
131	T	S	1	289	A	T	1	
133	M/I	V	5	290	E	D	1	
135	T/A	T	15	293	E	G	1	
135	T/A	A	5	294	E	K	1	
137	N	D	3	296	I/V	I	11	
144	V	I	1	296	I/V	V	8	
152	E	Q	1	298	V	T	1	
153	L	V	1	299	P	A	1	

	153	L	I	1	305	K	R	4
	158	L	I	1	308	R	K	4
	161	F	Y	2	310	T/A	T	8
	171	D/E	E	14	310	T/A	A	9
	171	D/E	D	6	310	T/A	G	1
	174	S	T	2	311	P	A	1
	176	R	K	2	311	P	Q	4
	176	R	V	4	315	I	V	8
	181	D/E	E	10	326	L	V	2
	181	D/E	D	8	330	K	R	4
	181	D/E	A	1	331	K	R	2
	181	D/E	V	1	332	E	K	1
	183	P	L	3	335	E	N	1
	197	A	S	1	343	P	P/R	1
	211	A	V	1	348	Q/R	R	6
	213	A	T	6	349	S	T	1
	215	G	K	4	352	V	I	1
Genotipo 1b	34	V	I	5	232	S	S/C	1
	37	L/F	L	7	232	S	T	1
	37	L/F	F	3	236	A	A/E	1
	37	L/F	I	1	236	A	T	1
	44	K	R	3	237	P	L	1
	48	R	H	1	239	L	M	1
	49	G	V	1	240	K	R	1
	53	M	V	1	241	A	A/T	1
	54	Q/H	Q	2	242	T	A	1
	54	Q/H	H/L	1	244	T	A	1
	54	Q/H	H	8	245	T	A	1
	64	T	P	2	245	T	G	1
	65	G	D/G	1	246	H/R	C	2
	75	V	A	1	246	H/R	H	5
	78	K	Q	1	246	H/R	R	3
	78	K	R	6	246	H/R	C/Y	1
	79	T	S	1	252	A	I	1
	83	T	M	1	255	I	V	2
	101	S	T	3	260	L	M	1
	107	S	T	1	262	R	H	1
	108	R	K	1	268	N	D	1
	108	R	T	1	269	I	L	1
	114	A	A/T	1	270	T	I	1
	122	T	V	1	275	E	K	1
	126	D	E	1	276	N	K	1
	130	V	I/V	1	280	I	V	1

130	V	I	1	283	S	P	1
135	T	A	4	285	E/D	E	1
138	V	I	2	285	E/D	D	9
138	V	L	3	285	E/D	V	1
143	Q	Q/L	1	288	R	Q	1
145	P	P/S	1	289	A	M	1
153	V	L	2	291	E	G	1
158	L/F	L	10	292	D	G	1
160	R	R/S	1	292	D	D/Y	1
164	A	T	1	294	R	G	2
164	A	S	1	296	V	I	2
171	E/D	E	4	298	V	I	3
171	E/D	D	7	299	P	A	1
173	V	T	3	305	K	R	1
174	T	S	1	306	S	T	1
174	T	V	1	307	R	K	1
176	Q	L	2	308	K	N	1
181	Q	H	1	311	P	S	3
182	Y	F	1	311	P	A	1
183	L	P	3	313	M	L	8
183	L	V	3	315	I	V	5
187	Q	Q/L	1	326	I/L	L	10
196	V	A	1	326	I/L	V	1
197	T/A	A	1	328	S	P	4
197	T/A	S	2	330	K	K/R	1
197	T/A	T	8	330	K	R	3
198	V	I	1	331	D	N	1
199	L	V	2	335	V	T	1
205	D	D/V	1	336	P	P/H	1
208	H	Y	1	338	V	L	1
213	T	A	2	339	V	V/A	1
215	K	R	1	347	T	A	2
218	L	M	1	349	A	T	2
226	L	V	1	352	I	V	4

Tabla suplementaria S6. Sustituciones aminoacídicas de la proteína NS5B no asociadas previamente a ninguna resistencia a DAAs.

	Número de residuo	Wildtype	Cambio	n	Número de residuo	Wildtype	Cambio	n
Genotipo 1a	231	S	N	2	327	A	Q	6
	235	T	V	1	329	V	I	1
	238	A	S	1	330	Q	R	1
	246	D	A	1	335	S	S/G	1
	248	Q	E	1	335	S	N	3
	251	V	Q	1	337	R	G	1
	251	V	I	1	338	A	V	1
	251	V	M/V	1	365	S	L	1
	252	A	A/V	1	377	A	A/T	1
	262	V	I	1	377	A	T	1
	269	S	S/Stop	1	377	A	V	1
	270	R	K	3	382	T	Y	16
	272	E	Q	1	415	F	Y	1
	276	T	Y	23	421	A	V	1
	296	Y	F	1	425	L	M	1
	297	I	L	1	426	M	M/I	1
	300	Q	K	1	434	I	L	11
	300	Q	S	1	451	C	R	2
	300	Q	R	5	452	Y	R	2
	307	G	K	1	461	P	Q	1
	308	L	L/I	1	473	S	T	1
	309	Q/R	R	14	487	A	T	1
	309	Q/R	Q	11	501	R	R/S	1
	311	C	I	1	506	S	N	4
312	T	K/R	1	510	K/R	R	8	
327	A	E	1	510	K/R	K	5	
Genotipo 1b	231	N/S	N	8	403	T	T/I	1
	231	N/S	S	3	405	V	I	1
	242	A	V	1	421	A	V	2
	249	A	V	1	424	I	V	1
	252	A	V	1	426	M	L	2
	270	K	L/Stop	1	432	I	V	1
	273	N/S	C	1	434	L	Q	1
	293	L	I	1	437	E	D	1
	300	S	T	1	440	E	G	1
	300	S	A	1	444	D	E	2
	309	Q	R	1	451	C	Y	1
	316	C/Y	C	11	452	Y	H	1
	329	T	I	1	464	Q	E	4

335	S	N	3	487	S	A	1
355	Q	R	2	499	V	A	3
374	H	Y	1	514	Q	R	1
393	A	S	1	515	G	E	1
401	R	K	3				

11.3. Resultados suplementarios de sección 3

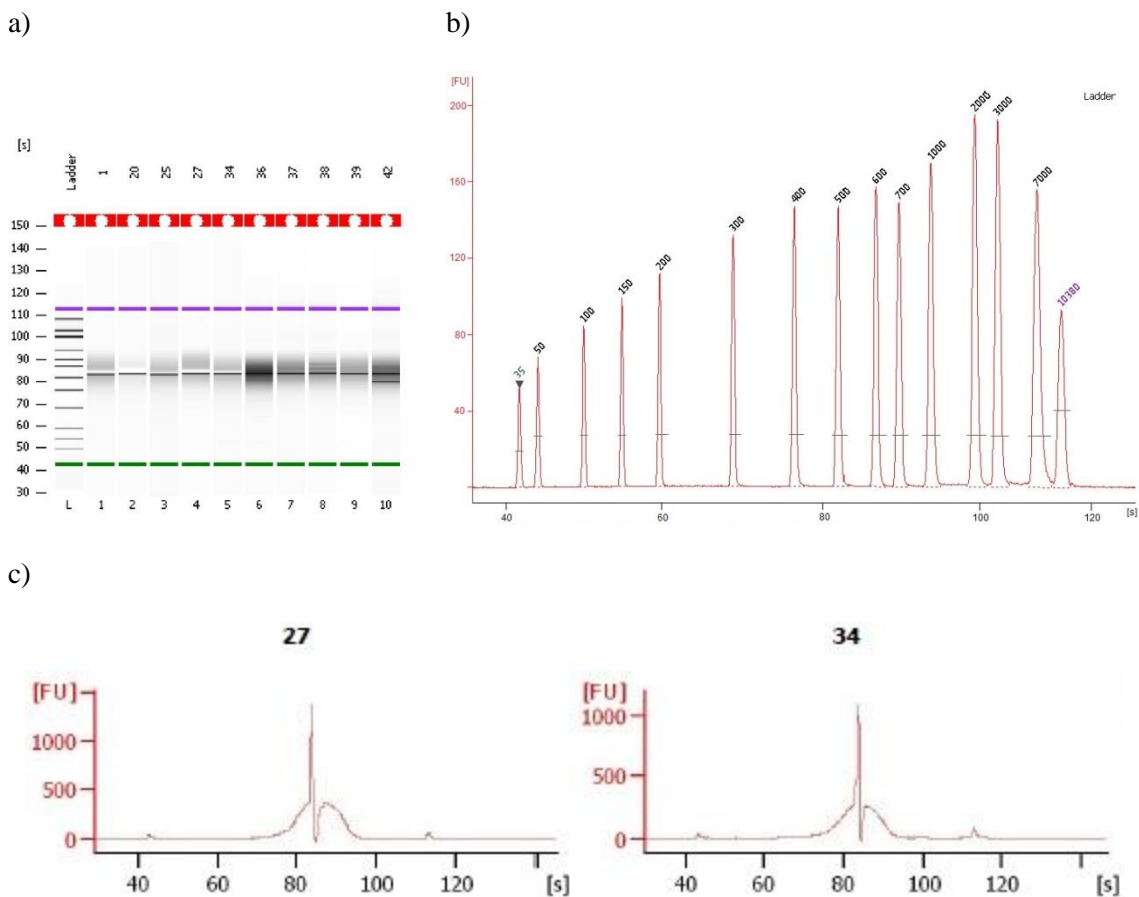


Figura suplementaria S1. Resultado de la calidad de las librerías analizado mediante Bioanalyzer. En la figura a) se observa el gel digital con las librerías correspondientes a cada muestra, así como el peso molecular (*ladder*). En b) se muestra el electroferograma del peso molecular. En c) se indican dos electroferogramas de los obtenidos, como ejemplo, donde se grafican unidades relativas de fluorescencia (FU) versus el tiempo de corrida en segundos. Comparando los tamaños relativos en b) es posible correlacionar los tamaños de las muestras. A modo de ejemplo se muestran solamente las muestras 27 y 34.

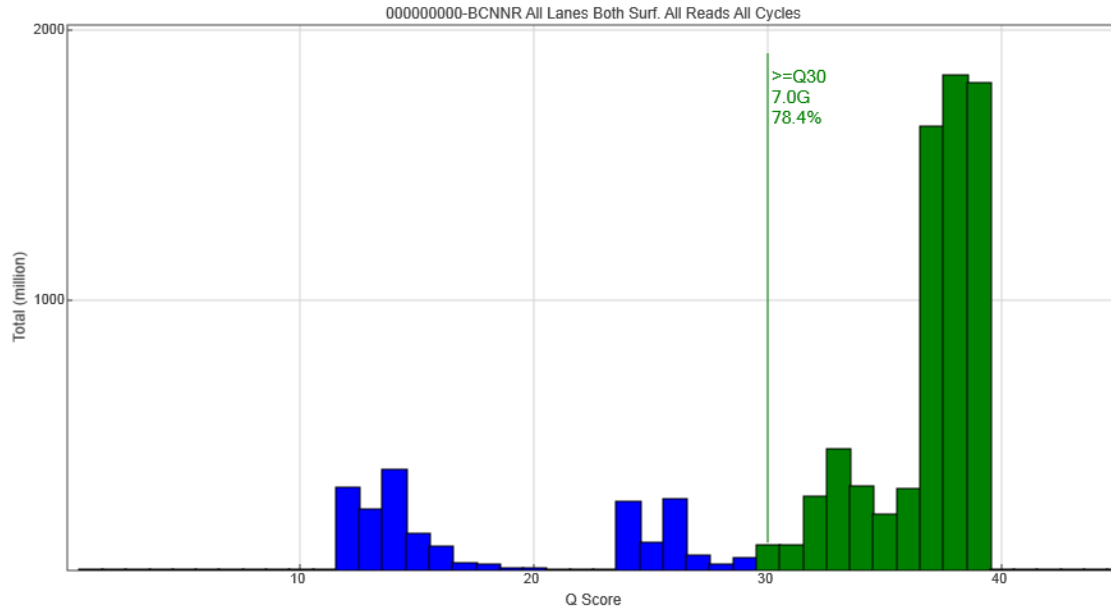


Figura suplementaria S2. Datos masivos obtenidos de la secuenciación. Calidad de las bases secuenciadas con el equipo MiSeq de Illumina. Se grafican las bases secuenciadas en función de calidad en forma del score Q. En verde se indican todas aquellas cuya calidad es $\geq Q30$, lo cual corresponde con el 78,4% de las bases secuenciadas

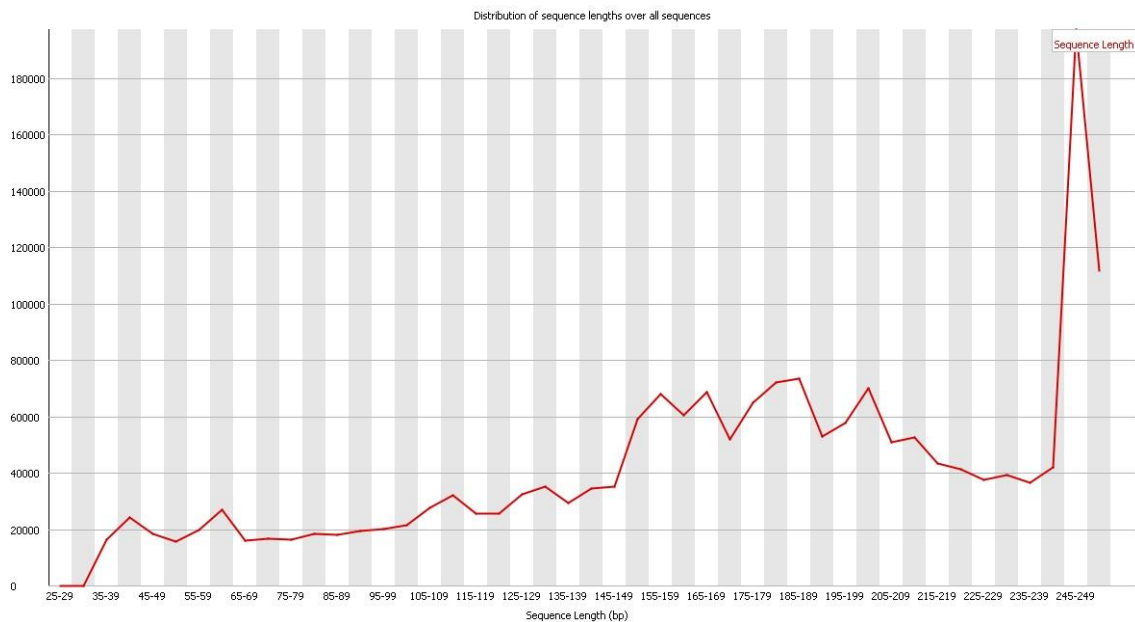


Figura suplementaria S3. Distribución del tamaño de los *reads* filtrados de la secuencia 27; la mayoría son de 245-249 pb.

11.4. Resultados suplementarios de sección 4

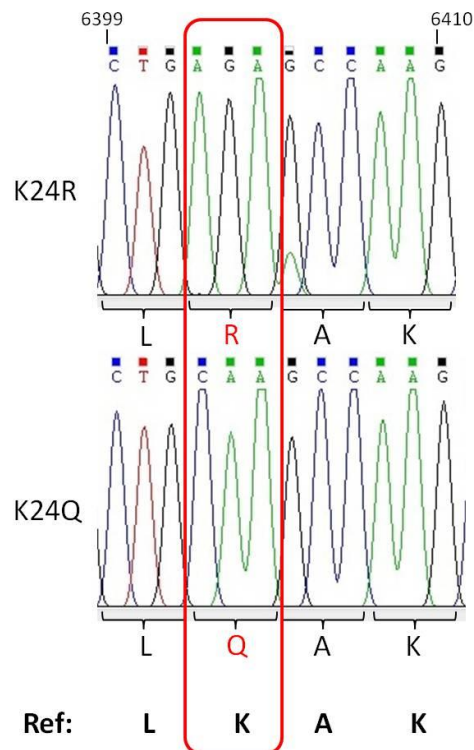


Figura Suplementaria S4. Cromatogramas obtenidos a partir de la secuenciación de un fragmento genómico correspondiente a la región de la NS5A entre 6399-6410 nt y que contiene los mutantes para generar las sustituciones K24R y K24Q (señalado con un recuadro rojo). En la región inferior se muestra los aminoácidos de referencia.

12.1 Publicaciones derivadas de esta tesis

Aldunate F, Echeverría N, Chiodi D, et al. Response to: Comment on "Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B Resistance-Associated Substitutions in Genotype 1 Uruguayan Infected Patients". *Dis Markers*. 2019;2019:2520302. Published 2019 Feb 5. doi:10.1155/2019/2520302

Aldunate F, Echeverría N, Chiodi D, et al. Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B Resistance-Associated Substitutions in Genotype 1 Uruguayan Infected Patients. *Dis Markers*. 2018;2018:2514901. Published 2018 Aug 14. doi:10.1155/2018/2514901

12.2. Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis

Aldunate F., Gámbaro F., Fajardo A., Soñora M., Cristina J. Evidence of increasing diversification of Zika virus strains isolated in the American continent. *J. Med. Virol.* 2017;89:2059–2063. doi: 10.1002/jmv.24910

Rauschert I, **Aldunate F**, Preussner J, et al. Promoter hypermethylation as a mechanism for Lamin A/C silencing in a subset of neuroblastoma cells. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175953. Published 2017 Apr 19. doi:10.1371/journal.pone.0175953