



**Variabilidad genética, resistencia al tratamiento y
eficiencia traduccional del Virus de la Hepatitis C:
Caracterización de factores virales y del hospedero**

MSc. Natalia Paola Echeverría Chagas

Doctorado en Ciencias Biológicas
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas,
Área Biología

Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

2019



Variabilidad genética, resistencia al tratamiento y eficiencia traduccional del Virus de la Hepatitis C: Caracterización de factores virales y del hospedero

MSc. Natalia Paola Echeverría Chagas

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Área Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Orientadora:

Dra. Pilar Moreno, Profesor Adjunto

Co-orientadores:

Dr. Juan Cristina, Profesor Titular

Dr. Gonzalo Moratorio, Profesor Adjunto

Laboratorio de ejecución:

Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias

Montevideo, Uruguay
2019

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dr. Juan Arbiza, Profesor Titular

Dr. Rodney Colina, Profesor Titular

Dr. Federico Di Lello, Jefe de Trabajos Prácticos

A mis padres, por siempre confiar en mi...

AGRADECIMIENTOS

Finalmente esta etapa llegó a su fin, y estoy feliz de haber aprendido tantas técnicas y de haber empezado a desarrollarme como investigadora. Este progreso no hubiera sido posible sin el apoyo y la guía de muchas personas a quienes aprovecho esta instancia para agradecer.

A Pili, mi orientadora y compañera de camino con VHC, gracias eternas por confiar en mí para llevar adelante este trabajo, por dejarme volar con mis ideas de empezar cosas nuevas, por empujarme a mejorar y a enseñarme cómo ser una investigadora independiente.

A Juan, co-orientador y jefe del LVM, le estoy agradecida por haberme abierto las puertas del laboratorio cuando aún yo trabajaba en bacterias, por haber confiado en que podía hacer ambas cosas en paralelo y por las palabras de apoyo constantes.

A Gonza, co-orientador e impulsor de cambios, gracias miles por haberme insistido a presentarme al concurso con el cual comencé a formar parte de este laboratorio, por la guía en los experimentos en los que me zambullí sin mucha experiencia y por presionar a seguir avanzando confiando en lo que se puede lograr.

A los miembros del tribunal, los Dres. Juan Arbiza, Rodney Colina y Federico Di Lello, por haber aceptado evaluar este trabajo.

A los Dres. Charles Rice y Marcelo López-Lastra, les agradezco de corazón por haberme recibido amablemente en sus laboratorios a capacitarme en diferentes técnicas, por cederme reactivos sin los cuales esta tesis hubiera quedado a medias, y por estar ahí cada vez que necesité apoyo o consejo con los resultados obtenidos. A los varios posdocs de sus laboratorios quienes estuvieron siempre más que dispuestos a ayudarme, en particular a Yingpu, a Joe y a Jenny.

A la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas, la Asociación Española y al Servicio Nacional de Sangre, por haberse embarcado en esta historia. Principalmente muchas gracias a la Dra. Nelia Hernández, la Dra. Lilia López y a Susana Boschi, por reclutar a los pacientes y por creer que esta investigación era necesaria y podía aportar conocimientos nuevos sobre VHC en Uruguay.

A mis compañeros bioinformáticos, Tincho y Diego, porque sin ellos los análisis de datos de secuenciación masiva hubieran sido un terreno demasiado escabroso para abordar sola, y a Valentina Colistro, por sus valiosos aportes en ayudarme a comprender un poco mejor la bioestadística, gracias!

A toda la familia del LVM, de antes y de ahora, amigos y compañeros a lo largo de los años, todos quienes me han ayudado, con palabras de aliento, codo a codo en la mesada, colaborando con análisis y discusión de resultados, o simplemente estando ahí cuando era necesario un hombro o un oído. Vicky, Sabri, Alvarito, Tincho, Gaby, Fabi1, Fabi2, Rodri, Diego... Gracias enormes a cada uno de ustedes!!! En especial a Fabi1, mi gran mano derecha con los ensayos traducionales!

Gracias a mis amigas de la vida: Pau, Tefi, Andy, Vicky, Sabri, Vane, Wan, Naza y Luli, la mayoría de las cuales no entienden exactamente qué es lo que hago, pero que a pesar de ello siempre están para levantar ánimos y acompañar, y que entienden que los tiempos de la ciencia son raros, sobre todo en los momentos de escritura, en los cuales estuve desaparecida.


Finalmente, un enorme agradecimiento a toda mi familia, principalmente a mis padres, mis hermanos y mi esposo, todos quienes forman uno de los pilares más importantes de mi vida. Sin su apoyo y su amor, el camino hacia esta tesis hubiera sido muy difícil. El acompañarme en mis decisiones de carrera sin cuestionamientos, así como el cariño en momentos difíciles como los de los últimos tiempos, es algo muy importante para mí y fue fundamental para poder terminar esta tesis en los tiempos autoestipulados. En particular mis padres y Hugo, el amor de mi vida, han sabido hacerlo a la perfección. Gracias de todo corazón!

Como biólogos mecanicistas, esperamos que al comprender cómo funciona el virus a nivel molecular, podamos predecir con mayor precisión cómo evolucionará.

Jennifer Doudna

RESUMEN

El virus de la hepatitis C (VHC) infecta al 1% de la población mundial y en el 60-80% de los casos progresa a una infección crónica, que incluso puede desencadenar hepatocarcinoma. El tratamiento con interferón- α pegilado y ribavirina es ineficaz debido, en gran medida, a la alta variabilidad genética de VHC. Sin embargo, actualmente existen antivirales de acción directa (DAAs) muy efectivos, que actúan a nivel de proteínas específicas del virus, como la proteasa NS3. El objetivo general de esta tesis consistió en estudiar diferentes factores virales y del hospedero que influyen la respuesta a la terapia en pacientes crónicamente infectados. Por otra parte, se evaluó la eficiencia traduccional de variantes naturales del IRES de VHC (región que dirige el inicio de la traducción) con el fin de identificar aquellas traduccionalmente atenuadas. Mediante abordajes de biología molecular, celular y bioinformática se genotipificaron los aislamientos de VHC circulantes en nuestro país y los polimorfismos de sitio único (SNP) en la cercanía del gen *IFN- λ -4* del hospedero, se caracterizaron las sustituciones de resistencia (RASs) en la región NS3 y las variantes del IRES, y se analizó la influencia de miR-122 en la traducción viral. Los resultados muestran que el subtipo 1a es el más frecuente (58,2%) en nuestro estudio. En cuanto a los factores que afectan el curso de la infección y la respuesta a la terapia, aunque no se evidenció asociación entre los SNPs del gen *IFN- λ -4* y la respuesta a la terapia, sí se observó que los genotipos desfavorables de rs12979860 son más frecuentes en la población infectada con VHC que en la población control. A nivel de la región NS3, se detectaron RASs en el 34,4% de los pacientes *naïve* a DAAs infectados con VHC de genotipo 1. Sorprendentemente, por análisis de secuenciación profunda se encontró un bajo número de RASs como variantes minoritarias y de baja frecuencia. Los ensayos de eficiencia traduccional revelaron la existencia de variantes deficientes traduccionalmente, tanto a nivel de las secuencias mayoritarias de los IRES, como en subpoblaciones dentro de las cuasiespecies virales, las cuales podrían representar potenciales candidatos para estrategias vacunales basadas en atenuación viral. Finalmente, aunque miR-122 se une directamente al genoma de VHC, no se evidenció que la interacción con el



IRES viral llevara a cambios a nivel de la eficiencia traduccional. Esta tesis permitió profundizar sobre aspectos poco explorados sobre VHC en Uruguay, tales como el análisis de diferentes factores del hospedero y del virus, asociados a la respuesta a la terapia. También contribuyó con conocimientos básicos sobre la biología traduccional viral dando el puntapié para comenzar con estudios funcionales con clones infecciosos de este virus. Como perspectivas se plantea la realización de ensayos de eficiencia traduccional *ex vivo*, tanto a partir de construcciones bicistrónicas como de clones infecciosos, a modo de confirmar los resultados obtenidos *in vitro*, y finalmente el estudio de la interacción IRES-subunidad ribosomal 40S mediante ensayos biofísicos.

Palabras clave: IFN- λ -4, NS3, RASs, IRES, eficiencia traduccional

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) infects 1% of the world population and in 60-80% of the cases it progresses to a chronic state of the disease, which can even trigger hepatocellular carcinoma. The treatment with pegylated interferon- α and ribavirin is ineffective, mainly due the high genetic variability of HCV. However, there are currently very effective direct acting antivirals (DAAs), which act at the level of virus-specific proteins, such as the NS3 protease. The main objective of this thesis was to study different viral and host factors that influence the response to therapy in chronically infected patients. On the other hand, this thesis evaluated the translational efficiency of natural variants of HCV IRES region (involved in translation initiation) in order to identify those that are translationally attenuated. To this end, different molecular, cellular and bioinformatic approaches were used, which allowed genotyping of circulating HCV isolates in our country as well as genotyping single nucleotide polymorphisms (SNPs) near *IFN- λ -4* gene, characterizing the resistance associated substitutions (RASs) within NS3 region and the IRES variants, in addition to analyzing the influence of miR-122 on viral translation. The results show that 1a subtype is the most frequent (58,2%) in our study. Regarding the factors that affect the course of the infection as well as the response to antiviral therapy, although no association between *IFN- λ -4* gene SNPs and response to therapy was found, the unfavourable rs12979860 genotypes showed to be more frequent in the HCV-infected individuals than within the control population (uninfected). Within NS3 region, RASs to protease inhibitors were detected in 34,4% of DAA-*naïve* patients infected with HCV genotype 1. Surprisingly, by deep sequencing analysis, a low number of RASs were found present as minority and low frequency variants. The translational efficiency assays revealed the existence of translationally deficient variants, both at the level of the IRES majority sequence, and in subpopulations within the viral quasispecies, which could represent potential candidates for vaccine strategies based on viral attenuation. Finally, although miR-122 binds directly to the HCV genome, the interaction with the viral IRES did not lead to changes at the level of translation. This thesis allowed us to deepen into underexplored aspects of HCV

in Uruguay, such as the analysis of different host and viral factors, associated with response to therapy. At the same time, it contributed with basic knowledge on the viral biology of translation enabling the beginning of functional studies with infectious clones of this virus. As perspectives we propose to continue with *ex vivo* translational efficiency assays, both from bicistronic constructions and infectious clones, in order to confirm the results obtained *in vitro*, and finally to study the IRES-40S ribosomal subunit interaction through biophysical assays.

Keywords: IFN- λ -4, NS3, RASs, IRES, translational efficiency

LISTA DE SIGLAS Y SÍMBOLOS

μl –	microlitro
μM –	micromolar
3' NCR –	Región 3' no codificante
3' UTR –	Región 3' no traducida
5' NCR –	Región 5' no codificante
A –	Alanina
A3G –	APOBEC3G citidina deaminasa
AA –	aminoácido
ADN –	Ácido desoxirribonucleico
ADNc –	ADN complementario
AE/ASESP –	Asociación Española
AGO –	proteína argonauta
AGO-CLIP –	del inglés: <i>AGO Cross linking immunoprecipitation</i>
AIC –	Criterio de información de Akaike (del inglés: <i>Akaike Information Criterion</i>)
ALT –	alanina aminotransferasas
AMP –	ampicilina
ARN –	Ácido Ribonucleico
ARNm –	ARN mensajero
AST –	aspartato aminotransferasas
ASV –	Asunaprevir
BOC –	Boceprevir
CB –	carbenicilina
CO_2 –	anhídrido carbónico
CV –	Carga viral
DAAs –	Antivirales de acción directa (del inglés: <i>Direct-Acting Antiviral Agents</i>)
DCV –	Daclatasvir
DEPC –	dietilpirocarbonato
DMEM –	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTP(s) –	desoxinucleótido(s) trifosfato
DSV –	Dasabuvir
DTT –	ditiotreitól
EBR –	Elbasvir
EC_{50} –	Concentración efectiva 50%
EDTA –	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EOT –	Final del tratamiento (del inglés: <i>End of treatment</i>)
FLuc –	luciferasa de <i>Firefly</i>
FNR –	Fondo Nacional de Recursos
Gb –	<i>Gigabytes</i>
GBs –	Glóbulos blancos
GLE –	Glecaprevir
GLuc –	luciferasa de <i>Gaussia</i>
GT1 - 8 –	Genotipos 1 al 8
GTR + γ + I –	<i>General Time Reversible</i> + distribución gamma + sitios invariables
GWAS –	Estudios de asociación a escala genómica (del inglés: <i>Genome-wide association studies</i>)
GZV –	Grazoprevir
h –	horas
HC –	Hospital de Clínicas

HCC –	carcinoma hepatocelular (del inglés: <i>Hepatocellular carcinoma</i>)
HVR –	región hipervariable
HWE –	Equilibrio Hardy-Weinberg (del inglés: <i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>)
IC –	Intervalo de Confianza
IFN- α –	Interferón alfa
IFN- α -peg –	Interferón alfa pegilado
IFN- β –	Interferón beta
IFN- λ -1 al 4 –	Interferón lambda 1 al 4 (también IFNL1-4)
IL28A, B –	Interleuquinas 28 A y B
IL29 –	Interleuquina 29
IP –	inhibidor de la proteasa
IPTG –	isopropil-beta-D-tiogalactósido
IQR –	Rango intercuartil (del inglés: <i>Interquartile range</i>)
IRES –	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (del inglés: <i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
ISGs –	Genes estimulados por interferón (del inglés: <i>Interferon Stimulated Genes</i>)
ITAFs –	<i>IRES trans-acting Factors</i>
IVT –	Transcripción <i>in vitro</i> (del inglés: <i>In Vitro Transcription</i>)
Kb –	Kilobases
LB –	Medio de cultivo Luria Bertani
LD –	Desequilibrio de ligamiento (del inglés: <i>Linkage Disequilibrium</i>)
LDV –	Ledipasvir
M –	Molar
MAVS –	del inglés: <i>Mitochondrial AntiViral Signaling protein</i>
Met –	metionina
MgCl ₂ –	Cloruro de magnesio
MgSO ₄ –	Sulfato de magnesio
min –	minuto
miRNA –	micro ARN
mL –	mililitro
mM –	milimolar
MSP –	Ministerio de Salud Pública
NCBI –	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCR –	región no codificante (del inglés: <i>Non-coding Region</i>)
NEAA –	aminoácidos no esenciales (del inglés: <i>Non-essential amino acids</i>)
NGS –	Secuenciación masiva (del inglés: <i>Next Generation Sequencing</i>)
NI –	Inhibidor nucleos(t)ídico (del inglés: <i>Nucleos(t)ide Inhibitor</i>)
nM –	nanomolar
NNI –	Inhibidor no nucleosídico (del inglés: <i>Non-nucleoside Inhibitor</i>)
NR –	No respondedor
nt –	nucleótidos
OBV –	Ombitasvir
OR –	<i>Odds Ratio</i>
ORF –	Marco abierto de lectura (del inglés: <i>Open Reading Frame</i>)
pb –	pares de bases
PBS –	Buffer fosfato salino (del inglés: <i>Phosphate-buffered Saline</i>)
PCR –	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
peg –	polietilenglicol
PIB –	Pibrentasvir
PM –	Peso Molecular

p.t. –	post-transfección
PTV –	Paritaprevir
PV –	Polio virus
RAPs –	Polimorfismos asociados a Resistencia (del inglés: <i>Resistance-associated Polymorphisms</i>)
RASs –	Sustituciones asociadas a Resistencia (del inglés: <i>Resistance-associated Substitutions</i>)
RAVs –	Variantes asociadas a Resistencia (del inglés: <i>Resistance-associated Variants</i>)
RBV –	ribavirina
RE –	retículo endoplasmático
RFLP –	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RFP –	proteína roja fluorescente
RLU –	unidades de luz relativas (del inglés: <i>Relative Light Units</i>)
RLuc –	luciferasa de <i>Renilla</i>
RPs –	<i>random primers</i>
rpm –	revoluciones por minuto
RRL –	Lisado de reticulocitos de conejo (del inglés: <i>Rabbit Reticulocyte Lysate</i>)
RT –	Retrotranscripción
RVS –	respuesta virológica sostenida
seg –	segundos
SEM –	Error estándar de la media (del inglés: <i>Standard Error Mean</i>)
Ser –	serina
SHAPE –	Del inglés: <i>Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension</i>
SMV –	Simeprevir
SNP –	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés: <i>Single-nucleotide Polymorphism</i>)
SNS –	Servicio Nacional de Sangre
SOF –	Sofosbuvir
TAE –	Buffer Tris-acetato-edta
T _{amb} –	temperature ambiente
Thr –	treonina
Trif –	proteína adaptadora del receptor tipo Toll 3
TVR –	Telaprevir
UFC –	Unidades Formadoras de Colonias
UI –	Unidades Internacionales
VEL –	Velpatasvir
VHB –	Virus de la Hepatitis B
VHC –	Virus de la Hepatitis C
VIH –	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLDL –	Lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés: <i>Very Low Density Lipoproteins</i>)
VOX –	Voxilaprevir
VPV –	Vaniprevir
WT –	del inglés: <i>wild-type</i>
X-gal –	5-bromo 4-cloro 3-indolil beta D galactósido
Zn ²⁺ –	Ión Zinc

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de la población estudiada.	36
Tabla 2. Características demográficas de las poblaciones en estudio.....	58
Tabla 3. Frecuencias genotípicas de los SNP rs12979860 y rs8099917 en ambas poblaciones	60
Tabla 4. Prevalencia de genotipos favorables reportados en diferentes países en población control (con serología negativa para VHC) versus población con infección crónica por VHC.....	62
Tabla 5. Frecuencias genotípicas de los SNP rs12979860 y rs8099917 en individuos infectados crónicamente con VHC según respuesta a la terapia (n = 42)	64
Tabla 6. Frecuencia de RASs halladas en las secuencias consensos de NS3 de GT1 obtenidas por secuenciación poblacional, provenientes de pacientes <i>naïve</i> a DAAs....	86
Tabla 7. Frecuencia de RAPs y sustituciones emergentes halladas en las secuencias consensos de NS3 obtenidas por secuenciación poblacional.....	91
Tabla 8. RASs halladas como variantes minoritarias (0,1-1%) y de baja frecuencia (1-15%) en las muestras analizadas por NGS.	99
Tabla 9. Mutaciones encontradas en las secuencias consensos de los IRES de los aislamientos de VHC uruguayos.....	118
Tabla 10. Clones del IRES hallados en baja frecuencia a los que se les evaluó su eficiencia traduccional.....	120
Tabla 11. Cargas virales y respuesta al tratamiento de muestras cuyas secuencias consensos (secuenciación Sanger) evidenciaron baja eficiencia traduccional	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de la familia <i>Flaviviridae</i>	5
Figura 2. Modelo de la partícula lipo-viral (LVP) del virus de la hepatitis C (VHC)	6
Figura 3. Organización genómica de VHC y procesamiento de la poliproteína	7
Figura 4. Representación esquemática de una nube de cuasiespecies	10
Figura 5. Árbol filogenético de la región codificante del genoma de VHC que incluye todos los genotipos reportados hasta el momento.....	12
Figura 6. Genoma de VHC y blancos de los nuevos antivirales de acción directa (DAA)	16
Figura 7. Esquema de la localización de los cebadores utilizados para la amplificación del IRES y una región de NS5B de VHC con fines de genotipificado.....	32
Figura 8. Análisis de <i>Likelihood Mapping</i> para las regiones analizadas	40
Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región del IRES (314nt) del genoma de VHC	42
Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región NS5B parcial (316nt) del genoma de VHC con subtipos de interés condensados	43
Figura 11. Polimorfismos del hospedero asociados con la respuesta a la terapia con interferón y ribavirina	49
Figura 12. Distribución genotípica de los polimorfismos cercanos al gen <i>IFN-λ-4</i> en una población uruguaya infectada por VHC (n=78) y una población uruguaya control (no infectada, n=92).....	59
Figura 13. Distribución alélica de los polimorfismos cercanos al gen <i>IFN-λ-4</i> en una población uruguaya infectada por VHC (n=78) y una población uruguaya control (no infectada, n=92)..	60
Figura 14. Estructura del heterodímero NS3/4A.....	69
Figura 15. Esquema de la localización de los cebadores utilizados para la amplificación de la región que codifica para la proteasa NS3 de VHC.....	76
Figura 16. Análisis filogenéticos de la región que codifica para la proteína NS3.....	83
Figura 17. Número de sitios nucleotídicos y aminoacídicos mutados/sustituídos en la región NS3 de acuerdo al tratamiento y el subtipo viral.....	85
Figura 18. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del dominio proteasa de NS3 (582nt) mostrando exclusivamente los diferentes clados del subtipo 1a.	88

Figura 19. Cobertura a lo largo del gen de NS3 luego del alineamiento de los <i>reads</i> filtrados.	96
Figura 20. Similitud nucleotídica y aminoacídica entre las secuencias consensos de NS3 obtenidas por secuenciación Sanger vs NGS	97
Figura 21. Estructura secundaria del IRES de VHC	104
Figura 22. Representación esquemática del vector bicistrónico DL-HCV-1b empleado para los ensayos de eficiencia traduccional de los IRES de interés	111
Figura 23. Localización de las mutaciones encontradas en los IRES consensos cuyas eficiencias traduccionales fueron evaluadas	119
Figura 24. Eficiencia traduccional de variantes naturales del IRES presentes en secuencias consenso de aislamientos clínicos uruguayos..	122
Figura 25. Gel nativo de agarosa al 1% para visualizar la integridad de los ARNs bicistrónicos	123
Figura 26. Eficiencia traduccional de variantes naturales del IRES presentes en baja frecuencia así como de mutantes únicos generados por mutagénesis sitio- dirigida.....	125
Figura 27. Cobertura a lo largo del IRES luego del alineamiento de los <i>reads</i> filtrados	129
Figura 28. Distribución de variantes de baja frecuencia identificadas en las cuasiespecies de los IRES analizados por NGS..	130
Figura 29. Variantes mayoritarias y de baja frecuencia identificadas en las cuasiespecies de los IRES provenientes de muestras con infecciones mixtas presuntivas analizados por NGS.....	132
Figura 30. Unión canónica de miR-122 al extremo 5'NCR del genoma de VHC versus unión no canónica en el dominio IV del IRES	137
Figura 31. Conservación de secuencia del SL IV del IRES de VHC en los diferentes genotipos	140
Figura 32. Estructura y secuencia de los mutantes generados en el SL IV del IRES de VHC, y su apareamiento presuntivo con miR-122	141
Figura 33. Representación esquemática del vector de VHC de genoma completo pJc1FLAG(p7-nsGLuc2A)/GNN-m15 utilizado para generar los mutantes	143
Figura 34. Esquema de la localización de los cebadores utilizados en la estrategia de <i>Overlap-extension</i> PCR para generar los mutantes en el SL IV del IRES de VHC	146

Figura 35. Gel nativo de agarosa al 1% para visualizar la integridad de los ARNs generados <i>in vitro</i>	155
Figura 36. Detección de luminiscencia de GLuc intra y extracelularmente a diferentes tiempos post-transfección del ARN viral reportero	156
Figura 37. Titulación de diferentes concentraciones de inhibidores de miR-122 y miR-124 en células Huh7.5	157
Figura 38. Titulación del análogo de miR-122 (<i>mimic</i>) en células Δ miR-122.....	159
Figura 39. Eficiencias traduccionales de los diferentes mutantes del SL IV del IRES en diferentes condiciones	161
Figura 40. Predicción de estructuras secundarias de diferentes regiones del IRES de los mutantes de VHC..	167

TABLA DE CONTENIDOS


AGRADECIMIENTOS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE SIGLAS Y SÍMBOLOS	XII
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
TABLA DE CONTENIDOS.....	XIX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Epidemiología de la infección por el virus de la hepatitis C.....	1
1.2. Vías de transmisión	2
1.3. Patogénesis.....	2
1.4. Clasificación filogenética	4
1.5. Estructura de la partícula viral	5
1.6. Organización genómica y proteínas virales	6
1.7. Variabilidad genética y genotipos virales	9
1.7.1. Mutación y quasiespecies.....	9
1.7.2. Recombinación.....	11
1.7.3. Genotipos.....	11
1.7.4. Distribución de la variabilidad genética en el genoma.....	12
1.8. Prevención y Tratamiento.....	12
1.8.1. Vacunas	12
1.8.2. Terapia clásica basada en interferón	13
1.8.3. Antivirales de acción directa (DAAs).....	14
1.8.4. Situación en Uruguay	17
1.8.5. Terapias dirigidas a inhibir factores del hospedero	17
1.9. Factores que afectan la respuesta a la terapia	18
1.9.1. Factores genéticos del hospedero	18
1.9.2. Factores genéticos virales	19

a.	Genotipos	20
b.	Sustituciones Asociadas a Resistencia (RASs) a DAAs	20
c.	Eficiencia traduccional viral	22
1.10.	Importancia de la investigación de esta tesis	23
2.	OBJETIVO GENERAL	25
3.	CAPÍTULO 1.....	26
GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE VHC A ESTUDIAR		26
3.1.	Antecedentes y fundamento teórico.....	26
3.2.	Hipótesis.....	28
3.3.	Objetivo Específico Capítulo 1	28
3.4.	Materiales y Métodos.....	29
3.4.1.	Muestras y consideraciones éticas	29
3.4.2.	Extracción del ARN viral	30
3.4.3.	Amplificación del IRES por One-Step PCR.....	30
3.4.4.	Retrotranscripción	31
3.4.5.	Amplificación de una región de NS5B por PCR semi-anidada	31
3.4.6.	Visualización de productos de PCR.....	32
3.4.7.	Purificación y secuenciación de productos de PCR	32
3.4.8.	Genotipificación de VHC mediante análisis filogenéticos.....	33
3.5.	Resultados y discusión	35
3.5.1.	Características de la población estudiada.....	35
3.5.2.	Amplificación y secuenciación de las regiones de interés (IRES y NS5B parcial)	36
3.5.3.	Análisis de la señal filogenética por <i>Likelihood Mapping</i>	39
3.5.4.	Árboles filogenéticos y genotipificación	40
3.6.	Conclusiones	46
4.	CAPÍTULO 2.....	47
PREVALENCIA DE SNPs CERCANOS AL GEN <i>IFN-λ-4</i> EN POBLACIÓN URUGUAYA CON Y SIN INFECCIÓN POR VHC		47
4.1.	Antecedentes y fundamento teórico.....	47
4.2.	Hipótesis.....	51

4.3.	Objetivos Específicos Capítulo 2	51
4.4.	Materiales y Métodos.....	52
4.4.1.	Población en estudio	52
4.4.2.	Consideraciones éticas.....	53
4.4.3.	Extracción de ADN genómico	54
4.4.4.	Genotipificado de SNPs rs12979860 y rs8099917.....	54
4.4.5.	Análisis estadísticos	55
4.5.	Resultados y Discusión	57
4.5.1.	Características demográficas de los casos y controles.....	57
4.5.2.	Distribución alélica y genotípica de los SNPs rs12979860 y rs8099917 en casos y controles	58
4.5.3.	Análisis de desequilibrio de ligación (LD).....	63
4.5.4.	Asociación entre estos SNPs y la respuesta a la terapia	64
4.6.	Conclusiones	67
5.	CAPÍTULO 3.....	68
	ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN NS3 Y BÚSQUEDA DE RASs A INHIBIDORES DE LA SERÍN-PROTEASA Y OTRAS SUSTITUCIONES	68
5.1.	Antecedentes y fundamento teórico.....	68
5.2.	Hipótesis.....	72
5.3.	Objetivos Específicos Capítulo 3	72
5.4.	Materiales y Métodos.....	73
5.4.1.	Muestras y consideraciones éticas	73
5.4.2.	Amplificación por PCR de la región genómica que codifica para NS3	73
5.4.3.	Visualización de productos de PCR, purificación y secuenciación	77
5.4.4.	Análisis filogenéticos a partir de la región que codifica para NS3	77
5.4.5.	Análisis de mutaciones y sustituciones en NS3 a nivel de la secuencia consenso	78
5.4.6.	Construcción de librerías para secuenciación masiva.....	79
5.4.7.	Secuenciación Masiva	80
5.4.8.	Análisis de datos masivos	80

5.5.	Resultados y Discusión	82
5.5.1.	Amplificación de la región NS3	82
5.5.2.	Análisis filogenéticos	82
5.5.3.	Variabilidad genética de la región NS3	84
5.5.4.	Análisis de sustituciones halladas en la secuencia consenso de NS386	
5.5.5.	Análisis de Secuenciación Masiva	93
5.6.	Conclusiones	102
6.	CAPÍTULO 4.....	103
VARIANTES NATURALES DEL IRES Y SU EFICIENCIA TRADUCCIONAL VIRAL		
.....		103
6.1.	Antecedentes y fundamento teórico.....	103
6.2.	Hipótesis.....	107
6.3.	Objetivos Específicos Capítulo 4	107
6.4.	Materiales y Métodos.....	108
6.4.1.	Muestras.....	108
6.4.2.	Análisis de mutaciones en secuencias consenso	108
6.4.3.	Obtención de secuencia consenso y variantes por clonado.....	108
6.4.4.	Construcción de vectores bicistrónicos con IRES de interés	110
6.4.5.	Transcripción <i>in vitro</i> (IVT) de ARNs bicistrónicos	114
6.4.6.	Traducción <i>in vitro</i> en lisado de reticulocitos de conejo (RRL)	115
6.4.7.	Análisis de la eficiencia traduccional de clones y consensos	115
6.4.8.	Generación de mutantes únicos	115
6.4.9.	Estudio de la estructura secundaria de los IRES evaluados	116
6.4.10.	Análisis estadísticos	116
6.4.11.	Análisis de la diversidad de las cuasiespecies por NGS	116
6.5.	Resultados y Discusión	117
6.5.1.	Variabilidad de los IRES a nivel de secuencias consensos	117
6.5.2.	Obtención de IRES consensos e IRES de baja frecuencia por clonado	
	120
6.5.3.	Eficiencia traduccional de los IRES consensos	121

6.5.4.	Eficiencia traduccional de IRES de baja frecuencia y análisis de mutaciones únicas.....	124
6.5.5.	Estudio de la estructura secundaria de los IRES ineficientes.....	127
6.5.6.	Diversidad de las cuasiespecies a nivel del IRES.....	128
6.5.7.	Relevancia de las subpoblaciones traduccionalmente ineficientes ..	133
6.6.	Conclusiones.....	134
7.	CAPÍTULO 5.....	135
	CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN PUTATIVA ENTRE miR-122 Y EL DOMINIO IV DEL IRES	135
7.1.	Antecedentes y fundamento teórico.....	135
7.2.	Hipótesis.....	138
7.3.	Objetivo Especifico Capítulo 5.....	138
7.4.	Materiales y Métodos.....	139
7.4.1.	Líneas celulares	139
7.4.2.	Mutaciones seleccionadas para ser evaluadas.....	139
7.4.3.	Características de los vectores utilizados	142
7.4.4.	Obtención del <i>Backbone</i> GNN.....	143
7.4.5.	Generación de vector control pGNN-m15.....	144
7.4.6.	Generación de plásmidos mutantes en el dominio IV del IRES	145
7.4.7.	Vector de expresión monocistrónico de luciferasa de <i>Firefly</i> (FLuc)	147
7.4.8.	Transcripción <i>in vitro</i>	148
7.4.9.	Puesta a punto de la detección de GLuc intracelular	149
7.4.10.	Inhibidores y <i>mimic</i> de miRNAs	150
7.4.11.	Titulación: inhibidores de miRNAs y <i>mimic</i> de miR-122.....	151
7.4.12.	Diseños experimentales	151
7.4.13.	Análisis de eficiencia traduccional de los mutantes	153
7.4.14.	Análisis estadísticos	153
7.4.15.	Estudio de la estructura secundaria de los mutantes generados	153
7.5.	Resultados y Discusión	154
7.5.1.	Obtención de vectores mutantes en el SL IV del IRES de VHC.....	154
7.5.2.	Obtención de ARNs mediante transcripciones <i>in vitro</i>	154



7.5.3.	Puesta a punto de la detección de GLuc a nivel intracelular	155
7.5.4.	Titulación de inhibidores de miRNAs	156
7.5.5.	Titulación de <i>mimic</i> de miR-122.....	158
7.5.6.	Eficiencia traduccional de los mutantes en el SL IV del IRES.....	159
7.5.7.	Estudio de la estructura secundaria de los mutantes generados	165
7.6.	Conclusiones	168
8.	CONCLUSIONES FINALES	169
9.	PERSPECTIVAS	172
10.	REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS	173
11.	APÉNDICES	192
11.1.	Tablas y figuras suplementarias.....	192
11.2.	Publicaciones derivadas de esta tesis.....	220
11.3.	Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis.....	230

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología de la infección por el virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es uno de los 5 virus responsables de los casos de hepatitis virales (WHO 2017). Estadísticamente, en el 60-80% de los casos, VHC genera una infección crónica, que puede desencadenar cirrosis (15-30%) y cáncer primario de hígado (carcinoma hepatocelular, o HCC por su sigla en inglés: *Hepatocellular carcinoma*) (1-5%) a lo largo de 20 años de infección (WHO 2018a). Por tal motivo se ha convertido en una de las indicaciones más frecuentes para el trasplante de hígado en Estados Unidos (Cholankeril and Ahmed 2018), Europa (Burra et al. 2016; Graziadei et al. 2016) y Latinoamérica (Debes et al. 2018; Piñero et al. 2018).

La infección por el VHC se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial y se estima que actualmente existen aproximadamente 71 millones de personas infectadas crónicamente por este virus, lo que equivale al 1% de la población (WHO 2018a). En el año 2015, ocurrieron alrededor de 1.75 millones de nuevas infecciones por VHC así como 399.000 muertes a causa de complicaciones de la infección. Estos datos reflejan que para cumplir con el objetivo de eliminar la epidemia mundial se necesitan intervenciones de salud pública a gran escala (WHO 2017).

En el Uruguay no existen datos sobre la prevalencia de la infección por VHC en la población general. Los datos estimados en Bancos de Sangre muestran una seroprevalencia del 0,31% (OPS 2017). No obstante, la prevalencia de donantes de sangre no debe confundirse con la de la población general ya que los donantes son seleccionados y específicamente se excluyen de este grupo a aquellos individuos con factores de riesgo para la adquisición de hepatitis virales. En población general, el Ministerio de Salud Pública (MSP) reportó un total de 460 nuevos casos de Hepatitis C notificados entre los años 2014 y 2015 (División Epidemiología - DGS - MSP 2016), siendo éstos los datos más recientes en referencia a la incidencia de esta infección en nuestro país.

1.2. Vías de transmisión

La principal vía de transmisión es la exposición directa o indirecta con sangre contaminada (WHO 2018b). Esta transmisión puede ser del tipo iatrogénica (Prati 2006; Pépin et al. 2014), lo cual se asocia a prácticas médicas poco seguras utilizando material mal esterilizado (cirugías, cuidado dental, hemodiálisis, o transfusiones de sangre o sus hemoderivados sin previo análisis). Por otra parte, el uso de drogas por vía intravenosa representa el 23% de las nuevas infecciones por VHC (WHO 2017). También existen otros modos de transmisión menos frecuentes, como procedimientos percutáneos tales como tatuarse o colocarse *piercings* (Tohme and Holmberg 2012) o bien a través de accidentes laborales en centros de salud (Coppola et al. 2016). El riesgo de transmisión vertical de madre a hijo es de 5,8% en niños nacidos de madres VHC positivas, mientras que este riesgo es mayor (10,8%) cuando las madres se encuentran co-infectadas también con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Benova et al. 2014). Si bien la transmisión por vía sexual no ha sido bien documentada, se ha estimado como un evento raro en parejas heterosexuales monógamas (Terrault et al. 2013), mientras que parece ser más frecuente en hombres VIH positivos que tienen sexo con hombres (Urbanus et al. 2009).

1.3. Patogénesis

VHC es un virus no citopático que principalmente replica en hepatocitos. Si bien la mayoría de las personas infectadas desarrollan una infección crónica (WHO 2018a), aproximadamente entre 20-40% desarrollan hepatitis aguda (que resuelven espontáneamente). Las infecciones agudas son mayoritariamente asintomáticas, aunque pueden asociarse con malestar, ictericia y náuseas. El período de incubación es variable, sin embargo, entre las 6-12 semanas post exposición se detectan valores elevados de alanina y aspartato aminotransferasas (ALT y AST, respectivamente), mientras que los anticuerpos anti VHC son detectables a partir de la semana 8. La resolución espontánea de la infección típicamente ocurre antes de los 6 meses, lo cual lleva a la normalización de los niveles de las enzimas hepáticas concomitantemente con la eliminación del virus (Boesecke and Wasmuth 2012).

Si al cabo de 6 meses el virus persiste en el organismo, se considera que se ha establecido una infección crónica. Estos casos, al igual que los de infecciones agudas, son principalmente asintomáticos o bien presentan sintomatología no específica. Los niveles de ALT y AST en suero, los cuales reflejan el nivel de daño a los hepatocitos y el grado de necrosis (Hoofnagle 2002), pueden variar considerablemente a lo largo de la historia natural de la infección crónica (Boesecke and Wasmuth 2012). Con el transcurso de los años, los pacientes crónicamente infectados presentan riesgos mayores de desarrollar inflamación del hígado, esteatosis, fibrosis, cirrosis e incluso HCC (Kao et al. 2016). Estas consecuencias patológicas de la infección por VHC probablemente sean el resultado de una respuesta inmune activa pero inefectiva que causa daño hepático pero falla en eliminar la infección (Yamane et al. 2013).

Además, a lo largo de los años se han reportado numerosas manifestaciones extrahepáticas asociadas a la infección crónica por VHC (Blackard et al. 2006; Tampaki and Koskinas 2014; Polo and Laufer 2017). Estas manifestaciones, de etiología variable, consisten en gran parte de síndromes hematológicos, neurológicos y autoinmunes desencadenados por el virus a través de la activación de diversos mecanismos inmunológicos aún no completamente elucidados (Tampaki and Koskinas 2014).

Aunque los hepatocitos son el sitio primario de infección, actualmente existe evidencia que sugiere que VHC es capaz de replicar eficientemente en tejidos extrahepáticos y en diferentes tipos celulares, tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMCs: linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas) (Lerat et al. 1996; Goutagny et al. 2003; Blackard et al. 2006; Laskus et al. 2007; Pham et al. 2008; Baré 2009), células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Fletcher et al. 2012), células de islotes pancreáticos (Blackard et al. 2017), células enteroendócrinas de la mucosa gastrointestinal (Russelli et al. 2017) así como en el cerebro (Radkowski et al. 2002).

A pesar de las múltiples evidencias sobre la capacidad replicativa de este virus en PBMCs (Lerat et al. 1996; Goutagny et al. 2003; Laskus et al. 2007; Pham et al. 2008), no existe actualmente un consenso respecto a su importancia como reservorios virales (Baré 2009). Quienes apoyan esta hipótesis, afirman que

estos reservorios de VHC pueden impactar profundamente en el tratamiento y la patogénesis de la infección, ya que podrían estar implicados en la transmisión vertical del virus (Azzari et al. 2000), en la resistencia a los tratamientos (Xu et al. 2005; Hanno et al. 2014; Miri et al. 2017) así como en el desarrollo de infecciones ocultas (Pham and Michalak 2011) que puedan llevar a la reemergencia viral en receptores de trasplantes hepáticos (Laskus et al. 2002; Erard-Poinsot et al. 2018).

1.4. Clasificación filogenética

Considerando el tipo de ácido nucleico (ARN de simple cadena de sentido positivo, no segmentado) así como su organización genómica (un único marco abierto de lectura flanqueado por regiones no codificantes en los extremos 5' y 3' – NCR, por su sigla en inglés: *Non-coding regions*), VHC se clasifica como el miembro prototipo del género *Hepacivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* (Bukh 2016). Esta familia incluye también a los géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Pegivirus* (Figura 1) (Simmonds et al. 2017).

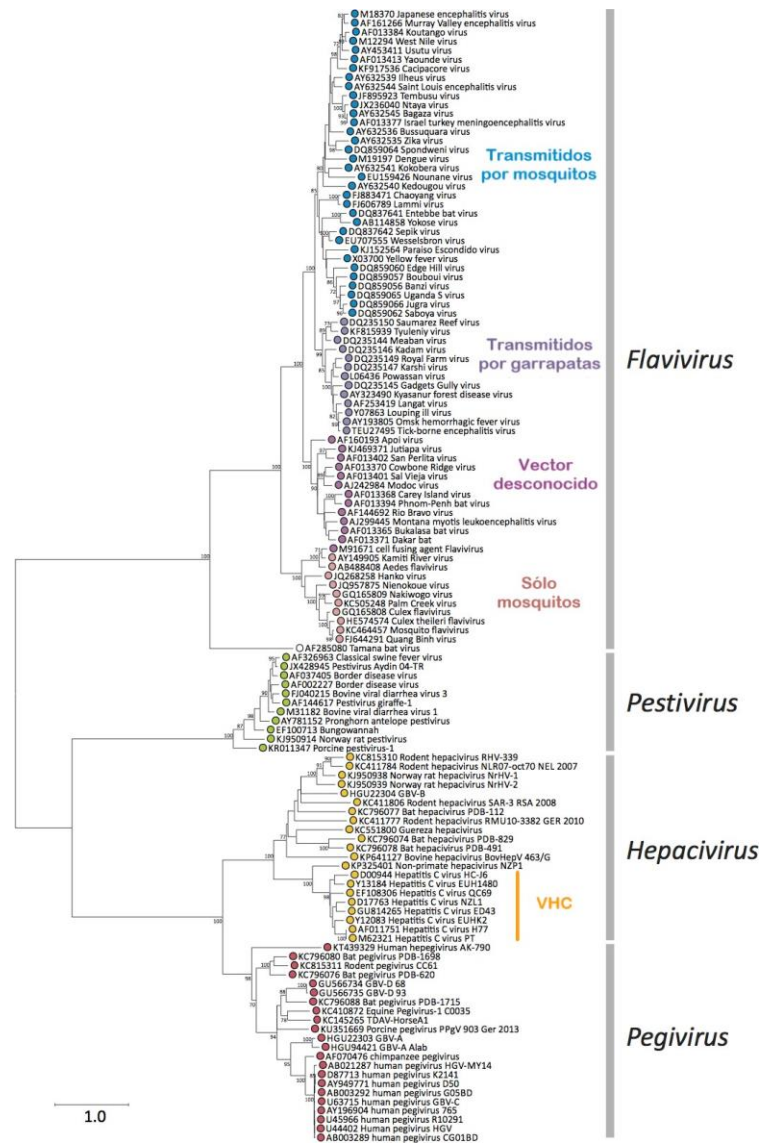


Figura 1. Árbol filogenético de la familia *Flaviviridae*. Árbol realizado mediante la utilización de secuencias de una región parcial del gen que codifica para la polimerasa de miembros representativos de los distintos géneros (modificado de ICTV, 2017).

1.5. Estructura de la partícula viral

VHC es un virus envuelto, de genoma de ARN simple hebra de sentido positivo recubierto por una nucleocápside de estructura icosaédrica. La partícula viral presenta forma redondeada con un diámetro que oscila entre 40 y 100 nanómetros (Catanese et al. 2013). Ancladas en la envoltura lipídica, adquirida en el proceso de gemación del virus de la célula hospedera, se encuentran las

glicoproteínas E1 y E2 (formando heterodímeros) (Lindenbach and Rice 2005). La estructura de la unidad infecciosa es, sin embargo, un poco más compleja porque hay evidencia que sugiere que VHC circula en sangre asociado a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs por su sigla en inglés: *Very Low Density Lipoproteins*) formando partículas denominadas “lipo-virales” (Figura 2) (André et al. 2002). Estas partículas varían en su composición, pero usualmente contienen lipoproteínas ricas en triglicéridos tales como colesterol, fosfolípidos, triacilglicerolos y apolipoproteínas B, C y E (Bartenschlager et al. 2011).

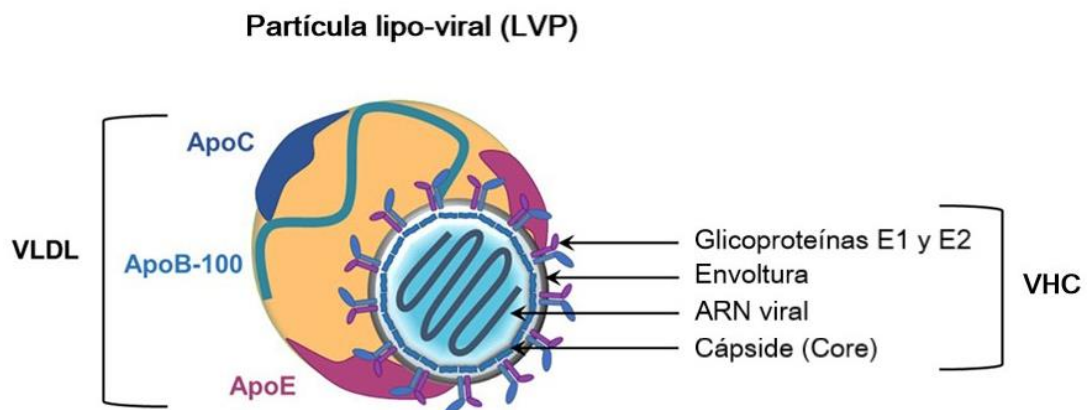


Figura 2. Modelo de la partícula lipo-viral (LVP) del virus de la hepatitis C (VHC). La partícula de VHC consiste de una cápside icosaédrica formada por la proteína del core, dentro de la cual se encuentra el ARN viral. La nucleocápside está rodeada de una envoltura lipídica derivada del retículo endoplasmático (RE), en la cual se encuentran insertas las glicoproteínas E1 y E2. La partícula infecciosa de VHC corresponde a una partícula híbrida de componentes lipoproteicos de muy baja densidad (VLDL) conjuntamente con componentes virales, y se denomina partícula lipo-viral (LVP). En colores se indican diferentes apolipoproteínas que frecuentemente se asocian con VLDL y LVPs (Modificado de Wrensch *et al.*, 2018).

1.6. Organización genómica y proteínas virales

El genoma de VHC (Figura 3) está constituido por ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 9,6 Kilobases (Kb), el cual no solo actúa como molde para la replicación sino también como ARN mensajero (ARNm) para la traducción de las proteínas virales. Dicha molécula posee un único marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés: *Open Reading Frame*) que codifica para una poliproteína de poco más de 3000 aminoácidos (AA), la cual es co y post-traduccionalmente procesada por proteasas virales y del hospedero, y da lugar a tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y a siete no estructurales

(p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Bartenschlager and Lohmann 2000). Dos regiones no codificantes (NCR) y altamente estructuradas, ubicadas a ambos extremos del genoma (5'NCR y 3'NCR) son requeridas para la traducción y replicación del ARN viral. La región 5'NCR contiene el IRES (Sitio interno de entrada al ribosoma, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*) que interactúa directamente con el ribosoma permitiendo un mecanismo de traducción Cap-independiente (Pestova et al. 1998).

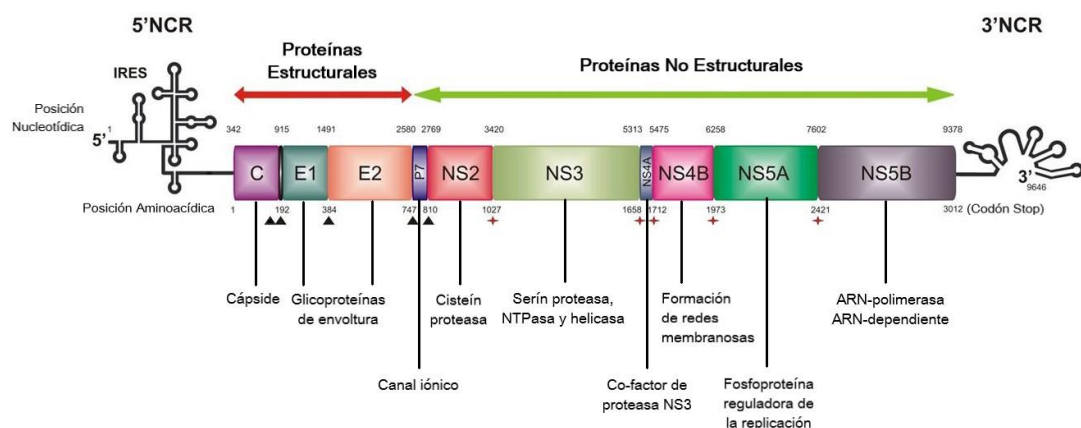


Figura 3. Organización genómica de VHC y procesamiento de la poliproteína. Representación esquemática del genoma de ARN de aproximadamente 9.6Kb. En los extremos 5' y 3' (5'NCR y 3'NCR) se muestran las estructuras secundarias simplificadas. El IRES dirige la traducción de la poliproteína precursora que es posteriormente procesada en proteínas estructurales y no estructurales gracias a la acción de peptidasas celulares (flechas negras) y de proteasas virales NS2 y NS3/4A (estrellas rojas). Las posiciones nucleotídicas se indican con números en la parte superior del esquema, mientras que las posiciones aminoácidas se indican en la parte inferior (Modificado de Echeverría *et al.*, 2015).

La primera proteína estructural es la proteína del core, que no sólo forma la nucleocápside sino que además, dada su naturaleza básica, tiene funciones de unión al ARN viral. Adicionalmente, se ha descrito una amplia variedad de roles que esta proteína tendría en la patogénesis viral, específicamente: modula la expresión génica del metabolismo lipídico, la transducción de señales y la respuesta inmune; afecta la apoptosis celular; inhibe las vías de señalización del interferón (IFN); induce stress oxidativo que puede ocasionar resistencia a la insulina; así como también influye en el desarrollo de esteatosis (hígado graso), fibrosis, cirrosis y HCC (Li et al. 2014). Las glicoproteínas de envoltura, E1 y E2, son del tipo I transmembrana y se insertan en el retículo endoplasmático (RE)

durante su síntesis, donde dimerizan de forma no covalente. Juegan roles pivotaes en el ensamblado de la partícula infectiva, la entrada del virus a la célula hospedera y en la fusión con la membrana endosomal (Moradpour and Penin 2013).

La primera proteína no estructural es p7, un pequeño polipéptido integral de membrana que es capaz de formar hexámeros o heptámeros con actividad de canal catiónico, actividad que es esencial para el egreso y la infectividad de las partículas virales (Bentham et al. 2013). Le sigue a esta proteína, la cisteín proteasa NS2 cuya función es autoescindir de la poliproteína precursora. Si bien NS2 no es directamente necesaria para la replicación, es fundamental para liberar a la serín proteasa NS3 quien es responsable de escindir a las proteínas involucradas en el proceso replicativo. También se le han adjudicado roles en el ensamblado de los viriones (Lorenz 2010). La serín proteasa NS3 y su co-factor NS4A forman un complejo no covalente que es estabilizado por su unión a un ión de zinc (Zn^{2+}). La función del co-factor es principalmente asociar el complejo a la membrana, mientras que NS3 es una proteína multifuncional con un dominio N-terminal con actividad serín proteasa y un dominio C-terminal con actividad NTPasa y ARN helicasa. La función principal de NS3/4A es escindir las restantes proteínas no estructurales, posibilitando de este modo la replicación viral (Failla et al. 1994; Lin 2006). NS4B es una proteína hidrofóbica transmembrana que, gracias a su capacidad de oligomerizar, dispara la formación de rearreglos vesiculares de membrana, conocidos como “redes membranosas” y que corresponden a los sitios de replicación viral (Paul et al. 2011). Además se ha demostrado que tiene capacidad de unir al intermediario de replicación (hebra de ARN de sentido negativo) (Einav et al. 2008), lo cual explicaría el mecanismo para incorporar el genoma viral dentro del complejo de replicación. NS5A es una fosfoproteína con capacidad de dimerizar (Shanmugam et al. 2018) que exhibe actividad de unión al ARN (Huang et al. 2005), y juega roles importantes modulando la replicación del ARN viral mediante su asociación a las redes membranosas, así como también en el ensamblado de las partículas infecciosas (Appel et al. 2008). Cabe destacar que esta proteína parece tener un papel importante en la respuesta al IFN, si bien existen controversias en cuanto a los mecanismos moleculares subyacentes (Macdonald and Harris 2004). La última

proteína no estructural denominada NS5B, es la ARN polimerasa ARN dependiente, enzima responsable de la replicación del genoma viral vía la síntesis inicial de una hebra de sentido negativo, complementaria al ARN genómico, que sirve como templado para la producción subsiguiente de hebras de sentido positivo (Behrens et al. 1996).

1.7. Variabilidad genética y genotipos virales

Como la mayoría de los virus de ARN, VHC se caracteriza por presentar una gran variabilidad genética. Los mecanismos de generación de variabilidad genética que explota VHC para su evolución son la mutación y la recombinación.

1.7.1. Mutación y cuasiespecies

La mutación es un mecanismo clave y se debe mayoritariamente a la carencia de actividad correctora de errores de la ARN polimerasa ARN dependiente. La tasa de mutación aproximada de VHC es de 10^{-5} mutaciones por nucleótido por ciclo replicativo (Ribeiro et al. 2012; Geller et al. 2016). Esta característica, conjuntamente con los grandes tamaños poblacionales, los cortos tiempos generacionales y las elevadas tasas de replicación, determinan que VHC circule *in vivo* como una compleja población de variantes genéticas estrechamente relacionadas, denominada cuasiespecies (Figura 4) (Martell et al. 1992; Domingo et al. 1998; Biebricher and Eigen 2005). Esta población de variantes virales está sujeta a competición y se considera como una unidad de selección (Domingo et al. 2012). En un determinado punto de la infección viral, la distribución de las cuasiespecies de VHC refleja el balance entre la continua generación de nuevas variantes, la necesidad de conservar las funciones esenciales del virus y la presión selectiva positiva ejercida por el ambiente. Una de las consecuencias de la dinámica de cuasiespecies es la existencia de un error umbral para la mantención de la información genética. Cuando la tasa de error excede un límite tolerable hay un colapso de la distribución de la cuasiespecie y la secuencia de nucleótidos (nt) pierde su información. Esta transición es conocida como la entrada en error catastrófico y cuando ello sucede provoca la extinción viral (Eigen 2002). La gran variabilidad genética así como su dinámica de cuasiespecies le confiere a VHC una gran adaptabilidad, la cual tiene

implicancias terapéuticas ya que, la continua generación y selección de variantes resistentes o con mejor capacidad replicativa (*fitness*) dentro del enjambre de mutantes, puede permitirle al virus escapar al control de las drogas antivirales (Pawlotsky 2016).

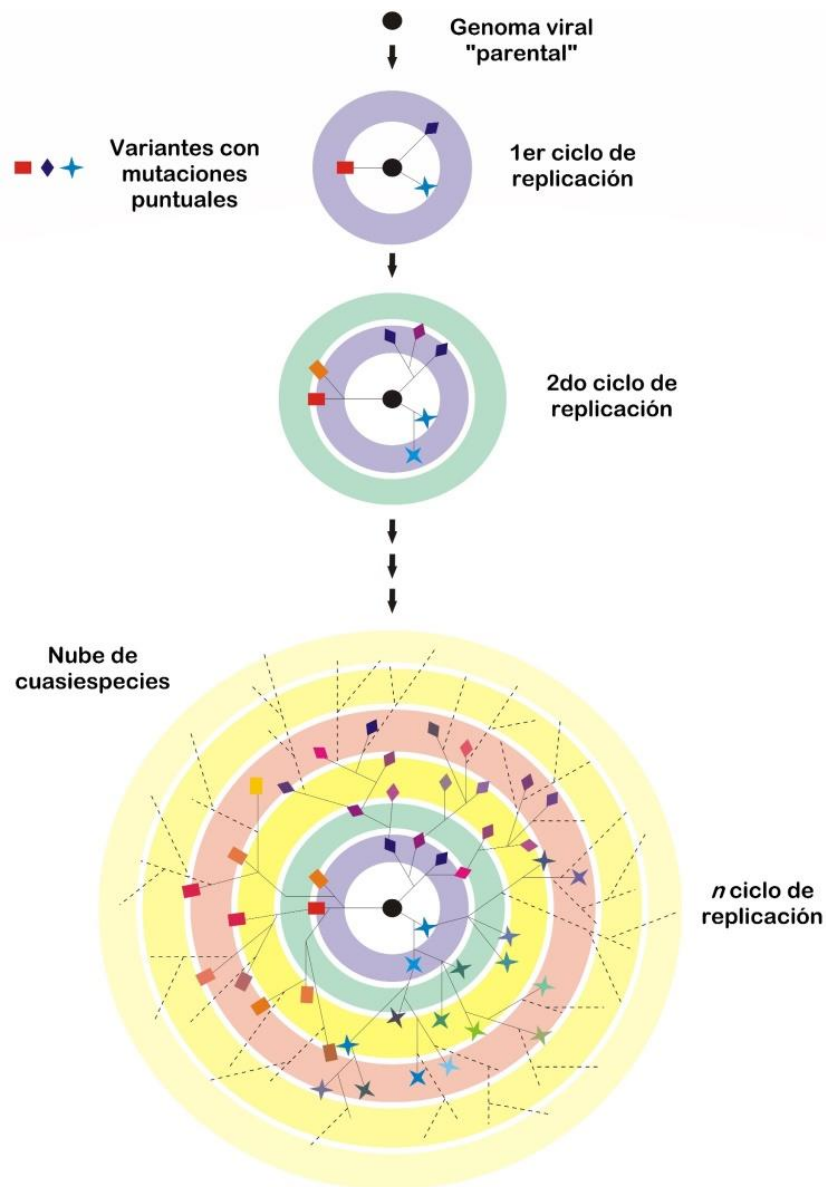


Figura 4. Representación esquemática de una nube de cuasiespecies. Un genoma viral parental (círculo negro) da lugar a diferentes variantes (formas coloreadas), cada una de ellas con alguna mutación puntual. Los círculos concéntricos representan ciclos de replicación. La distribución resultante se conoce como nube de variantes o cuasiespecies (modificado de Echeverría *et al.*, 2015).

1.7.2. Recombinación

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 and Holmes 1999). Hasta la fecha se ha reportado recombinación tanto intra como inter genotipo en aislamientos de VHC provenientes de diferentes regiones geográficas (Galli and Bukh 2014), incluyendo un reporte en nuestro país de recombinación entre los subtipos 1a y 1b (Moreno et al. 2009).

1.7.3. Genotipos

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 7 linajes genéticos diferentes (genotipos del 1 al 7 – GT1 al GT7) que a su vez se subdividen en 86 sub-tipos (Smith et al. 2014; Smith et al. 2017). Recientemente se ha reportado la existencia de un nuevo genotipo, propuesto como GT8 (Figura 5) (Borgia et al. 2018), el cual en mayo de este año (2019) ha sido reconocido como tal por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, del inglés: *International Committee on Taxonomy of Viruses*). En promedio, al considerar el genoma completo de VHC, los genotipos difieren en alrededor de un 30% de su secuencias (a nivel nucleotídico y aminoacídico), mientras que los diferentes subtipos difieren entre sí en al menos un 15% de sus posiciones nucleotídicas (Simmonds et al. 2005; Smith et al. 2014; Bukh 2016). Los genotipos más ampliamente distribuidos y a su vez, los más prevalentes en la mayoría de los países occidentales son el GT1 (46% de las infecciones) y el GT3 (30% de las infecciones) (Messina et al. 2015). En Uruguay, aunque no se cuenta con datos oficiales del MSP, el estudio más reciente y que incluyó mayor cantidad de muestras analizadas (n = 153), reveló que el 74% de las infecciones parecen ser causadas por el GT1, mientras que el 26% restante es causado por el GT3a (Castells et al. 2015).

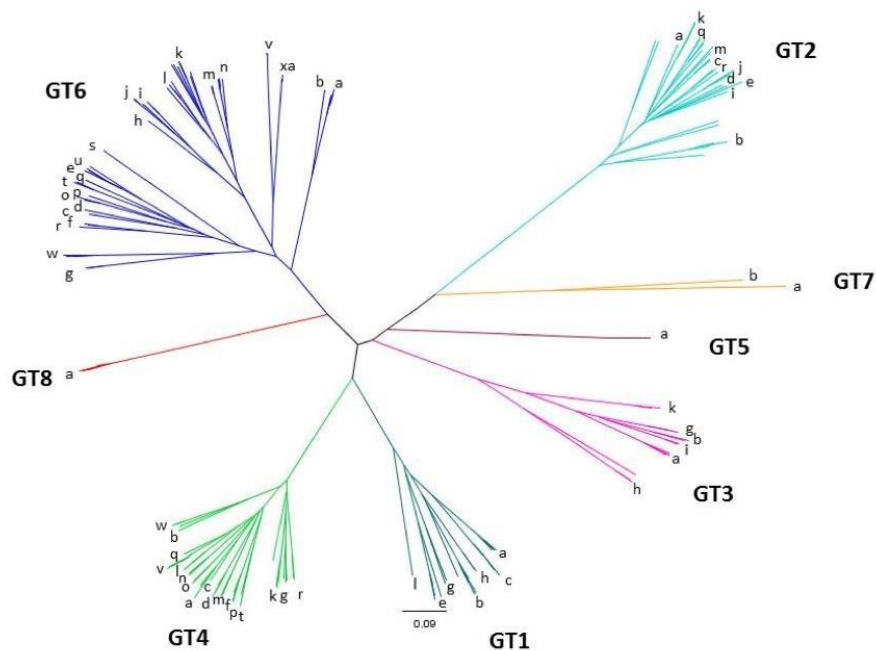


Figura 5. Árbol filogenético de la región codificante del genoma de VHC que incluye todos los genotipos reportados hasta el momento (Borgia et al. 2018).

1.7.4. Distribución de la variabilidad genética en el genoma

La variabilidad genética del VHC no está distribuida uniformemente en el genoma viral. Las regiones del genoma que corresponden a funciones virales esenciales (como las involucradas en la traducción, replicación y morfogénesis) o aquellas que tienen los dominios estructurales más importantes (5'NCR y 3'NCR) son las que exhiben mayor conservación. La región 5'NCR es la más conservada del genoma con un 90% de identidad entre secuencias de cepas genotípicamente distantes (Bukh et al. 1992). Por otro lado, la región más variable del genoma es aquella que codifica para la glicoproteína de membrana E2 que presenta dos regiones hipervariables (HVR1 e HVR2) con 50% de identidad de secuencia entre los diferentes genotipos (Le Guillou-Guillemette et al. 2007).

1.8. Prevención y Tratamiento

1.8.1. Vacunas

Si bien se ha evolucionado considerablemente en lo que respecta al desarrollo de nuevas terapias antivirales para combatir la infección por VHC, aún al día de

hoy no existe una vacuna para prevenirla (Walker 2017). Muchos desafíos han enlentecido el desarrollo de vacunas efectivas contra este virus, principalmente el hecho de que las respuestas inmunes que previenen la persistencia viral no se comprenden en su totalidad. Asimismo, el alto grado de variabilidad genética complica el desarrollo de vacunas pangenotípicas (es decir, dirigidas a generar inmunidad contra varios genotipos simultáneamente) (Baumert et al. 2014).

1.8.2. Terapia clásica basada en interferón

Históricamente, el tratamiento estándar contra VHC era inespecífico y se basaba en el uso de interferón-alfa (IFN- α), administrado, al principio, como monoterapia (Di Bisceglie et al. 1989), más tarde como biterapia en combinación con ribavirina (RBV) (McHutchison et al. 1998) y posteriormente combinando IFN- α pegilado (IFN- α -peg) junto con RBV por 24 o 48 semanas (Manns et al. 2001).

El IFN- α se clasifica dentro de los interferones de tipo I, una familia de citoquinas de la respuesta inmune innata. Luego de unirse con sus receptores específicos, se activa una cascada de señalización intracelular que lleva a la inducción de los genes estimulados por interferón (ISGs, del inglés: *Interferon-stimulated genes*), lo cual resulta en la expresión de múltiples proteínas efectoras antivirales (Feld and Hoofnagle 2005). El IFN- α demostró poseer un perfil farmacocinético subóptimo debido a su rápida absorción y eliminación (*clearance*) renal; esto determinaba concentraciones en suero muy fluctuantes y motivaba administraciones frecuentes (3 veces por semana) así como grandes efectos secundarios. Para eludir estos problemas, se desarrolló el IFN- α -peg, en el cual una molécula de polietilenglicol (peg) se encuentra unida covalentemente al IFN- α lo que resulta en una molécula activa con una mayor vida media (permite una inyección semanal) y un mejor perfil farmacocinético (Degasperi et al. 2013).

La RBV es un análogo de guanósina que posee una actividad antiviral *in vitro* de amplio espectro. El agregado de RBV al tratamiento con IFN- α -peg previene la recaída y aumenta la respuesta virológica (Feld and Hoofnagle 2005). Aunque no se conoce con exactitud cómo la RBV aumenta la tasa de respuesta al IFN en pacientes infectados con VHC, se han propuesto diversos mecanismos que podrían explicarlo (Contreras et al. 2002; Vo et al. 2003; Feld and Hoofnagle 2005; Feld et al. 2010).

Desafortunadamente, estas terapias inespecíficas basadas en la administración de IFN/RBV se asociaban con numerosos efectos secundarios que dificultaban la adhesión al tratamiento y generaban un deterioro en la calidad de vida de los pacientes (Dusheiko 1997; Sung et al. 2011). Adicionalmente, con el tiempo se evidenció, no sólo que las respuestas a estos tratamientos no eran óptimas, sino que algunos genotipos de VHC respondían mejor que otros (Heim 2013).

1.8.3. Antivirales de acción directa (DAAs)

Contrario a lo sucedido con el desarrollo de vacunas, el tratamiento para combatir la infección por VHC ha sufrido una revolución terapéutica (Zoulim et al., 2015), en particular desde el 2011, cuando comenzaron a aprobarse los primeros antivirales de acción directa (DAAs, del inglés: Direct-acting antiviral agents). Las respuestas subóptimas a la biterapia, así como los efectos secundarios, fueron el puntapié para el desarrollo de nuevas estrategias antivirales específicas dirigidas a inhibir proteínas virales claves para el ciclo replicativo de VHC: la NS3 serín proteasa, la fosfoproteína NS5A y la polimerasa NS5B (Figura 6). Estas nuevas drogas antivirales de acción directa (Jacobson et al. 2011; Poordad et al. 2011), fueron inicialmente administradas en combinación con IFN- α -peg con o sin RBV, pero actualmente, combinaciones de diferentes DAAs se recomiendan en tratamientos libres de IFN (WHO 2018b). Estas terapias han logrado mejores tasas de respuesta y menores efectos secundarios, así como tratamientos más breves (8, 12, 16 o 24 semanas) en comparación con el tratamiento original de IFN y RVB.

Los mecanismos de acción de cada clase de inhibidores son variables y dependen no sólo del tipo de inhibidor desarrollado (Figura 6), sino del blanco de acción:

- a. **Inhibidores de la proteasa NS3/4A (IPs):** Son compuestos péptido-miméticos que interactúan con el sitio catalítico del dominio proteasa de NS3 y bloquean el procesamiento post-traducciona l de la poliproteína viral. Los primeros en ser desarrollados fueron telaprevir (TVR) y boceprevir (BOC) (actualmente discontinuados) (Jacobson et al., 2011; Poordad et al., 2011). Tanto los efectos adversos, como el hecho de que éstos sólo eran activos contra el GT1 motivó el desarrollo y la aprobación de nuevas

generaciones de inhibidores que son activos contra más genotipos virales (Lohmann 2018): simeprevir (SMV), paritaprevir (PTV) y grazoprevir (GZV) inhiben el GT1 y el GT4, mientras que voxilaprevir (VOX) y glecaprevir (GLE) son pangentópicos. Todos ellos están recomendados por la Organización Mundial de la Salud, en diferentes combinaciones junto con inhibidores de NS5A y/o NS5B (WHO 2018b).

- b. Inhibidores de la polimerasa NS5B:** Existen dos tipos de inhibidores, los no-nucleosídicos (NNI, del inglés: *non-nucleoside inhibitor*) que se unen fuera del sitio activo y bloquean alostéricamente la acción de la enzima, y los inhibidores nucleos(t)ídicos (NI, del inglés: *nucleos(t)ide inhibitor*) que se incorporan en la hebra nascente de ARN resultando en la terminación de la cadena (Bartenschlager et al. 2013). Dasabuvir (DSV) es el único inhibidor no-nucleosídico aprobado en la actualidad (Asselah 2013), pero sólo presenta actividad contra el GT1. Por otro lado, el único inhibidor nucleotídico aprobado es sofosbuvir (SOF), análogo de la uridina, que a diferencia de los inhibidores no-nucleosídicos, presenta actividad pangentópica (Götte and Feld 2016).
- c. Inhibidores de la fosfoproteína NS5A:** Dado que NS5A no posee actividad enzimática, aún se desconoce el mecanismo de acción de sus inhibidores a nivel molecular. Sin embargo son muy potentes, y esta característica se debe a su capacidad de inhibir tanto la replicación (mediante el bloqueo de la formación de redes membranosas) (Berger et al. 2014) como el ensamblaje (ya que impide la liberación de partículas infecciosas) (McGivern et al. 2014). Al igual que con los IPs, se han desarrollado y actualmente se encuentran aprobados una gran variedad de inhibidores de NS5A, algunos son activos contra unos pocos genotipos virales (daclatasvir – DCV, ombitasvir – OBV y elbasvir – EBV), mientras que otros poseen actividad pangentópica (velpatasvir – VEL, ledipasvir – LDV y pibrentasvir – PIB). Por tratarse de las drogas existentes más potentes contra VHC, se encuentran incluidas en todos los regímenes terapéuticos actualmente recomendados (WHO 2018b).

Si bien para estos tres blancos virales se han desarrollado y aprobado los DAAs que actualmente forman parte de las terapias estándares, otras proteínas virales son actualmente foco de estudios, y ya se encuentran varias drogas en ensayos clínicos y preclínicos dirigidas a inhibir la cisteín proteasa NS2, la actividad helicasa de NS3 y la NS4B para inhibir la formación de los complejos de replicación (Lohmann, 2018).

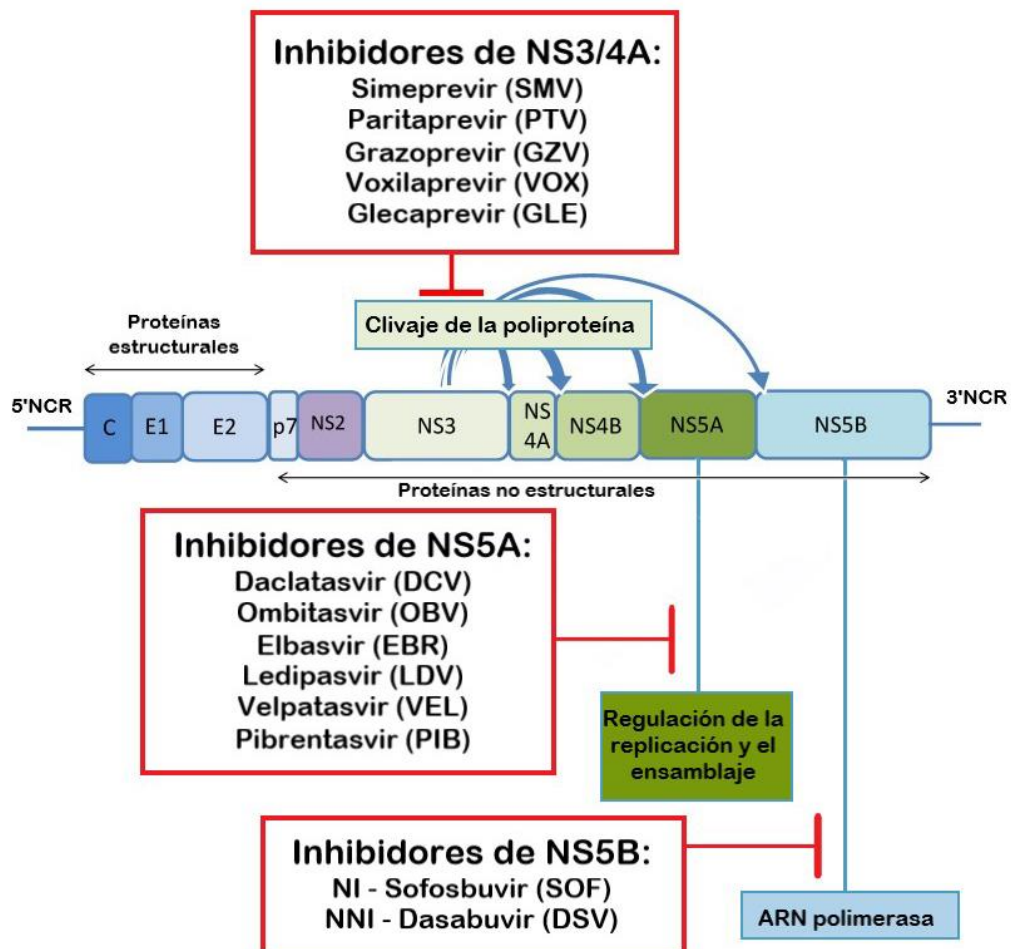


Figura 6. Genoma de VHC y blancos de los nuevos antivirales de acción directa (DAA). Los blancos terapéuticos de los nuevos DAAs corresponden a tres proteínas virales: la proteasa NS3/4A, la fosfoproteína NS5A y la polimerasa NS5B. En el esquema se indican todos los inhibidores actualmente aprobados y recomendados por la Organización Mundial de la Salud (modificado de Ahmed and Felmler, 2015).

1.8.4. Situación en Uruguay

La situación en Uruguay respecto al acceso a estas nuevas terapéuticas ha ido cambiando drásticamente y positivamente desde el inicio de esta tesis. En el año 2015 el Fondo Nacional de Recursos (FNR) solamente financiaba la biterapia de IFN- α -peg y RBV. A principios de 2017, las pautas del FNR fueron revisadas, y si bien se mantenía como primera opción de tratamiento a la biterapia, se incorporó la posibilidad de tratamiento con DAAs a pacientes con enfermedad hepática grave y en lista de trasplante (Sociedad de Gastroenterología del Uruguay 2017). Finalmente, a mediados de 2018 las pautas fueron actualizadas y por tanto, al momento, el FNR financia el tratamiento con dos combinaciones diferentes de DAAs, pero únicamente a pacientes en lista de trasplante, pacientes ya trasplantados o aquellos con fibrosis estadio F3 o F4 (cirrosis) (Fondo Nacional de Recursos 2018). El tratamiento principal incluye SOF/VEL; para algunos casos de pacientes con insuficiencia renal se sugiere PTV-ritonavir/OBV/DSV con o sin RBV, ambos en un esquema de 12 semanas.

1.8.5. Terapias dirigidas a inhibir factores del hospedero

A pesar de que los DAAs se han vuelto la terapia estándar para combatir las infecciones por VHC, aún existen limitaciones, como el acceso a estos tratamientos, la emergencia de resistencia (que se tratará en la próxima sección) y el riesgo, que persiste, de desarrollar HCC luego de la cura (Piñero et al. 2019). Por ello, diferentes factores del hospedero han resultado de interés como posibles blancos terapéuticos que ofrecen oportunidades de desarrollar agentes inhibidores pangenotípicos con alta barrera a la resistencia. Muchos de estos agentes se encuentran actualmente en ensayos clínicos y preclínicos: inhibidores de la entrada viral a la célula (bloqueadores de receptores y de la endocitosis), inhibidores de la replicación viral (que impiden interacciones vitales entre diferentes proteínas/ARNs celulares con proteínas/ARNs virales), inhibidores del ensamblaje y la liberación viral (bloqueadores de glicosidasas y proteínas celulares que interactúan con proteínas virales durante el ensamblaje) e inhibidores de la biosíntesis lipídica (Crouch et al. 2018). El factor del hospedero más estudiado es el micro ARN (miRNA) miR-122, que, como se verá en detalle más adelante, es fundamental para la replicación de VHC.

Actualmente existe una molécula antisentido (Miravirsén) en fase 2 de ensayos clínicos (Janssen et al., 2013) la cual tiene la capacidad de unirse a este miRNA, secuestrándolo y evitando su unión al genoma de VHC.

1.9. Factores que afectan la respuesta a la terapia

Una Respuesta Viroológica Sostenida (RVS) se define como aquella en la cual el ARN de VHC se negativiza durante el tratamiento y permanece indetectable por lo menos tres o seis meses después de suspender la terapia, dependiendo si se trata de la terapia con DAAs o la biterapia con IFN/RBV, respectivamente (WHO 2014; Fondo Nacional de Recursos 2018; WHO 2018b). Algunos pacientes no alcanzan esta respuesta sostenida, y pueden exhibir valores indetectables de ARN de VHC durante y al finalizar la terapia, pero éste reaparece dentro de las 24 semanas posteriores a finalizar el tratamiento. A esta situación se la denomina recaída. Adicionalmente, también existen pacientes denominados No Respondedores (NR) o sin respuesta, quienes muestran niveles de ARN de VHC detectables a lo largo de todo el tratamiento. Otra situación la representan aquellos pacientes que negativizan en algún momento durante el tratamiento, en los cuales se vuelve a detectar ARN viral antes de finalizarlo y que no corresponde con una nueva infección. Esta situación se conoce como rebrote o *breakthrough* viral (WHO 2018b).

Diferentes factores, tanto inherentes al hospedero (edad, raza, sexo, estado de lesión hepática, factores genéticos) como al virus (genotipo, mutaciones en diferentes proteínas) afectan la tasa de respuesta virológica así como la capacidad replicativa y traduccional de VHC. En algunos casos, estos factores varían dependiendo del tipo de terapia empleada.

1.9.1. Factores genéticos del hospedero

Varios polimorfismos en diferentes genes del hospedero han sido asociados con el desarrollo y la progresión de la infección por VHC, así como con la respuesta a la terapia antiviral (Imran et al. 2013; O'Brien et al. 2018; Suhail et al. 2018). De ellos, sólo se profundizará en los polimorfismos cercanos al gen de la interleuquina 28B (IL28B), actualmente denominado *IFN-λ-3*, localizado en el

cromosoma 19, ya que algunos de ellos serán foco de uno de los objetivos de esta tesis.

A partir del año 2009, estudios de asociación a escala genómica (GWASs, del inglés: *Genome-wide association studies*) revelaron la existencia de varios polimorfismos de sitio único (SNPs, del inglés: *Single-nucleotide polymorphisms*) cercanos al gen de la IL28B (*IFN-λ-3*), que se asociaban con *clearance* viral espontáneo así como con la respuesta a la terapia anti VHC con IFN/RBV (Ge et al. 2009; Suppiah et al. 2009; Tanaka et al. 2009; Thomas et al. 2009). La mayoría de estos estudios observaron estas asociaciones en pacientes infectados con VHC genotipo 1. Algunos años más tarde, investigando las causas funcionales de esas asociaciones, se descubrió la existencia del gen *IFN-λ-4* y se determinó que los SNPs descubiertos se localizan más precisamente en o cercanos a éste. Por tanto, en esta tesis se nombrarán estos SNPs como cercanos o dentro del gen *IFN-λ-4*.

Es importante recalcar que la etnia ha sido reportada como un factor del hospedero que se correlaciona con la habilidad del individuo de responder a la biterapia (Thomas et al. 2009; Muir et al. 2011). Este fenómeno ha sido parcialmente explicado por la prevalencia de estos polimorfismos del gen *IFN-λ-4* en las diferentes poblaciones (Trinks et al., 2014).

Por lo tanto, la identificación de estos polimorfismos en individuos infectados podría ser útil para discriminar aquellos con mayores probabilidades de no responder a la terapia con IFN/RBV y que podrían ser seleccionados más apropiadamente para terapias antivirales basadas en DAAs. Esto es de particular interés actualmente en nuestro país ya que, como se mencionó anteriormente, sólo los pacientes con fibrosis avanzada o con cirrosis se encuentran contemplados en las pautas de cobertura del FNR.

1.9.2. Factores genéticos virales

Las terapias antivirales para combatir la infección por VHC representan en la actualidad un gran desafío ya que, debido a la falta de actividad correctora de errores de la ARN polimerasa ARN dependiente, VHC es capaz de generar un gran número de variantes virales a lo largo de una infección, muchas de las

cuales son capaces de evadir los tratamientos. Asimismo, la gran diversidad de genotipos y subtipos complica aún más esta situación.

a. Genotipos

Las tasas de respuesta a la terapia antiviral basada en IFN están influenciadas, mayoritariamente, por el genotipo de VHC, si bien los mecanismos subyacentes que sustentan estas variaciones son aún desconocidos. Bajo tratamiento con IFN- α -peg/RBV los pacientes infectados con VHC de GT1 alcanzan tasas de RVS menores (33% - 52%) que aquellos pacientes infectados con VHC de GT2/GT3 (76% - 84%) (Pawlotsky 2003; Zeuzem 2004). Respecto a los GT4, GT5 y GT6, hay poca información disponible, pero al parecer la respuesta sostenida sería intermedia y muy variable, dependiendo del estudio realizado (Fried and Hadziyannis 2004; Nguyen and Keeffe 2005).

Por otro lado, es importante destacar que, para el caso de los DAAs, la mayoría de ellos fueron diseñados para inhibir GT1 y GT4, en especial inhibidores de NS3 y de NS5A, por lo cual no son recomendados para tratar infecciones por los otros genotipos. Esto impone una limitante, no tanto en la respuesta a la terapia *per se*, sino en la aplicabilidad de las nuevas terapéuticas. Incluso algunos regímenes que son pangentotípicos y que logran alcanzar tasas de respuesta mayores al 95% en infecciones por GT1, han evidenciado resultados subóptimos en tratamientos de infecciones por GT3, por lo cual en la actualidad, éste es considerado como el genotipo más difícil de tratar (Zoulim et al. 2015) y no el GT1 como lo era cuando el tratamiento estándar se basaba en IFN.

b. Sustituciones Asociadas a Resistencia (RASs) a DAAs

A partir de la implementación del tratamiento con DAAs, se comenzó a documentar la existencia de variantes virales asociadas a resistencia (RAVs, del inglés: *Resistance-associated variants*) tanto antes (en pacientes *naïve* al tratamiento) como durante el tratamiento con este tipo de drogas. Estas variantes se caracterizan por la presencia de una o más sustituciones puntuales que llevan a un fenotipo resistente (Sorbo et al. 2018). A estas sustituciones puntuales se las denomina sustituciones asociadas a resistencia (RASs, del inglés: *Resistance-associated substitutions*) y pueden encontrarse a nivel de las

tres proteínas blanco del tratamiento antiviral (Pawlotsky 2016; Ceccherini-Silberstein et al. 2018). También se han caracterizado múltiples polimorfismos en posiciones de RASs (RAPs, del inglés: *Resistance-associated Polymorphisms*), que se definen como cualquier cambio respecto a la secuencia de referencia para un determinado genotipo en posiciones previamente asociadas con resistencia a DAAs (Zeuzem et al. 2017).

La resistencia a DAAs está influenciada por tres parámetros principales (Pawlotsky 2011):

1. la barrera genética a la resistencia (cantidad y tipo de mutaciones nucleotídicas requeridas para adquirir una RAS desde la secuencia salvaje; varía con el tipo de droga y con el genotipo/subtipo viral);
2. el *fitness* replicativo de las poblaciones virales resistentes (determina la probabilidad de que las RAVs persistan en poblaciones mayoritarias o minoritarias dentro de la cuasiespecie viral);
3. la exposición a la droga (determina la capacidad de la droga de inhibir la replicación de las RAVs).

La resistencia natural implica que existen diferencias en la susceptibilidad a las diferentes drogas entre los diferentes genotipos y subtipos de VHC. La RAS natural más relevante a inhibidores de NS3 es Q80K (Glutamina a Lisina en la posición 80), que es muy prevalente en los subtipos 1a, 5a y 6a (Ceccherini-Silberstein et al. 2018). Esta sustitución se localiza en el dominio catalítico de la enzima NS3 y confiere resistencia principalmente al SMV (8-14 *fold change* en la concentración efectiva 50% - EC_{50} - dependiendo del genotipo) (Sorbo et al. 2018). Dado que los inhibidores de NS3 son compuestos péptido-miméticos que se unen al sitio catalítico de la enzima, las mutaciones que se localicen en ese sitio impedirán la unión de estos inhibidores. A nivel de la región NS5A se han identificado varias RASs naturales en 4 posiciones aminoacídicas (28, 30, 31 y 93) en pacientes infectados con los subtipos 1a y 1b, GT2, GT3 y GT4 (Ceccherini-Silberstein et al. 2018). Con respecto a RASs naturales a inhibidores de NS5B, se han encontrado asociadas con resistencia a DSV (posiciones 445, 553 y 556) en los GT2, GT3 y GT4 (Akaberi et al. 2018; Palanisamy et al. 2018). Además de estas RASs, que se localizan en posiciones que difieren entre

genotipos y subtipos, se ha descrito la pre-existencia de numerosas RASs en pacientes *naïve* a tratamientos con DAAs (RASs basales). El impacto de estos dos tipos de sustituciones de resistencia sobre la respuesta a la terapia puede ser mitigado por el uso de combinación de DAAs, el agregado de RBV o bien tratamientos más prolongados (Ceccherini-Silberstein et al. 2018; Sorbo et al. 2018).

En la mayoría de los pacientes que fallan al tratamiento con DAAs, la recaída se asocia frecuentemente con la emergencia de RASs durante el tratamiento. Si bien estas RASs pueden encontrarse en poblaciones mayoritarias de gran *fitness*, más frecuentemente se encuentran en poblaciones minoritarias de menor *fitness* replicativo. Estas variantes resistentes de menor *fitness*, en ausencia de secuencias “salvajes” erradicadas por las drogas, pueden prosperar (Pawlotsky 2016); no obstante tienden a ser sustituidas nuevamente por la secuencia salvaje luego de remover la presión selectiva ejercida por la terapia. Esto es lo que sucede con las RASs a inhibidores de NS3 en las posiciones 156 y 168 (Wyles 2017), mientras que el caso opuesto sucede con muchas de las RASs a inhibidores de NS5A, las cuales poseen *fitness* similares a los de las posiciones de referencia, y por ende tienden a permanecer por años luego de finalizada la terapia (Palanisamy et al. 2018).

c. Eficiencia traduccional viral

Como se mencionó anteriormente, la iniciación de la traducción mediada por IRES es diferente al inicio canónico de la traducción en eucariotas. En este último se necesita del CAP en el extremo 5' del ARNm así como de una gran cantidad de factores de inicio de la traducción (eIFs) que reclutan al ribosoma y colaboran en el escaneo hasta el codón AUG (Gale et al. 2000). Por el contrario, el IRES de VHC recluta directamente al ribosoma al codón de inicio involucrando únicamente unos pocos factores de inicio de la traducción (Pestova et al., 1998).

La conservación de la estructura del IRES determina la eficiencia de la síntesis proteica viral. Por lo tanto, tanto la estructura secundaria como la secuencia primaria pueden alterar su configuración y afectar así su función (Barría et al. 2009; Khawaja et al. 2015; Angulo et al. 2016).

Un virus con un IRES más eficiente tendría un mayor *fitness* viral, lo cual le permitiría permanecer en el hospedero aún luego de una terapia que erradique la mayoría de las variantes de la cuasiespecie. A este respecto, se ha demostrado que variantes de IRES de GT3 menos eficientes *in vitro* se correlacionan con RVS a la biterapia (IFN- α -peg/RBV) (Yasmeen et al. 2006). Sin embargo, la cantidad de mutaciones en el IRES no se asocia con la respuesta a la biterapia (Thelu et al. 2004; Vuillermoz et al. 2004; Ashraf et al. 2016; Vopálenský et al. 2018). A pesar de ello, es reconocido que los diferentes genotipos virales exhiben tasas de respuesta virológica distintas, lo cual podría correlacionar con eficiencias traduccionales diferenciales entre los distintos genotipos (Buratti et al. 1997; Collier et al. 1998). Por otra parte, existe evidencia que sugiere que la eficiencia traduccional podría influir en el tropismo celular y consecuentemente en la persistencia viral (Laporte et al. 2003; Durand et al. 2010). Esto podría deberse tanto a diferentes factores celulares que actúen interactuando con los diferentes IRES (ITAFs, del inglés: *IRES trans-acting Factors*), como a las secuencias en sí mismas, que determinen diferentes asociaciones proteína-ARN (Kamoshita et al. 1997).

A pesar del grado de conservación del IRES, se han reportado mutaciones respecto de las secuencias referencia de los diferentes genotipos y se ha encontrado que no todas impactan de igual manera en su actividad. El impacto sobre la actividad va a depender de su localización, de si hay compensación entre mutaciones, así como de la localización celular de la cual se haya extraído el ARN viral (Laporte et al. 2003; Forton et al. 2004; Barría et al. 2009).

1.10. Importancia de la investigación de esta tesis

El desarrollo y la implementación clínica de los DAAs han revolucionado el tratamiento de la infección crónica por VHC, ya que ha permitido la eliminación del virus en más del 95% de los pacientes. En este contexto cabría preguntarse entonces: ¿por qué seguir investigando en VHC?

A pesar de los grandes avances a nivel del conocimiento de este virus, así como a nivel de las nuevas terapias disponibles, existen aún grandes desafíos en lo referente al estudio de VHC. Además del alto costo de las nuevas terapéuticas,

se ha reportado la emergencia de variantes resistentes a éstas. Por otra parte, la inmunidad adquirida luego del *clearance* viral es generalmente insuficiente por lo que existe la posibilidad de reinfección con VHC. Otro de los factores a tomar en cuenta, y en el que habría que profundizar, es en entender por qué, en algunos casos, la eliminación del virus con los DAAs no elimina el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma. Por último, pero no menos importante, si queremos pensar en la erradicación a escala global de este virus, es imprescindible pensar en la generación de una vacuna efectiva (Bartenschlager et al. 2018).

Por tanto, un mayor entendimiento del rol de cada región del genoma de VHC en la respuesta al tratamiento antiviral, la comprensión de la dinámica de las poblaciones de cuasiespecies en los individuos infectados y el conocimiento de factores inherentes al hospedero que influyan en la respuesta al tratamiento, son necesarios para un manejo terapéutico integral de los pacientes así como para caracterizar parámetros que son críticos para el posible desarrollo de nuevas estrategias vacunales. Algunos de estos aspectos pretenden ser abordados a lo largo de esta tesis.

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es estudiar, por un lado, diferentes factores virales y del hospedero 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. Por otra parte, esta tesis pretende aportar conocimientos básicos sobre la biología traduccional de VHC mediante la evaluación de la eficiencia traduccional de diferentes variantes del IRES.

Para cumplir con este objetivo general, esta tesis se dividirá en 5 capítulos, cuyos objetivos específicos e hipótesis serán mencionados oportunamente dentro de cada uno de ellos:

Capítulo 1: Genotipificación de cepas de VHC a estudiar

Capítulo 2: Prevalencia de SNPs cercanos al gen *IFN-λ-4* en población uruguaya con y sin infección por VHC

Capítulo 3: Análisis de la variabilidad genética de la región NS3 y búsqueda de RASs a inhibidores de la serín-proteasa y otras sustituciones

Capítulo 4: Variantes naturales del IRES y su eficiencia traduccional viral

Capítulo 5: Caracterización de la interacción putativa entre miR-122 y el dominio IV del IRES

3. CAPÍTULO 1

GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE VHC A ESTUDIAR

3.1. Antecedentes y fundamento teórico

La identificación de los genotipos y subtipos de VHC es importante para el correcto manejo de los pacientes y una asignación apropiada del tratamiento. No solamente permite identificar la terapia con mayores probabilidades de éxito, sino que también asiste en determinar la duración de ésta, tanto si se trata de la biterapia, como de las terapias basadas en DAAs.

El método más preciso para genotipificar VHC es secuenciar el genoma completo (Trémeaux et al. 2016), sin embargo este abordaje es costoso y de difícil aplicación a gran escala. Por lo tanto, históricamente, las regiones 5'NCR y NS5B del genoma han sido las más frecuentemente utilizadas para genotipificar y subtipificar las cepas de VHC, respectivamente. Hasta la década del 2000, los métodos preferenciales para genotipificar involucraban retrotranscribir el ARN viral a ADN complementario, amplificar parcialmente la región 5'NCR por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *Polymerase Chain Reaction*):

- y subsiguientemente realizar un análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphism*);
- o bien realizar una hibridación reversa con oligonucleótidos complementarios a los diferentes genotipos y subtipos principales de VHC.

Esto permitía determinar principalmente los genotipos, y también los subtipos del GT1. Sin embargo, una mutación dentro de esa región (G107A) incorpora un nuevo sitio de restricción para la enzima *RsaI* y por tanto impide la correcta subtipificación de los aislamientos de GT1 mediante el método basado en RFLP (Colina et al. 1999; Colina et al. 2002; Gismondi et al. 2004; Gismondi et al. 2006; Moratorio et al. 2007; di Filippo et al. 2012). Paralelamente, la metodología basada en hibridación reversa de la región 5'NCR no logra identificar algunas cepas de GT6 (Daniel et al. 2017) ni tampoco diferenciar algunos subtipos dentro

del GT2 (Le Pogam et al. 1998). En consecuencia, estos resultados de genotipificación subóptimos conjuntamente con el advenimiento de tecnologías de secuenciación accesibles, provocaron que se cambiara la metodología basada en RFLP por una metodología de secuenciación directa de las regiones de interés (5'NCR y NS5B), seguida de estudios filogenéticos para genotipificar y subtipificar los aislamientos de VHC, respectivamente (Sandres-Sauné et al. 2003; Murphy et al. 2007).

También se desarrollaron métodos de hibridación reversa de segunda generación (INNO-LiPA HCV 2.0) basados en las regiones 5'NCR y core, que son capaces de subtipificar correctamente (Chevaliez et al. 2009). Uno de los últimos ensayos desarrollados para la correcta genotipificación de VHC (Cobas HCV GT de Roche) se basa en el uso de sondas fluorescentes y la amplificación por PCR en tiempo real de la región 5'NCR (para identificar GT2, GT3 y GT6), core (para identificar GT1, GT4 y GT5), y NS5B (para diferenciar los subtipos 1a y 1b). Sin embargo, también presenta problemas de asignación de algunos genotipos y subtipos, por lo cual la secuenciación directa y los análisis filogenéticos seguirán siendo necesarios (Fernández-Caballero et al. 2017; Némoz et al. 2018).

Es importante destacar que en el año 2012, momento en el que se comenzó con este trabajo, principalmente se empleaba la técnica PCR- 5'NCR-RFLP para genotipificar VHC en Uruguay, aún cuando ya existían reportes en la bibliografía que indicaban las limitaciones de esta metodología para genotipificar y subtipificar (Seme et al. 1997; Khan et al. 1997; Gismondi et al. 2004).

A pesar de contar con pocos datos oficiales respecto a la epidemiología molecular de VHC en Uruguay, algunos estudios locales han abordado la distribución de genotipos en el país, los cuales indican que el subtipo 1a es el más prevalente, seguido del subtipo 3a y luego del 1b (Colina et al. 2002; Castells et al. 2015).

3.2. Hipótesis

Diversos estudios han reportado la prevalencia del GT1 globalmente. En nuestro país, estudios previos muestran la circulación mayoritaria del GT1, con circulación de GT3 en menor frecuencia. Por lo antedicho, este trabajo espera encontrar predominancia del GT1, y en menor frecuencia GT3 entre las cepas a estudiar.

Por otra parte, si se tiene en cuenta que los métodos de genotipificación basados en la región 5'NCR han demostrado ser poco confiables para subtipificar, se espera identificar algunas muestras con asignación incorrecta de subtipos.

3.3. Objetivo Específico Capítulo 1

Determinar el genotipo de VHC de las muestras incluidas en esta tesis mediante filogenia molecular de una región de la polimerasa NS5B.

En respuesta a motivos históricos, nos planteamos además realizar estudios de señal filogenética de la región 5'NCR así como de la región NS5B, a fin de mostrar al sistema asistencial que la información filogenética de la región NS5B (a emplearse en esta tesis) es mejor para genotipificar y subtipificar aislamientos de VHC, que la que provee la región 5'NCR (empleada frecuentemente por los centros asistenciales para genotipificar).

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Muestras y consideraciones éticas

Se realizó un estudio transversal y observacional para el cual se recolectaron muestras de suero provenientes de 64 pacientes infectados crónicamente con VHC, mayores de 18 años y serológicamente negativos para el virus de la Hepatitis B. 27 muestras (una por cada paciente) fueron recolectadas consecutivamente en el año 2012 y suministradas al Laboratorio de Virología Molecular de Facultad de Ciencias por el Laboratorio de Técnicas Especializadas de la Asociación Española (ASESP) en el marco del proyecto Alianza PE_ALI_2009_1_1603 – ANII-ASESP-Facultad de Ciencias (Tabla Suplementaria 1). La ASESP es una clínica localizada en Montevideo, con centros de atención en otros departamentos del país (Canelones, San José y Maldonado). 44 muestras fueron recolectadas entre los años 2015 – 2018 y suministradas por la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas (HC), Facultad de Medicina en el marco del proyecto Fondo María Viñas FMV_1_2014_1_104171 ($n = 37$ pacientes; de 4 de ellos se obtuvo además muestra/s intra-tratamiento y/o post-tratamiento, mientras que de otros dos, se obtuvo también la muestra post-recaída) (Tabla Suplementaria 2 y Tabla Suplementaria 3). El HC también se localiza en Montevideo, sin embargo es el único centro de referencia universitario al cual son referidos pacientes provenientes de todo el país y que pertenecen a diferentes contextos socioeconómicos.

Los estudios se realizaron de acuerdo con guías éticas nacionales e internacionales (buenas prácticas clínicas y la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki) y fueron aprobados por los paneles institucionales correspondientes, por lo cual las muestras fueron tomadas bajo consentimiento informado de los pacientes. Su información personal es confidencial y su acceso fue restringido a los médicos. Aunque se cuenta con datos demográficos de los pacientes, tales como sexo y edad, no fue posible obtener información sobre el departamento de origen. Se consignaron datos de la infección como el genotipo viral presuntivo (establecido en los servicios correspondientes) y la carga viral (CV) al momento de la toma de la muestra. Sólo se cuenta con información completa sobre la terapia recibida y su respuesta, de los pacientes del Hospital

de Clínicas, 17 de los cuales eran *naïve* a todo tipo de tratamiento al momento de la toma de muestra, mientras que los restantes 20 eran recaedores a la biterapia clásica o bien a algún tratamiento con DAAs (Tabla Suplementaria 3).

3.4.2. Extracción del ARN viral

El ARN total se extrajo a partir de 140 microlitros (μ l) de suero, utilizando el kit *QIAamp Viral RNA Mini kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania), de acuerdo con instrucciones de los fabricantes. El material así obtenido, fue almacenado a -80°C , para ser utilizado en la síntesis de ADN complementario (ADNc) y posterior amplificación por PCR anidada (*nested* PCR), o bien como molde para reacciones de *One-step* PCR.

El Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias cuenta con sueros de pacientes con serología positiva para VHC de los genotipos mayoritarios que circulan en nuestro país (1a, 1b y 3), los cuales fueron utilizados como controles positivos.

3.4.3. Amplificación del IRES por One-Step PCR

A partir del ARN se realizó una PCR *One-Step* con cebadores que amplifican la región 5'NCR casi completa y los primeros nucleótidos del gen que codifica para la proteína del core, comprendiendo así la región completa del IRES (370 pares de bases – pb, nt 14 al 383) (Figura 7). Se emplearon cebadores previamente descritos (Barría et al. 2009).

La mezcla de reacción para la *One-Step* PCR se realizó en un volumen final de $30\mu\text{l}$ que contenía $15\mu\text{l}$ de Buffer (2X, contiene: sulfato de magnesio – MgSO_4 a una concentración final de 1,2 milimolar – mM, y desoxinucleótidos trifosfato – dNTPs a una concentración final de 200 micromolar - μM), $1\mu\text{l}$ de cada uno de los cebadores ($10\mu\text{M}$), $0,2\mu\text{l}$ de Ribolock ($40\text{U}/\mu\text{l}$, Thermo Fisher, Vilnius, Lituania), $0,6\mu\text{l}$ de mix de enzimas retrotranscriptasa *SuperScript III/Taq Platinum High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), $7,2\mu\text{l}$ de agua DEPC y $5\mu\text{l}$ de ARN. El ciclado de RT-PCR consistió en una incubación a 48°C por 45 minutos (min) (retrotranscripción – RT), seguida de una pre-desnaturalización a 95°C por 5min, y 40 ciclos de: 95°C por 30 segundos (seg), 58°C por 30seg y 68°C por

30seg, y finalmente una extensión final de 68°C por 10min. El amplicón generado tiene un tamaño esperado de 391pb.

3.4.4. Retrotranscripción

Para el caso de la amplificación de la región NS5B, se procedió a realizar en una primera instancia una retrotranscripción a partir del ARN extraído. 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.

3.4.5. Amplificación de una región de NS5B por PCR semi-anidada

Utilizando como molde el ADNc obtenido mediante transcripción reversa, se amplificó una región de NS5B que abarca los nt 8256 al 8641, referente a la cepa H77 (Región de Okamoto) con una PCR semi-anidada (*hemi-nested*), mediante el empleo de cebadores descritos anteriormente (Cantaloube et al. 2005) (Figura 7). Con el fin de impedir resultados falsos positivos causados por una contaminación durante la RT-*nested* PCR se siguieron estrictamente las recomendaciones de Kwok y Higuchi (1989). La mezcla de reacción del primer *Round* se realizó en un volumen final de 25µl e incluyó 2,5µl del buffer (10X), 1µl de cloruro de magnesio (MgCl₂, 50mM), 0,5µl de dNTPs, 1µl de cada cebador (NS5-1 y NS5-2), 0,3µl de la enzima *Taq platinum polimerasa* (5U/µl, Thermo Fisher, Brasil), 13,7µl de agua DEPC y 5µl de ADNc. Las condiciones de PCR para el primer *Round* fueron: 94°C por 10min, 35 ciclos de: 94°C por 45seg, 52.5°C por 45seg y 72°C por 45seg, y finalmente una extensión final de 10min a 72°C. Usando como molde 5 µl del producto del primer *Round* de PCR se realizó una re-amplificación con el mismo cebador sentido (*forward*) (NS5-1) y un cebador reverso interno (NS5-3). La mezcla de reacción se preparó con las mismas concentraciones de reactivos del primer *Round*, pero escalado a un volumen final de 50µl. El ciclado del segundo *Round* fue igual al del primero, con la salvedad de que la temperatura de hibridación de cebadores fue mayor (55°C). El amplicón generado en el segundo *round* tiene un tamaño esperado de 386pb.

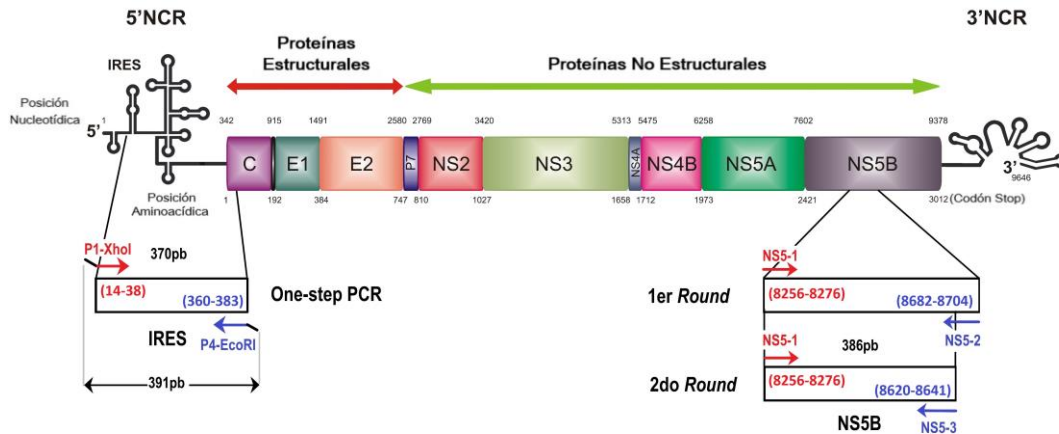


Figura 7. Esquema de la localización de los cebadores utilizados para la amplificación del IRES y una región de NS5B de VHC con fines de genotipificado. Se señalan en rojo los cebadores *forward* y en azul los cebadores reversos. Se indican los nombres, las regiones donde hibridan y el tamaño esperado de los productos, siguiendo la numeración de la cepa H77 - referencia del subtipo 1a (N° de acceso al *GenBank*: AF009606). Para la amplificación del IRES por *One-step* PCR, se muestran en barras negras diagonales los sitios de cortes de las enzimas *XhoI* y *EcoRI* incorporados en los cebadores, así como el tamaño del producto de PCR (391pb) versus el tamaño que corresponde al IRES abarcado en el mismo (370pb).

3.4.6. Visualización de productos de PCR

Los productos de PCR (IRES y NS5B parcial) fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 2% que contenían el intercalante *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Madison, USA) incorporado al gel. Posterior a la corrida, fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta, y fotografiados en un procesador de imágenes UNIVERSAL HOOD II de BIO-RAD.

3.4.7. Purificación y secuenciación de productos de PCR

Posteriormente se realizó la purificación de los productos de PCR mediante la utilización del *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania) o el *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK), según instrucciones de los fabricantes. Los productos purificados fueron enviados para su secuenciación bidireccional al Servicio de Secuenciación de Macrogen Inc (Korea) o al servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

3.4.8. Genotipificación de VHC mediante análisis filogenéticos

Con el fin de genotipificar los aislamientos provenientes de cada uno de los pacientes se realizaron los análisis filogenéticos correspondientes. Las secuencias de la región IRES y NS5B obtenidas fueron primeramente editadas con el programa *Seqman* implementado en el paquete DNASTar 5.01 (DNASTAR, Madison, USA). Posteriormente fueron alineadas las secuencias de ambas regiones por separado utilizando el programa Clustal W (Thompson et al. 1994) conjuntamente con secuencias previamente descritas de cada uno de los 8 genotipos y que fueron obtenidas de la base de datos de VHC de Los Alamos (Kuiken et al. 2005). Se descargaron 40 secuencias de genoma completo representativas de los 8 genotipos de VHC (Tabla Suplementaria 4). Se decidió descargar únicamente secuencias de genoma completo confirmadas con el objetivo de utilizar los mismos genomas para todos los alineamientos que se realizaron durante esta tesis (ver también Capítulo 3). A partir de estas secuencias, e incluyendo las obtenidas de las muestras uruguayas, se generaron en esta instancia 3 alineamientos diferentes: uno de la región del IRES completa (nucleótidos 44 al 357, 101 secuencias en total), otro de NS5B parcial (nucleótidos 8295 al 8610, 97 secuencias en total) y finalmente uno correspondiente a una región parcial del extremo 5'NCR (nucleótidos 113 al 323, 106 secuencias en total) con el fin de incorporar todas las secuencias, incluso las que resultaron ser más cortas debido a que solamente se obtuvieron cromatogramas de buena calidad a partir de un único cebador de secuenciación.

Para determinar la señal filogenética de cada uno de nuestros alineamientos, se llevaron adelante estudios de *Likelihood Mapping* (Strimmer and von Haeseler 1997), utilizando el programa Tree Puzzle v5.3 (Schmidt et al. 2002) y el algoritmo "*Quartet puzzling*". Este algoritmo permite analizar, mediante máxima verosimilitud, las tres 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 mejor modelo evolutivo que representa los datos de secuencia obtenidos utilizando el algoritmo *Find best DNA/Protein model* implementado en el software MEGA6 (Tamura 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 los 3 conjuntos de datos. La información así obtenida (valores de los diferentes parámetros, las frecuencias de nucleótidos y las tasas de mutaciones) fue utilizada para configurar los parámetros para el *Likelihood Mapping* y posteriormente el modelo fue también empleado para la construcción de los árboles filogenéticos.

Una vez determinado el modelo evolutivo y verificada la señal filogenética, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) utilizando el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013), con 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* para evaluar la robustez de cada nodo. Los árboles obtenidos se editaron mediante el programa FigTree v1.4.4 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

3.5. Resultados y discusión

Con el objetivo de determinar el genotipo de VHC de las muestras a emplear en los capítulos 3 y 4 de esta tesis, se procedió a la amplificación de dos regiones del genoma viral que históricamente han sido las más utilizadas para tales fines: el extremo 5'NCR (que contiene parcialmente al IRES) y una región del gen que codifica para la polimerasa NS5B. Además de genotipificar las cepas, se realizó el análisis de la señal filogenética de cada una de estas regiones para reafirmar que la región NS5B es la más apropiada para genotipificar y subtipificar aislamientos de VHC.

3.5.1. Características de la población estudiada

Las características demográficas de la población estudiada (pacientes VHC positivos) se detallan en la Tabla 1. Se reclutaron 64 pacientes infectados crónicamente con VHC. El 70,3% eran hombres, y presentaron una mediana de edad de 47 años (IQR: 40-55). De 45 de ellos se conocía su CV al momento de toma de muestra, cuya mediana correspondió a 6,0 log₁₀ UI/mL (IQR: 5,2-6,5). De un considerable porcentaje de pacientes se desconocía si habían sido tratados o si estaban co-infectados con VIH. Aproximadamente la mitad de los pacientes con información de tratamiento, eran *naïve* al momento de toma de muestra, y solamente 3 habían sido previamente tratados con algún régimen con DAAs (y eran NR a éste). Los análisis genotípicos de VHC, realizados por los centros asistenciales o de manera tercerizada, mostraron predominancia del GT1 en la cohorte de individuos (88,0% de las muestras genotipificadas). Sin embargo, se destaca el gran número de pacientes para los cuales no se había determinado el genotipo ($n = 14$, 21,9%). Es de hacer notar, que, como fue mencionado anteriormente, 8 pacientes comenzaron tratamiento con DAAs durante el desarrollo de este trabajo, y de 4 de ellos fue posible obtener muestras tomadas durante y posterior a la finalización del mismo (Tabla Suplementaria 3), mientras que otros dos recayeron a la terapia y pudo obtenerse la muestra post-recaída. La información sobre estas muestras no se incluye en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de la población estudiada.

Característica	número (%) de pacientes n=64
Sexo	
Masculino	45 (70,3)
Femenino	19 (29,7)
Edad (años), mediana (IQR) ^a	47 (40-55)
Genotipo de VHC ^b	
GT1	1 (1,6)
GT1a	24 (37,5)
GT1b	19 (29,7)
GT3a	6 (9,4)
ND	14 (21,9)
CV (log ₁₀), mediana (IQR) ^c	6,0 (5,2-6,5)
Tratamiento ^d	
Naïve	22 (34,4)
Con IFN y RBV	26 (40,6)
Con DAAs	3 (4,7)
ND	13 (20,3)
Co-infección con VIH	
Si	3 (4,7)
No	33 (51,6)
ND	28 (43,8)
Origen ^e	
ASESP	27 (42,2)
HC	37 (57,8)

Nota: No se incluyen los datos correspondientes a las muestras intra o post-tratamiento

^a IQR: Rango intercuartil

^b Según informado por los centros asistenciales

^c Calculado a partir de 45 muestras con CV por arriba del límite de cuantificación

^d Con IFN y RBV: IFN/RBV ó IFN- α -peg/RBV; Con DAAs: IFN- α -peg/RBV/TVR ó Viekira Pak

^e ASESP: Asociación Española; HC: Hospital de Clínicas

ND: No determinado

3.5.2. Amplificación y secuenciación de las regiones de interés (IRES y NS5B parcial)

De un total de 64 pacientes, la muestra del paciente 986 no fue amplificable mediante ninguno de los abordajes. La región IRES completa (posición 44 al 357, total 314nt) pudo amplificarse y secuenciarse exitosamente en 58 de los restantes. Aunque otras 4 muestras fueron también amplificables, las secuencias obtenidas fueron más cortas (posición 113 al 323, total 210nt, IRES incompleto) debido, principalmente, a cromatogramas de mala calidad a partir de uno de los cebadores de secuenciación (muestras 37, 1003, 1010 y 2035).

La amplificación de la región de Okamoto de NS5B fue exitosa en 55 de los 63 aislamientos amplificables. De las 8 muestras que no pudieron ser amplificadas, 7 presentaban una CV debajo del límite de detección (987, 988, 1001, 1012,

1014, 2035 y 2047) (ver Tabla Suplementaria 1). La muestra restante (paciente 19) sólo amplificó la región IRES.

Adicionalmente, las dos muestras provenientes de pacientes recaedores (muestras 38_27recaída y 42_18recaída) para los cuales se contaba con la muestra pre-tratamiento, también amplificaron ambas regiones sin problemas. Incluir estas muestras en los análisis filogenéticos cumplía con el objetivo de intentar descartar una reinfección con una cepa diferente. Tanto los IRES en ambos casos, como también la NS5B del paciente 18, revelaron ser idénticos al comparar las muestras pre-tratamiento y post-recaída. Sin embargo, las secuencias de NS5B correspondientes al paciente 27 difirieron ligeramente. La muestra basal reveló 7 sitios polimórficos, mientras que la muestra post-recaída exhibió un único nucleótido en cada uno de esos sitios. Estos resultados sugieren que el paciente 18 sufrió efectivamente una recaída, mientras que en el caso del 27 esto no puede asegurarse. De todos modos podría tratarse de la misma cepa y que los cambios en secuencia sean consecuencia de la presión ejercida por la droga.

Cabe mencionar que, a pedido de los médicos del HC, se intentaron amplificar también las muestras intra y post-tratamiento, a modo de contar con otro método para detectar ARN viral además de los empleados por los servicios tercerizados. De éstas, dos no pudieron ser amplificadas con ninguno de los abordajes (36_15d y 37_7d), ambas tomadas durante el tratamiento con DAAs (Viekira Pak), de pacientes que alcanzaron una RVS. Sin embargo, a pesar de que la región NS5B tampoco amplificó en las restantes 3, la región IRES sí pudo amplificarse de manera exitosa (IRES completo: 25_7d y 39_7d; IRES incompleto: 39_post). Lo interesante respecto a estos otros dos pacientes, es que también fueron tratados con Viekira Pak y alcanzaron una RVS. Los geles revelaron que la intensidad de las bandas eran apreciablemente menores que la del control positivo, y aunque la *One-step* PCR empleada no es cuantitativa, la diferencia en intensidad podría sugerir menor cantidad de ARN de partida (datos no mostrados). Es importante aclarar que se descartó que fuera una contaminación durante la PCR ya que no había presencia de banda en el control negativo. Por otra parte, el análisis de las secuencias reveló de 0 a 2 cambios con respecto a las secuencias de sus correspondientes muestras pre-

tratamiento. En los casos donde se constataron cambios, éstos no se correspondieron con los de ninguna otra muestra, lo cual también descarta una posible contaminación cruzada.

En el caso del paciente 39 (de quien se contaba con la muestra post), el ARN viral fue, por tanto, detectable a lo largo y al final del tratamiento (EOT, del inglés: *End of Treatment*). Algunos reportes señalan que los fenómenos, donde se detecta ARN viral al final de un tratamiento exitoso, son relativamente frecuentes (6-7%) aún en terapias tan efectivas como las que incluyen DAAs (Childs-Kean and Hong 2017; Malespin et al. 2017; Maasoumy et al. 2018). Estas situaciones se han explicado por la disponibilidad de ensayos cualitativos que se han tornado altamente sensibles (con límites de detección entre 12 y 15 UI/mL), por la existencia de viriones residuales que son posteriormente eliminados por el sistema inmune innato del paciente, o bien por la detección de ARN viral de partículas no infectivas (McGivern et al. 2014).

A la luz de estos reportes y de lo hallado en este trabajo, cabría cuestionarse si los métodos de detección utilizados serían los más apropiados, ya que las investigaciones que reportan detección de ARN viral durante y al EOT aún en casos de RVS, refieren al uso de COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (Roche), o al *RealTime HCV assay* (Abbott), los cuales detectan únicamente la amplificación de la región 5'NCR.

Otros autores ya han reportado la discrepancia en la capacidad de amplificar diferentes regiones del genoma de VHC. Particularmente se ha descrito la dificultad de amplificar NS5B en muestras de baja carga, mientras que otras regiones como el 5'NCR o E1 amplifican sin problemas (Cantaloube et al. 2006; Murphy et al. 2007; Hara et al. 2013). Por una parte, esto podría explicarse por una diferencia en la eficiencia de los cebadores utilizados, mientras que también podría ser consecuencia de la inequidad en la cantidad de moléculas de ARN completas (que incluyan la región NS5B) versus moléculas truncadas que sean resultado de una replicación del genoma viral incompleta. Esto implicaría que existirían en una muestra dada, mayor cantidad de moléculas correspondientes al extremo más 5' del genoma, que, por estar sobre-representadas serían más fácilmente detectables aún en pacientes con baja CV.

En suma, se obtuvieron 62 secuencias correspondientes al IRES completo y 67 correspondientes a una región del extremo 5'NCR (dos de ellas, provenientes del paciente 39 resultaron idénticas y fueron posteriormente consideradas una única vez). Por otra parte, se obtuvieron 57 secuencias correspondientes a la región NS5B (provenientes de 55 pacientes).

3.5.3. Análisis de la señal filogenética por *Likelihood Mapping*

Con el objetivo de reafirmar que los sets de secuencias a utilizar diferían en la señal para inferir relaciones filogenéticas, y que esto podría ser motivo de una asignación incorrecta de genotipos/subtipos al emplearse la región 5'NCR para estos fines, se siguió el método denominado *Likelihood Mapping* (ver sección 3.4.8 de Materiales y Métodos, pág. 33) y se ajustaron los parámetros a aquellos que correspondieran con el modelo evolutivo que mejor explicara los datos de cada alineamiento, el que resultó ser en cada caso el modelo GTR + γ + I (*General Time Reversible* + distribución gamma + sitios invariables).

En este punto se trabajó con 3 sets de datos que contenían los alineamientos de 40 secuencias representativas de los 8 genotipos de VHC y las secuencias Uruguayas: IRES (314nt, con 61 secuencias uruguayas), NS5B (316nt, con 57 secuencias uruguayas), y además un set de datos correspondiente a una región del extremo 5'NCR que permitiera incluir aquellas muestras para las cuales las secuencias eran más cortas (210nt, con 66 secuencias uruguayas). Como puede observarse en la Figura 8, el alineamiento del IRES muestra muchos puntos distribuidos en el centro del triángulo (árboles sin resolver) y solamente el 63,1% corresponden a árboles correctamente resueltos (Figura 8A). Por el contrario, el alineamiento de NS5B parcial, de un largo comparable al de la región IRES, presenta un valor de árboles definidos mayor a 80,0% (87,3%), reafirmando la robustez de ese set de datos para la inferencia de relaciones filogenéticas (Figura 8B). Por otra parte, el alineamiento del extremo 5'NCR (210nt) resultó aún menos informativo que los anteriores (57,0%) (datos no mostrados). Esto no sorprende ya que las regiones del extremo 5' son altamente conservadas, haciéndolas inapropiadas para poder diferenciar linajes que varíen muy poco entre ellos. Esta característica, poco deseable para subtipificar, es esencial para la detección de este virus.

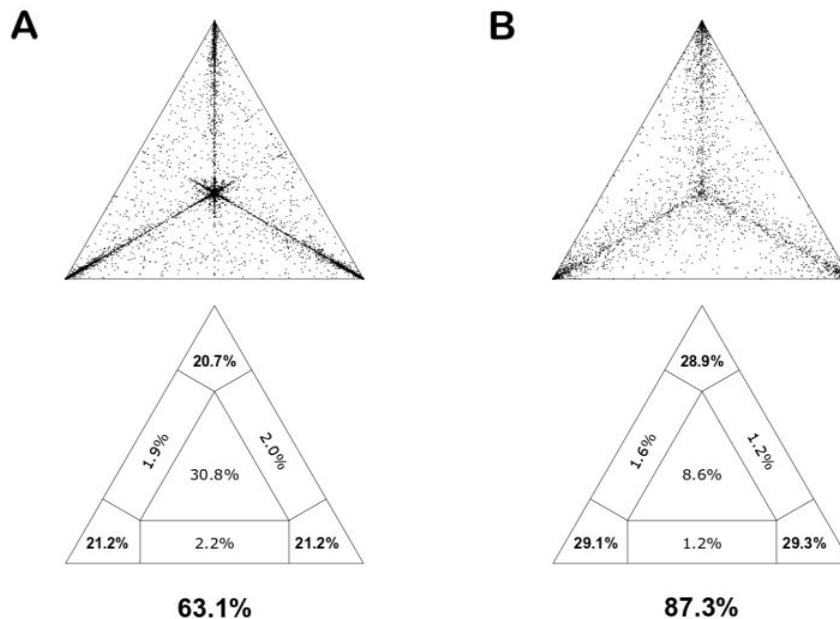


Figura 8. Análisis de Likelihood Mapping para las regiones analizadas. A) IRES (314nt): Análisis realizado sobre el alineamiento correspondiente a los nucleótidos 44 al 357 del genoma de VHC (referente a la cepa H77). El alineamiento comprendía 40 secuencias representativas de los 8 genotipos de VHC (**Tabla Suplementaria 4**) y 61 secuencias de las muestras uruguayas. **B)** NS5B parcial (316nt): Análisis realizado sobre el alineamiento correspondiente a los nucleótidos 8295 al 8610 del genoma de VHC (referente a la cepa H77). El alineamiento comprendía 40 secuencias representativas de los 8 genotipos de VHC (**Tabla Suplementaria 4**) y 57 secuencias de las muestras uruguayas. Ambos análisis de *Likelihood Mapping* [implementado en el programa Tree Puzzle v5.3 (Schmidt et al. 2002)] fueron realizados 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).

Es relevante mencionar que, si bien la señal filogenética de estas regiones ya ha sido estudiada anteriormente (Salemi and Vandamme 2002), era importante poder corroborar con los sets de datos que se utilizarían en esta tesis, ya que el número de secuencias y el largo diferían de lo reportado.

En suma, la señal filogenética contenida en la región de NS5B amplificada y secuenciada es suficiente para inferir relaciones filogenéticas, mientras que el IRES o la región 5'NCR, como ya fue reportado, son inadecuadas para tales fines.

3.5.4. Árboles filogenéticos y genotipificación

A continuación se procedió a realizar árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013) bajo el modelo evolutivo GTR + γ + I previamente

determinado, con 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* como medida de robustez de cada nodo. Se emplearon los mismos alineamientos del IRES y NS5B que se utilizaron para determinar la señal filogenética. Si bien se demostró que el IRES no sería adecuado, se decidió realizar el árbol a modo de evidenciar la carencia de sitios informativos y, consecuentemente, la incapacidad para genotipificar y subtipificar, y de este modo aportar esta información al ámbito asistencial. Es importante recalcar que, a pesar de contar con el dato del genotipo proveniente de los centros asistenciales para la mayoría de las muestras, sus métodos de genotipificación no incluyeron estudios de filogenia molecular.

En la Figura 9 se muestra el resultado obtenido para la región IRES (nt 44 al 357). Como se desprende de la figura, algunos genotipos (GT1 y GT6), no se definen como clados monofiléticos. Por otra parte, de los que sí lo son, no todos se encuentran apoyados por valores de *bootstrap* altos (mayor a 0,70). Solamente se definen con buen apoyo estadístico los nodos correspondientes a los GT3, GT4, GT7 y GT8, así como algunos subtipos del GT2. Esta región, por tanto, solamente permite genotipificar certeramente 5 muestras uruguayas, las cuales agrupan en el clado correspondiente al subtipo 3a (05, 982, 991, 1016 y 1017). La muestra 09 parece agrupar con el GT3 pero más ancestralmente y con poco apoyo estadístico (<0,70 de *bootstrap*).

En conclusión, si se considera tanto la topología del árbol, como el resultado del análisis de *Likelihood Mapping*, no se puede realizar una correcta asignación de algunos genotipos a partir de la región del IRES, en particular GT1 y GT6. Esta situación ya ha sido reportada por Hraber *et al.*, (2006), quienes evaluaron las filogenias a partir de genomas completos, la región 5'NCR y la región NS5B para determinar su aplicabilidad para clasificar genotipos y subtipos. Los autores llegaron a la conclusión de que el extremo 5'NCR no contiene suficiente información que permita la asignación de subtipos virales, y en consecuencia, falla en distinguir genotipos de manera confiable.

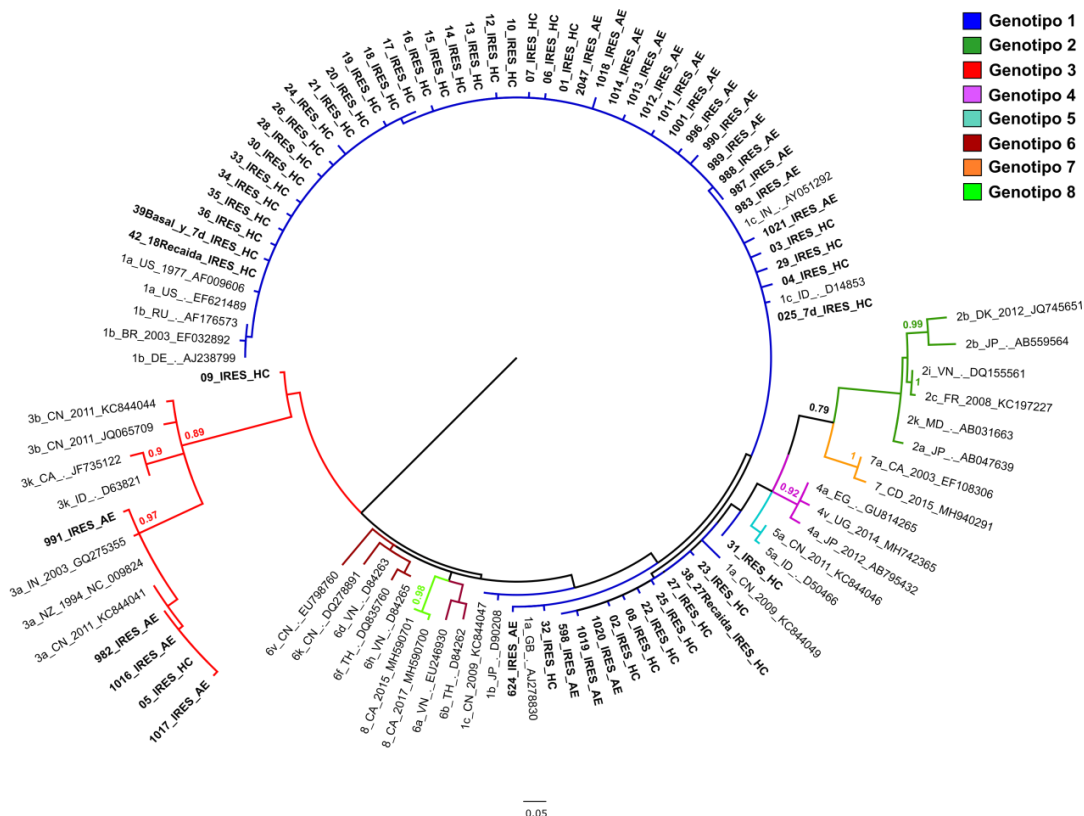


Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región del IRES (314nt) del genoma de VHC. Se utilizó el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013) bajo el modelo de evolutivo GTR + γ + I, con 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* como medida de robustez de cada nodo. El árbol se realizó a partir de la región del IRES (desde la posición 44 a la 357 del genoma de VHC), e incluye 40 secuencias representativas de cada uno de los 8 genotipos de VHC (Tabla Suplementaria 4) y 61 secuencias provenientes de las muestras uruguayas. Las secuencias de referencia se indican con el genotipo, el país de aislamiento (código de 2 letras), el año de aislamiento (si es desconocido se indica con un punto) y el número de acceso del *GenBank*. Las muestras uruguayas incluidas en esta tesis se indican en negrita con el número de la muestra, la región (IRES) y el origen (AE: Asociación Española; HC: Hospital de Clínicas). Con diferentes colores se indica cada uno de los genotipos. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* para aquellos nodos con valores mayores al 70% (0,70).

Contrario a lo evidenciado con la región no codificante, la región NS5B amplificada, como fue sugerido por los estudios de *Likelihood Mapping*, evidencia mayor capacidad de discriminar los genotipos (Figura 10). Todos los genotipos se agrupan en clados separados apoyados por altos valores de *bootstrap*, lo que permite realizar una excelente asignación de genotipos y subtipos principales, como puede ejemplificarse con los subtipos del GT1 o del GT3 (Figura 10), dentro de los cuales agrupan las muestras uruguayas.

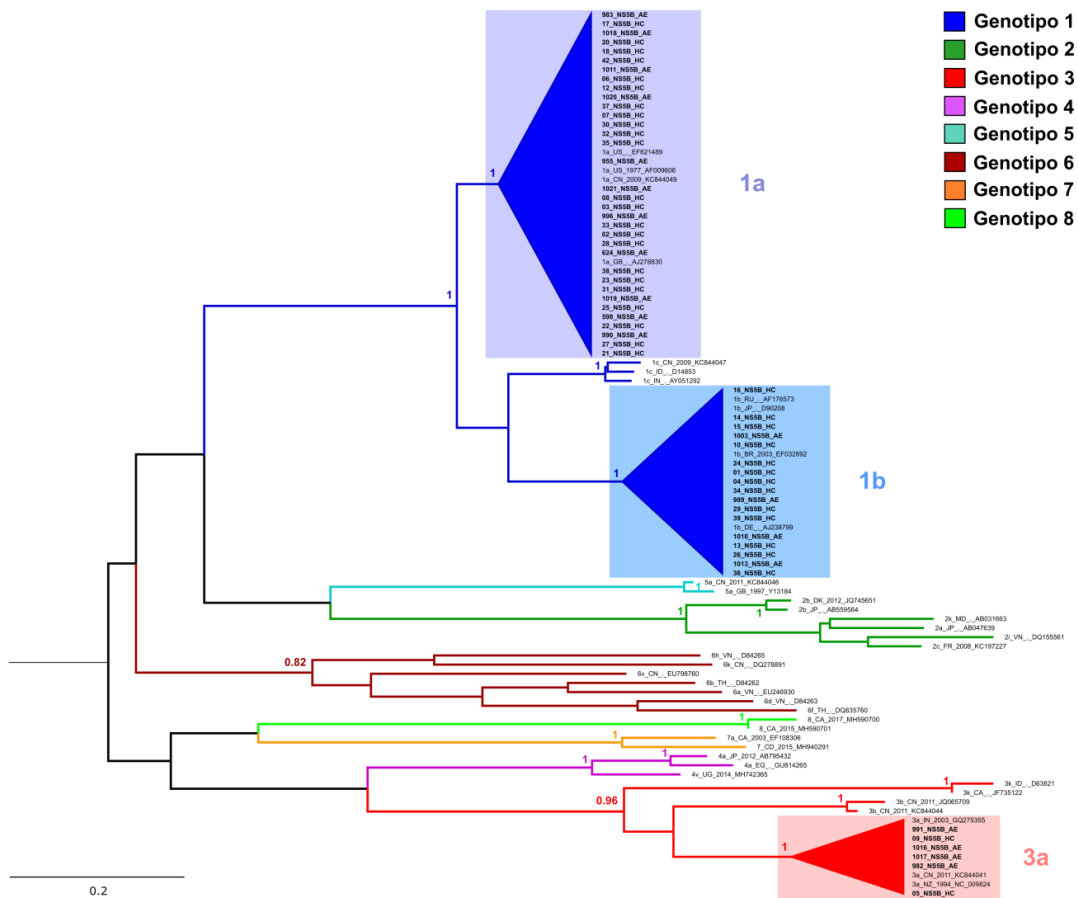


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región NS5B parcial (316nt) del genoma de VHC con subtipos de interés condensados. Se utilizó el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013) bajo el modelo de evolutivo GTR + γ + I, con 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* como medida de robustez de cada nodo. El árbol se realizó a partir de una región de NS5B (desde la posición 8295 a la 8610 del genoma de VHC), e incluye 40 secuencias representativas de cada uno de los 8 genotipos de VHC (Tabla Suplementaria 4) y 57 secuencias provenientes de las muestras uruguayas. Las secuencias de referencia se indican con el genotipo, el país de aislamiento (código de 2 letras), el año de aislamiento (si es desconocido se indica con un punto) y el número de acceso del *GenBank*. Las muestras uruguayas incluidas en esta tesis se indican en **negrita** con el número de la muestra, la región (NS5B) y el origen (AE: Asociación Española; HC: Hospital de Clínicas). Con diferentes colores se indica cada uno de los genotipos. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* para aquellos nodos con valores mayores al 70% (0,70) y que refieren a los genotipos y los subtipos principales. Los subtipos de interés se muestran condensados e iluminados (1a en lila, 1b en celeste, 3a en rojo suave).

De las 55 muestras analizadas, 32 evidenciaron la presencia de VHC de GT1a (58,2%), 17 fueron GT1b (30,9%) y 6 GT3a (10,9%) (Tabla Suplementaria 5). Además, las dos muestras post-recaída evidenciaron corresponder al mismo subtipo que sus correspondientes muestras basales (1a). Por otra parte, las muestras provenientes de 8 pacientes no pudieron ser genotipadas ya que no se obtuvo amplificación de la región NS5B.

Es importante destacar que la secuenciación de dos regiones del genoma que se encuentran distantes entre sí, seguida de estudios de filogenia molecular, es una forma de aproximarse a la detección de recombinación (la que se evidencia por resultados de árboles incongruentes entre ambas regiones) (Pérez-Losada et al. 2015). Los resultados de los estudios filogenéticos permiten afirmar con certeza que las muestras de subtipo 3a no son recombinantes ya que existe congruencia entre ellos en la asignación de ese genotipo. Sin embargo, para las muestras de GT1 no se puede afirmar con certeza que no exista (ya que con la región 5'NCR fue imposible la genotipificación de las muestras de GT1).

Frecuentemente se ha reportado la asignación incorrecta de genotipos y subtipos a partir de técnicas basadas en la región 5'NCR (Ross et al. 2000; Chen and Weck 2002; Hraber et al. 2006; Chevaliez et al. 2009; Guelfo et al. 2014; Chueca et al. 2016; Fernández-Caballero et al. 2017; Neukam et al. 2017; Daniel et al. 2017; Némoz et al. 2018), llegando a clasificaciones erróneas de importancia en 1 – 15,0% de los aislamientos, dependiendo de la técnica o kit comercial utilizado. Mayoritariamente la falla se centra en la no distinción entre GT1 y GT6, así como en la subtipificación entre 1a y 1b, errores que se clasifican como importantes. Interesantemente, en las muestras estudiadas en este trabajo, también se detectaron algunas discordancias en la asignación de genotipos entre el asignado en el centro asistencial/servicio tercerizado y el determinado en esta tesis (Tabla Suplementaria 6), alcanzando al 21,8% de las muestras genotipificadas (3 muestras fueron incorrectamente subtipificadas como 1a en vez de 1b, mientras que otras 9 fueron erróneamente asignadas al subtipo 1b cuando en realidad eran 1a). Lamentablemente, debido a que no se dispone de los métodos de genotipificación de aquellas que provienen del Hospital de Clínicas, no se puede profundizar sobre este aspecto. Sin embargo, el método de genotipificación de las muestras de la ASESP en el año 2012, y hasta comienzos del 2018, era el de RT-PCR de la región 5'NCR seguido de RFLP, el cual reveló ser bastante ineficiente a tales fines ya que 7 muestras de las 19 genotipificadas (36,8%) por este método rindieron resultados discordantes con la filogenia de NS5B (ver Tabla Suplementaria 1 y Tabla Suplementaria 6). Para las muestras del HC este porcentaje es bastante menor (13,9% - 5 de 36

genotipificadas por métodos comerciales) (ver Tabla Suplementaria 2, Tabla Suplementaria 3, y Tabla Suplementaria 6).

Los ensayos de genotipificación de VHC comerciales actuales se basan en diferentes estrategias (secuenciación del ADNc, hibridación reversa y PCR en tiempo real) y utilizan diferentes regiones genómicas de VHC como blanco (5'NCR, Core y NS5B), sin embargo la mayoría se basan parcial o totalmente en el extremo 5'NCR y no interrogan la región NS5B con el apoyo de análisis filogenéticos, que se considera el método de referencia (Hnatyszyn 2005). Por tanto, aún sin saber con exactitud cuál o cuáles kits comerciales se utilizaron, es claro que la región 5'NCR no es óptima para genotipificar por lo cual los métodos de genotipificación comerciales deberían de involucrar siempre la detección de otra región que permita una mejor resolución, tal como la NS5B, pero incluyendo estudios de filogenia molecular para una asignación correcta. Es cierto que saber el genotipo de VHC era clínicamente muy importante en la era de la terapia con IFN y RBV ya que la respuesta a ésta y la progresión de la enfermedad difería entre los distintos genotipos, y afectaba de este modo la duración recomendada del tratamiento. A pesar de que uno estaría tentado a pensar que esta característica ha perdido un poco la importancia con el advenimiento de los DAAs pangenotípicos, este no es el caso ya que sigue siendo relevante para determinar qué drogas emplear, la duración de los regímenes y si es recomendable combinarlo con ribavirina (Fondo Nacional de Recursos 2018; WHO 2018b).

3.6. Conclusiones

- En el presente capítulo se logró determinar el genotipo de 55 aislamientos uruguayos de VHC provenientes de pacientes crónicamente infectados. La mayoría de las muestras pertenecen al GT1 (89,1%: 58,2% subtipo 1a y 30,9% subtipo 1b) mientras que las restantes corresponden al GT3a (10,9%).
- Se confirmaron resultados previos, y se demostró que la región de la polimerasa NS5B utilizada para genotipificar y subtipificar las muestras, evidenció una muy buena señal filogenética.
- El porcentaje de aislamientos erróneamente subtipificados en los centros asistenciales (mediante kits comerciales o la técnica de PCR-RFLP del extremo 5'NCR) es alto (21,8%), lo cual reafirma la necesidad de confirmar los genotipos y subtipos mediante análisis de filogenia molecular de regiones con suficiente señal filogenética como lo es la NS5B.

4. CAPÍTULO 2

PREVALENCIA DE SNPs CERCANOS AL GEN *IFN-λ-4* EN POBLACIÓN URUGUAYA CON Y SIN INFECCIÓN POR VHC

4.1. Antecedentes y fundamento teórico

A pesar del desarrollo reciente de compuestos altamente efectivos, diseñados para bloquear específicamente la replicación de VHC (denominados DAAs), la combinación de IFN- α -peg y RBV es aún la opción principal para el tratamiento en varios países, y al inicio de esta tesis, también lo era en Uruguay. Adicionalmente, aunque el FNR ha incluido la cobertura de terapias con DAAs, al presente, este apoyo se encuentra dirigido exclusivamente a personas con estado avanzado de fibrosis o bien a aquellas que ya hayan desarrollado cirrosis (Fondo Nacional de Recursos 2018). Esto significa que pacientes con hepatitis C crónica en estados menos críticos se ven ante la situación de optar entre pagar una terapia costosa (DAAs) pero muy efectiva, o una terapia más económica (biterapia) pero que puede acarrear diversos efectos secundarios y cuya tasa de respuesta es subóptima, en particular en aquellos pacientes infectados con el GT1 (Hernandez et al. 2010), el más prevalente en nuestro país (Castells et al. 2015). Esta pobre respuesta conjuntamente con la ocurrencia de efectos secundarios severos (Manns et al. 2006) resaltan la relevancia de poder predecir la respuesta viral del paciente al tratamiento. Esto permitiría la selección del tratamiento más adecuado para cada paciente, tanto desde el punto de vista de su efectividad como de su costo. Como ya se mencionó, se han descrito diversos predictores de RVS a la biterapia (IFN- α -peg/RBV), algunos de los cuales refieren al virus (genotipo, CV), y otros al hospedero (edad, sexo, raza, estado de fibrosis hepática, factores genéticos) (Cornberg et al. 2012).

Dentro de los factores del hospedero que se asocian a la respuesta al tratamiento, SNPs específicos localizados en el cromosoma 19 q13.12, cercanos al gen que codifica para IL28B (actualmente conocido como *IFN-λ-3*), han mostrado estar relacionados significativamente tanto con el *clearance* viral espontáneo como con la respuesta a la biterapia (Ge et al. 2009; Suppiah et al.

2009; Tanaka et al. 2009; Thomas et al. 2009). Dentro de estos primeros SNPs descritos, se destacan (Figura 11A):

- a. **rs8099917 – T>G**: localizado en la región intergénica entre *IFN-λ-4* e *IL28A* (*IFN-λ-2*). El alelo T fue el que mostró mayor evidencia de asociación con RVS (Suppiah et al. 2009), mientras que el genotipo GG (no favorable) se asocia con la no respuesta (Tanaka et al. 2009).
- b. **rs12979860 – C>T**: localizado 3 Kb río arriba del gen de *IL28B* (*IFN-λ-3*) y dentro de un intrón del gen *IFN-λ-4*. El genotipo CC (favorable) evidenció una mayor tasa de RVS (Ge et al. 2009). Además, la frecuencia de este genotipo favorable se encontró en una proporción significativamente mayor en individuos que resolvieron la infección espontáneamente en comparación con individuos infectados, lo que sugiere una asociación entre el alelo C y una mayor tasa de eliminación natural de VHC (Thomas et al. 2009).

Es importante mencionar que algunos años más tarde, investigando las causas funcionales de esas asociaciones, se descubrió la existencia del gen *IFN-λ-4* y consecuentemente se describieron otros dos polimorfismos que se asocian a la respuesta a la terapia con IFN/RBV, y que, a diferencia de los anteriores, se localizan en los exones (Figura 11B) (Prokunina-Olsson et al. 2013). El rs117648444 – P70S es un polimorfismo no sinónimo (exón 2) (Terczyńska-Dyla et al. 2014). La variante dinucleotídica rs368234815 – ΔG>TT (exón 1) resulta en una proteína completa cuando presenta la delección, mientras que la presencia de TT genera un cambio en el marco de lectura que bloquea la expresión de este interferón. Una vez descubierto el gen *IFN-λ-4*, se determinó que los polimorfismos rs12979860 y rs8099917 se localizan más precisamente en o cercanos a éste, pero la mayoría de la bibliografía sigue refiriéndose de forma errónea a su cercanía al gen de la *IL28B* (*IFN-λ-3*).

A fines de nombrarlo correctamente, en esta tesis se mencionarán según el conocimiento actual (cercanos al gen *IFN-λ-4*). Usualmente rs368234815 – ΔG y rs12979860 – T (haplotipo desfavorable) se heredan juntos (alto grado de desequilibrio de ligamiento) (Prokunina-Olsson et al. 2013), motivo por el cual rs12979860 puede utilizarse como representativo del anterior. En consecuencia, y teniendo en cuenta que son además los más estudiados globalmente, los dos SNPs estudiados en esta tesis son rs8099917 y el rs12979860 (Figura 11A).

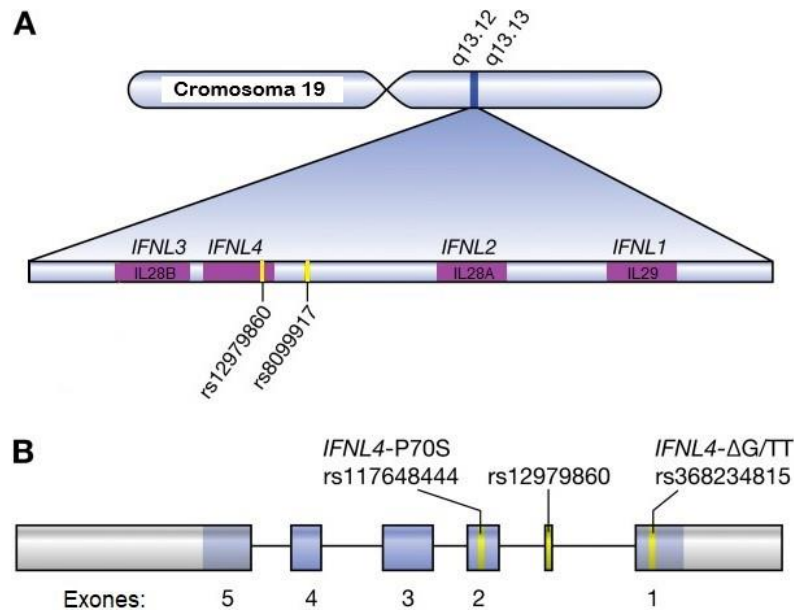


Figura 11. Polimorfismos del hospedero asociados con la respuesta a la terapia con interferón y ribavirina. A) SNPs dentro o cercanos al gen *IFN- λ -4* (*IFNL4*) identificados en GWASs como marcadores de *clearance* viral. En recuadros violetas se indican los diferentes genes que codifican para interferones λ , antiguamente denominados interleuquinas 28A, 28B y 29. **B)** Polimorfismos dentro del gen *IFN- λ -4*. rs117648444 y rs368234815 se localizan en exones, mientras que rs12979860 se localiza en un intrón (modificado de O'Brien et al. 2018).

Los pacientes que portan los genotipos de “buena respuesta” o favorables (alelo mayor en homocigosis: rs12979860 – CC ó rs8099917 – TT) tienen mayores probabilidades de resolver la infección espontáneamente que aquellos que portan los genotipos de “mala respuesta” o desfavorables (alelo menor o de riesgo, tanto en homocigosis como en heterocigosis). Este fuerte valor predictivo es aplicable principalmente a pacientes infectados con GT1 o GT4 (Rauch et al. 2010; Thompson et al. 2010). En casos de infección con GT2 o GT3, se han hallado resultados contradictorios, sin embargo parecería ser que la información sobre estos SNPs es valiosa para pacientes infectados con GT3 con niveles detectables de VHC en la semana 4 (lo que corresponde con ausencia de respuesta virológica rápida) (Mangia et al. 2010; Wiegand et al. 2015), mientras que jugaría un rol más bien marginal en el manejo de pacientes infectados con GT2 (Mangia et al. 2013).

Interesantemente, aunque con menor valor predictivo, la genotipificación de estos SNPs en el gen *IFN- λ -4* ha demostrado ser relevante para anticipar RVS también en regímenes con DAAs, ya sea en combinación con IFN (Holmes et al.

2012; Barreiro et al. 2013; About et al. 2015; Calisti et al. 2015; D'Offizi et al. 2017), o bien en regímenes libres de IFN (Lawitz et al. 2013; O'Brien et al. 2014; Akuta et al. 2017), posibilitando acortar la duración de los tratamientos. Las variantes favorables también se han asociado a la protección contra la anemia inducida por RBV en pacientes tratados con DAAs combinados con esta droga (Vasanthakumar et al. 2018). A pesar de estos resultados alentadores, también existen reportes que no encuentran asociación entre estos SNPs y la respuesta a la terapia libre de IFN (Arias et al. 2017; Naggie et al. 2017).

La etnia (raza) es asimismo un factor del hospedero que correlaciona con la habilidad del paciente para responder al tratamiento antiviral (Thomas et al. 2000; Muir et al. 2011), incluso en esta nueva era de DAAs (Benhammou et al. 2018). Este fenómeno ha sido parcialmente explicado por la prevalencia de los polimorfismos en el gen *IFN-λ-4* dentro de diferentes grupos étnicos (Trinks et al. 2014a). Por ejemplo, el alelo favorable de rs12979860 (C) en población general se encuentra en una frecuencia de 0,23 – 0,55 en población africana, de 0,53 – 0,80 en población europea y de 0,66 – 1,00 en población asiática (Rajeevan et al. 2012). En este contexto, los individuos asiáticos y europeos son mejores respondedores al tratamiento con IFN-α-peg/RBV que los de ascendencia africana (Muir et al. 2011). La situación en Latinoamérica es menos clara ya que la prevalencia de estos polimorfismos sólo se conoce en unos pocos países (Ridruejo et al. 2011; Venegas et al. 2011; Cavalcante et al. 2012; Martínez-Gómez et al. 2012; Angulo et al. 2013; Trinks et al. 2014b; Bertol et al. 2015). Más aún, dado el origen genético mixto de las poblaciones latinoamericanas, es ilógico asumir distribuciones equivalentes en todos los países. De hecho, cuando se comparan las diferentes poblaciones, se observan grandes diferencias en las frecuencias alélicas de estos SNPs (Rajeevan et al. 2012). En cuanto a la población uruguaya, también exhibe ancestría mixta, con contribución europea, amerindia y africana. Aunque históricamente se ha asumido, y luego se ha confirmado por métodos moleculares, que la mayor contribución es europea, el aporte de poblaciones amerindias y africanas parece ser muy variable, pero no insignificante, a lo largo de diferentes departamentos del país, destacando la heterogeneidad de nuestra población (Salzano and Sans 2014).

4.2. Hipótesis

Siendo que los SNPs cercanos al gen que codifica para el IFN- λ -4 no sólo han sido asociados con respuesta a la biterapia, sino también con *clearance* viral espontáneo, es esperable que los genotipos desfavorables se encuentren más frecuentemente en los pacientes infectados crónicamente por VHC, y que lo contrario ocurra en los individuos no infectados.

Por otra parte, si se considera que nuestra población tiene ascendencia mayoritariamente europea, se espera que las prevalencias se asemejen a las reportadas para esas poblaciones de ascendencia caucásica.

Adicionalmente, se espera poder confirmar la asociación entre RVS y los genotipos favorables de estos SNPs en población uruguaya crónicamente infectada por VHC y tratada con biterapia.

4.3. Objetivos Específicos Capítulo 2

Objetivo Específico 2a: Determinar la prevalencia de los polimorfismos cercanos al gen *IFN- λ -4* (antiguamente denominados como cercanos al gen de la IL28B), que influyen en el *clearance* viral y la respuesta a la terapia con IFN- α -peg/RBV (rs8099917 – T>G y rs12979860 – C>T), en pacientes uruguayos crónicamente infectados por VHC y compararla con la distribución en una población control (individuos no infectados). Asimismo, comparar estas prevalencias con las reportadas en otras poblaciones.

Objetivo Específico 2b: Evaluar la asociación de estos polimorfismos con la respuesta a la terapia con IFN- α -peg y RBV en pacientes uruguayos infectados crónicamente con VHC.

4.4. Materiales y Métodos

4.4.1. Población en estudio

Se realizó un estudio transversal y observacional en individuos uruguayos con y sin infección por VHC, reclutados entre los años 2014 y 2015 en la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas y el Servicio Nacional de Sangre (SNS). El grupo control (no infectados) constó de 103 individuos, mientras que el grupo VHC positivos constó de 78 individuos (6 de los cuales fueron incluidos en el primer capítulo, se indican en la Tabla Suplementaria 7 entre paréntesis).

Los pacientes crónicamente infectados por VHC eran *naïve* a todo tratamiento al inicio del estudio, y mayores de 18 años. Todas las muestras analizadas eran negativas para HBsAg y para VIH, y para los individuos del grupo control, además mostraron ausencia de serología reactiva para VHC. Los datos consignados de las poblaciones a estudiar fueron sexo y edad. Adicionalmente, para los pacientes infectados se incluyeron datos del genotipo viral y estadio de fibrosis hepática en caso de haber sido previamente determinados en el hospital o por servicios tercerizados (Tabla Suplementaria 7 y Tabla Suplementaria 8). Desafortunadamente no se cuenta con los métodos de genotipificación empleados en estos servicios ni con datos sobre la etnia de cada paciente.

48 de los 78 pacientes infectados fueron tratados con biterapia (IFN- α -peg/RBV) posterior al inicio de este estudio, y para 42 de ellos se cuenta con datos de respuesta: la RVS fue definida como la ausencia de ARN viral en suero 24 semanas luego de finalizado el tratamiento, mientras que la no respuesta (NR) fue definida como una disminución de la CV menor a 2 logs a la semana 12 intra-tratamiento, o bien ARN detectable en suero en cualquier otro momento durante la terapia. La recaída fue definida como niveles indetectables de ARN de VHC al EOT, los cuales se tornaron detectables luego de discontinuada la terapia.

Para los análisis de asociación de estos polimorfismos con la respuesta a la terapia, los pacientes infectados se dividieron en dos grupos: aquellos que alcanzaron una RVS y aquellos que no. En las tablas, los datos de variables categóricas (sexo, genotipo viral, estadio de fibrosis, genotipos de SNPs) se presentan como porcentajes mientras que la edad (variable continua), se

muestra como la mediana y el rango intercuartil (IQR, del inglés: *Interquartile range*).

Es importante destacar que previo a reclutar los pacientes, se realizaron cálculos aproximados de la cantidad de individuos que debían ser reclutados para tener un número que pudiera revelar asociaciones genéticas (García-Closas et al. 2011). Para poder calcularlo *a priori* se necesita saber las frecuencias alélicas en las poblaciones a estudiar, lo cual era desconocido hasta la realización de este trabajo. Por tanto en base a cálculos estimados por otros para poblaciones caucásicas de origen europeo, y utilizando el *software* G*Power v3.1.9.2 (Faul et al. 2007), se estimaron los tamaños de muestra para cada grupo, considerando un nivel de significancia α de 0,05, un poder de 0,95 y configurando la realización de tests exactos de proporciones para dos grupos independientes. Estas estimaciones revelaron que para el rs8099917, el mínimo necesario era de 62 pacientes infectados y 96 individuos sanos, suponiendo que las frecuencias alélicas se mantuvieran respecto a las poblaciones caucásicas europeas utilizadas para el cálculo (Rajeevan et al. 2012; Rosso et al. 2014). Para rs12979860, las estimaciones basadas en las frecuencias alélicas calculadas por otros (Thompson et al. 2010; Rajeevan et al. 2012) sugirieron que la cantidad de individuos a reclutar debía ser casi el doble (216 infectados y 114 sanos). Si bien el número para la cohorte control se aproxima en ambos casos, el número de pacientes infectados por VHC que se logró incluir en los análisis sería subóptimo. Dado que no fue posible reclutar un mayor número de individuos, se prosiguió con los análisis a partir de las muestras obtenidas, aún sabiendo que esto representa una limitación del estudio realizado.

4.4.2. Consideraciones éticas

El estudio se realizó de acuerdo con guías éticas nacionales e internacionales (buenas prácticas clínicas y la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki) y fue aprobado por el Comité de ética del Hospital de Clínicas el 24 de octubre de 2014, por lo cual las muestras fueron tomadas bajo consentimiento informado de los pacientes. La información personal de los individuos reclutados es confidencial y su acceso fue restringido a los médicos.

4.4.3. Extracción de ADN genómico

Las muestras de la población infectada por VHC fueron procesadas en su totalidad por el Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas. A partir de 5 mililitros (mL) de sangre periférica con anticoagulante (EDTA, del inglés: *Ethylenediamine tetraacetic acid*), se realizó la extracción de ADN genómico mediante un método *in house* que utiliza dodecilsulfato sódico (SDS, del inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate*), acetato de amonio, alcoholes y resuspensión de la muestra en buffer TE.

Las muestras de la población sin infectar (grupo control) fueron procesadas por quien escribe. A partir de 5mL de sangre periférica con EDTA, se procedió a la lisis de los eritrocitos (Apéndice 1) y se utilizaron 200 μ l de la suspensión resultante de glóbulos blancos (GBs) para extraer el ADN genómico utilizando el QIAamp DNA Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) según indicaciones del fabricante. Todos los ADNs obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

4.4.4. Genotipificado de SNPs rs12979860 y rs8099917

El genotipificado de la población infectada fue llevado a cabo por el Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas mediante PCR a tiempo final seguida de análisis de RFLP utilizando cebadores ya descritos (Sharafi et al. 2012a).

Las muestras de la población control fueron genotipificadas por quien escribe mediante PCR a tiempo real, utilizando ensayos de discriminación alélica con sondas TaqMan en un termociclador *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Los cebadores, las sondas MGB y las condiciones empleadas para amplificar rs12979860 ya han sido descritas (Angulo et al. 2013). El genotipificado del SNP rs8099917 fue determinado mediante un ensayo TaqMan prediseñado (número de referencia: (AB) C_11710096_10, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El genotipo de cada muestra fue atribuido automáticamente por el *software* StepOne v2.2.2.

Para cada ensayo de genotipificación se utilizaron controles negativos (agua DEPC) y controles positivos de cada genotipo: CC/CT/TT para rs12979860 (Figura suplementaria 1A) y TT/TG/GG para rs8099917 (Figura suplementaria

1B y 1C). Los controles fueron genotificados mediante ambos métodos (PCR – RFLP, discriminación alélica por PCR a tiempo real) y verificados por secuenciación Sanger bidireccional. Esto permitió corroborar la concordancia entre ambos métodos utilizados.

4.4.5. Análisis estadísticos

Un estudio de asociación genética de casos y controles compara la frecuencia de alelos/genotipos en *loci* que son marcadores genéticos (SNPs), en individuos de una población dada, con y sin un rasgo de enfermedad, para determinar si existe una asociación estadística entre la enfermedad y el SNP (Clarke et al. 2011). Por tanto, en esta tesis los SNPs estudiados son los mencionados anteriormente, mientras que la población de “casos” son los pacientes infectados crónicamente por VHC y los “controles” son los individuos sin infección. Estos análisis se realizaron con el apoyo de la MSc. Valentina Colistro (Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina).

Equilibrio Hardy-Weinberg en controles:

Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si la muestra de controles cumple con el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE, del inglés: *Hardy-Weinberg equilibrium*). Este principio determina qué frecuencias deben esperarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias observadas de los alelos. Bajo los supuestos del principio de HWE, si la transmisión de *loci* es independiente y no ocurren fenómenos como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo (Iniesta et al. 2005). Por tanto, en la población control se estudiaron posibles desviaciones del HWE utilizando el *software* PLINK *Package* v1.9 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) (Purcell et al. 2007).

Diferencias entre casos y controles:

Para determinar las diferencias entre casos y controles, se compararon las variables categóricas (sexo, genotipo viral, estadio de fibrosis, genotipos de SNPs) utilizando el test de chi-cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher (si los

tamaños de muestra por celda eran <5), mientras que se usó la prueba U de Mann-Whitney para la variable continua (edad). La existencia de diferencias en frecuencias genotípicas entre ambos grupos se evaluó por el test χ^2 bajo los tres modelos de herencia principales: codominante, dominante y recesivo. Sin embargo, posterior a estos análisis, es importante el uso de tests estadísticos apropiados, como los de permutaciones (García-Closas et al. 2011; Clarke et al. 2011) para evitar falsos positivos. Por tanto, en este trabajo se utilizó el método de permutaciones de Monte Carlo para la corrección de testeo múltiple (Li et al. 2013). Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Estos análisis se realizaron con el *software* PAST 3.14 (Hammer et al. 2001).

Desequilibrio de Ligación:

El desequilibrio de ligación (LD, del inglés: *Linkage disequilibrium*) es la correlación entre variantes genéticas que se localizan cercanas en el mismo cromosoma y permite medir el grado en el que dos *loci* están ligados; si se heredan juntos más frecuentemente que lo esperado por azar, entonces se dice que los marcadores están en LD. Es importante analizar esta característica ya que para dos SNPs dados, los valores de LD pueden variar dependiendo de la población estudiada (etnias). En consecuencia, se analizó la existencia de LD entre ambos polimorfismos empleando el *software* Haploview v4.2 (Barrett et al. 2005). Para ello se calcularon los coeficientes de correlación al cuadrado (r^2) dentro del grupo de casos (pacientes infectados), dentro del grupo de controles (individuos no infectados) así como en ambos conjuntamente. Cuando r^2 se aproxima a 1, los SNPs se encuentran en desequilibrio de ligación y por tanto proveen de información idéntica.

4.5. Resultados y Discusión

Se realizaron diferentes abordajes estadísticos que permitieron establecer el tipo de asociación existente y determinar la distribución de genotipos de los polimorfismos rs8099917 y rs12979860 en pacientes uruguayos crónicamente infectados por VHC, tratados y no tratados con la biterapia clásica.

4.5.1. Características demográficas de los casos y controles

Las características demográficas de los casos (pacientes VHC positivos) y de los controles (individuos sin infección) se detallan en la Tabla 2. Se reclutaron 78 pacientes infectados crónicamente con VHC y *naïve* a todo tratamiento. El 61,5% eran hombres, y presentaron una mediana de edad de 45 años (IQR: 38 – 56,5). Los análisis genotípicos de VHC permitieron establecer que el 75,0% de las muestras genotipadas correspondía al GT1. Es importante destacar que, tal y como fue mencionado en Materiales y Métodos (sección 4.4.1), en base a los cálculos realizados sobre el número de individuos a reclutar, se había estimado necesario un n mayor al alcanzado por esta cohorte, sin embargo, como no fue posible reclutar más individuos, se prosigió con los análisis a partir de las muestras obtenidas.

El grupo control inicial incluyó 103 individuos, todos los cuales eran serológicamente negativos a VHC, VIH y VHB (Virus de la Hepatitis B). Sin embargo, 11 muestras rindieron resultados indeterminados para el genotipo correspondiente al SNP rs12979860 (Figura suplementaria 2 y Tabla Suplementaria 8), motivo por el cual se continuó trabajando sobre un total de 92 individuos no infectados. De ellos, el 72,8% eran hombres, y presentaron una mediana de edad de 39 años (IQR: 31 – 48).

No se encontraron diferencias significativas en la distribución de sexos entre ambos grupos (casos y controles) ($p \geq 0,05$), sin embargo la diferencia entre las edades reveló sí serlo ($p < 0,05$). Es cierto que los mejores estudios de asociación deben realizarse con grupos casos-controles que sean lo más similares posibles desde un punto de vista de las características demográficas básicas, sin embargo, aún teniendo presente que esto constituye una limitación a este estudio, se continuó trabajando con estas poblaciones.

Tabla 2. Características demográficas de las poblaciones en estudio.

Variable	Población total (n=170)	Población Infectada (n=78)	Población Control (n=92)	Test Estadístico ^b	p valor
Sexo					
Masculino (%)	115 (67,6)	48 (61,5)	67 (72,8)	χ^2 2,457	0,117
Femenino (%)	55 (32,4)	30 (38,5)	25 (27,2)		
Edad (años), mediana (IQR ^a)	41 (35-52)	45 (38-56,5)	39 (31-48)	U 2121,5	<0,001*
Genotipo (n=60), n (%)					
GT1		45 (57,7)			
GT2		3 (3,8)			
GT3		12 (15,4)			
ND		18 (23,1)			
Estadio de fibrosis (n=49), n (%)					
1		10 (20,4)			
2		10 (20,4)			
3		5 (10,2)			
4		24 (49,0)			

^a IQR: Rango intercuartil

^b Comparación entre casos y controles. χ^2 : Test de chi-cuadrado; U: Prueba U de Mann-Whitney

* $p = 0,0003$

4.5.2. Distribución alélica y genotípica de los SNPs rs12979860 y rs8099917 en casos y controles

Varios reportes han establecido una fuerte asociación entre los SNPs rs12979860 y rs8099917, el *clearance* viral y la respuesta a la terapia con IFN- α -peg/RBV en pacientes infectados con el GT1 (Ge et al. 2009; Tanaka et al. 2009; Thomas et al. 2009; Ridruejo et al. 2011; Venegas et al. 2011; Martínez-Gómez et al. 2012). Hasta el inicio de esta tesis no existía un estudio que mostrara la distribución de estos polimorfismos dentro de la población uruguaya (Figura 12 y Tabla 2). Para poder caracterizar la distribución de los polimorfismos cercanos al gen *IFN-λ-4* en la población uruguaya, se analizaron 92 ADNs genómicos de individuos no infectados y no relacionados entre sí (Figura suplementaria 2).

Con el fin de descartar que el grupo control estuviese compuesto por individuos con relaciones de cosanguinidad o bien que estuviese ocurriendo la selección particular de algún alelo (Iniesta et al. 2005), se comprobó que esta población cumplía con el equilibrio Hardy-Weinberg. Los resultados indican que ambos polimorfismos se encuentran en HWE en la población control ya que no hay

diferencias significativas entre la distribución de genotipos observados y esperados (tests χ^2 , $p \geq 0,05$, Tabla Suplementaria 9).

La distribución de los genotipos rs12979860 dentro de este grupo control ($n = 92$) fue: 45,6% CC, 42,4% CT y 12,0% TT, mientras que para el rs8099917 fue 60,9% TT, 33,7% TG y 5,4% GG (Figura 12 y Tabla 3). El análisis de la distribución de genotipos dentro de la cohorte de infectados ($n = 78$) reveló las siguientes frecuencias genotípicas para el SNP rs12979860: 29,5% CC, 47,4% CT y 23,1% TT; y las siguientes para el SNP rs8099917: 57,7% TT, 28,2% TG y 14,1% GG (Figura 12 y Tabla 3). Tanto bajo el modelo de herencia codominante como bajo el dominante, la distribución genotípica correspondiente a rs12979860 (CC, CT, TT) entre ambas poblaciones estudiadas evidenció ser estadísticamente significativa (Figura 12A, $p < 0,05$), aún luego de la corrección de testeo múltiple, con una prevalencia mayor del genotipo favorable (CC) dentro del grupo control (Tabla 3). Un análisis similar se realizó para las distribuciones de genotipos de rs8099917, sin embargo no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones (Figura 12B y Tabla 3).

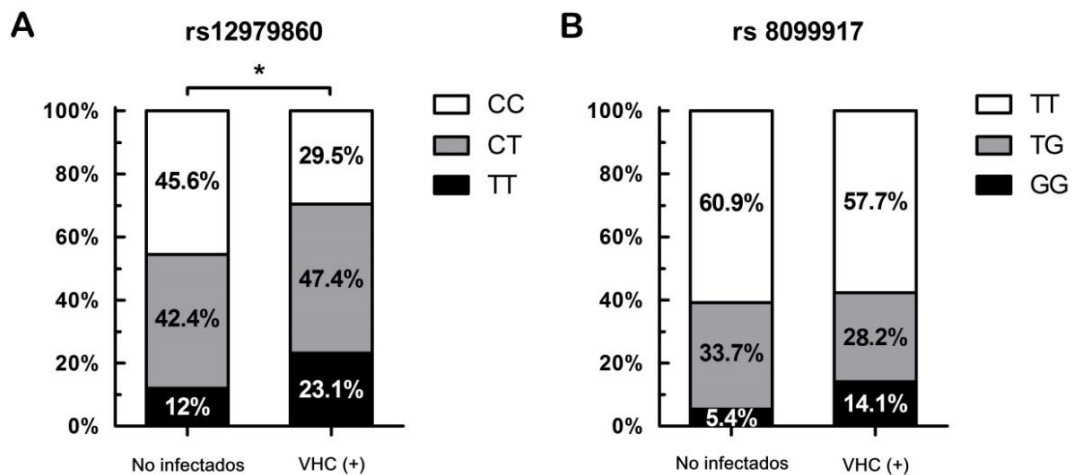


Figura 12. Distribución genotípica de los polimorfismos cercanos al gen *IFN-λ-4* en una población uruguaya infectada por VHC ($n=78$) y una población uruguaya control (no infectada, $n=92$). **A)** SNP rs12979860; CC es el genotipo favorable y CT/TT son los genotipos desfavorables. La diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa (test χ^2 , modelo codominante, $p=0,045$). **B)** SNP rs8099917; TT es el genotipo favorable y TG/GG son los genotipos desfavorables. 'No infectados' refiere a la población control. 'VHC (+)' refiere a la población infectada por VHC.

PREVALENCIA DE SNPs CERCANOS AL GEN IFN- λ -4 EN POBLACIÓN URUGUAYA CON Y SIN INFECCIÓN POR VHC

Tabla 3. Frecuencias genotípicas de los SNP rs12979860 y rs8099917 en ambas poblaciones

SNP	Población infectada (n=78)	Población control (n=92)	Test Estadístico	p valor
<i>rs12979860, n (%)</i>			χ^2_{cd} 6,185	0,045*
CC	23 (29,5)	42 (45,7)		
CT	37 (47,4)	39 (42,4)		
TT	18 (23,1)	11 (11,9)		
CT+TTd	55 (70,5)	50 (54,3)	χ^2_d 4,671	0,031*
CC+CTr	60 (76,9)	81 (88,0)	χ^2_r 3,689	0,055
<i>rs8099917, n (%)</i>			χ^2_{cd} 3,850	0,146
TT	45 (57,7)	56 (60,9)		
TG	22 (28,2)	31 (33,7)		
GG	11 (14,1)	5 (5,4)		
TG+GGd	33 (42,3)	36 (39,1)	χ^2_d 0,177	0,674
TT+TGGr	67 (85,9)	87 (94,6)	χ^2_r 3,720	0,054

χ^2 test de Chi-cuadrado
 cd = Modelo codominante
 d = Modelo dominante
 r = Modelo recesivo
 * $p < 0,05$

Las frecuencias alélicas mostraron un patrón similar: las diferencias son estadísticamente significativas únicamente para rs12979860 (Figura 13).

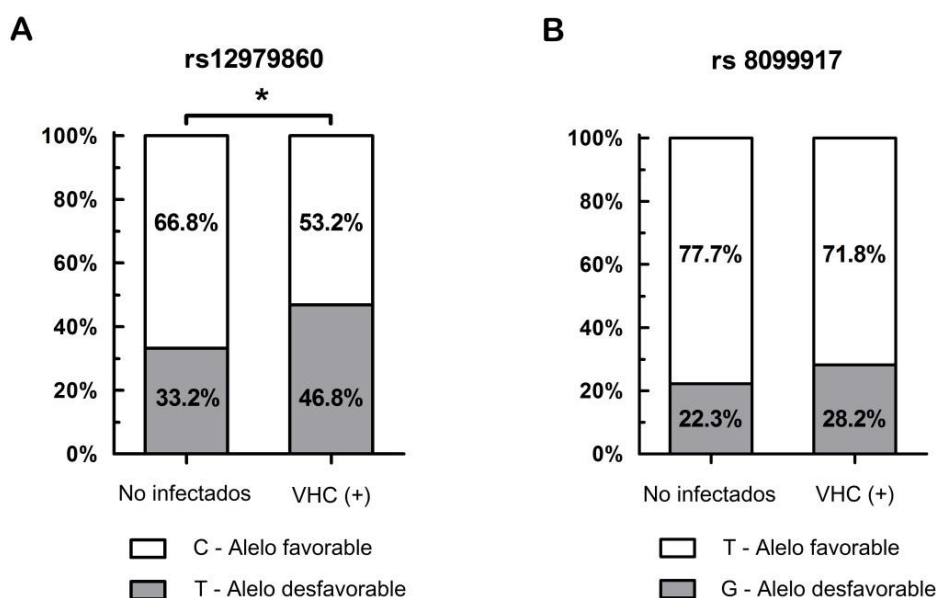


Figura 13. Distribución alélica de los polimorfismos cercanos al gen IFN- λ -4 en una población uruguaya infectada por VHC (n=78) y una población uruguaya control (no infectada, n=92). **A**) SNP rs12979860, la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa (test χ^2 , $p=0,010$). **B**) SNP rs8099917. 'No infectados' refiere a la población control. 'VHC (+)' refiere a la población infectada por VHC.

También se analizó la posible asociación entre los genotipos de estos polimorfismos y otras variables como el sexo, el genotipo viral o el estadio de fibrosis, no encontrándose diferencias significativas entre grupos que puedan ser indicativas de asociación (Tabla Suplementaria 10 y Tabla Suplementaria 11).

Por tanto, en total concordancia con reportes previos (Montes-Cano et al. 2010; Angulo et al. 2013; Trinks et al. 2014a; Bertol et al. 2015; Knapp et al. 2015; Taheri et al. 2015), la frecuencia del genotipo favorable de rs12979860 (CC), que predice fuertemente la eliminación espontánea de la infección por VHC, es menos prevalente dentro de la población de casos (pacientes infectados) que dentro de los controles y esta diferencia en distribución genotípica es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 12A). Este sesgo hacia genotipos de riesgo se asocia, probablemente, al modo de selección de pacientes, ya que éstos fueron reclutados cursando una infección crónica ya caracterizada como tal. En consecuencia, y teniendo presente que el genotipo de 'buena respuesta' de rs12979860 ha sido más frecuentemente reportado en individuos sanos, es plausible que los resultados de esta tesis apoyen la noción protectora del genotipo favorable también dentro de la población uruguaya, como ha sido sugerido por otros autores en otras poblaciones (Thomas et al. 2009; Sharafi et al. 2014; Taheri et al. 2015).

Interesantemente, las frecuencias genotípicas halladas para la población uruguaya parecen caer en los mismos rangos que aquellas encontradas en otros países (Tabla 4), con excepción de los países asiáticos, donde la prevalencia de los genotipos protectores es más alta (Kobayashi et al. 2012; Heo et al. 2014; Dong et al. 2015; Ikezaki et al. 2016; Mah et al. 2016). Aunque las frecuencias alélicas de ambos polimorfismos en el grupo control (Figura 13) son similares a las frecuencias reportadas para diferentes poblaciones europeas (Rajeevan et al. 2012), la distribución de genotipos en la población uruguaya se asemeja más a lo reportado en Brasil (Cavalcante et al. 2012; Ramos et al. 2012; Bertol et al. 2015), Polonia (Mach et al. 2011; Cieśła et al. 2012; Kaczor et al. 2015), Egipto (Knapp et al. 2015) y Turquía (Taheri et al. 2015), poblaciones con ancestrías diversas y contribuciones de varias etnias (Pena et al. 2011; Hodoğlugil and Mahley 2012; Saloum de Neves Manta et al. 2013; Juras et al. 2014; Schuenemann et al. 2017).

PREVALENCIA DE SNPs CERCANOS AL GEN IFN- λ -4 EN POBLACIÓN URUGUAYA CON Y SIN INFECCIÓN POR VHC

Tabla 4. Prevalencia de genotipos favorables reportados en diferentes países en población control (con serología negativa para VHC) versus población con infección crónica por VHC.

SNP	Población control % (n total)	Infectados crónicos por VHC % (n total)	País	Publicación
<i>rs12979860;</i>				
CC				
	44,7 (378)	38,2 (204); 45,6 (283)	España	(Montes-Cano et al. 2010; Milara et al. 2015)
	51,4 (105)	26,1 (748)	Hungría	(Pár et al. 2014)
	41,6 (178)	23,8 (332); 31,0 (621)	Italia	(Mottola et al. 2015; Nosotti et al. 2017)
	47,0 (538)	20,0 (64) – 30,0 (260)	Polonia	(Mach et al. 2011; Cieśła et al. 2012; Kaczor et al. 2015)
	45,1 (122)	26,9 (108)	Egipto	(Knapp et al. 2015)
	44,6 (92)	32,1 (136)	Turquía	(Taheri et al. 2015)
	43,7 (142)	36,7 (259); 38,0 (921); 42,0 (100)	Irán	(Sharafi et al., 2012; Sharafi et al., 2014; Minakari et al., 2016)
	86,9 (320)	88,6 (297)	China	(Dong et al. 2015)
	ND	90,4 (156)	Corea	(Heo et al. 2014)
	ND	76,8 (1518)	Japón	(Kobayashi et al. 2012; Ikezaki et al. 2016)
	ND	42,2 (135)	Uzbekistán	(Khudayberganova et al. 2014)
	ND	24,1 (83)	México	(Martínez-Gómez et al. 2012)
	35,7 (185)	ND	Bolivia	(Trinks et al., 2014)
	38,1 (76)	ND	Perú	(Trinks et al., 2014)
	38,8 (98)	ND	Paraguay	(Trinks et al., 2014)
	37,0 (405)	20,2 (99)	Chile	(Venegas et al. 2011; Angulo et al. 2013)
	51,6 (991)	18,4 (102)	Argentina	(Ridruejo et al., 2011; Trinks et al., 2014)
	47,4 (190)	24,0 (221); 30,9 (175); 32,0 (66)	Brasil	(Cavalcante et al. 2012; Ramos et al. 2012; Bertol et al. 2015)
	45,6 (92)	29,5 (78)	Uruguay	Esta tesis (Echeverría et al. 2018)
<i>rs8099917;</i>				
TT				
	66,7 (178)	40,5 (331); 51,0 (621)	Italia	(Mottola et al. 2015; Nosotti et al. 2017)
	64,1 (142)	58,3 (921)	Irán	(Sharafi et al., 2012)
	88,7 (320)	89,6 (297)	China	(Dong et al. 2015)
	ND	92,3 (156)	Corea	(Heo et al. 2014)
	84,1 (788)	77,7 (1518); 79,5 (205)	Japón	(Kobayashi et al. 2012; Ikezaki et al. 2016)
	ND	66,7 (135)	Uzbekistán	(Khudayberganova et al. 2014)
	89,3 (197)	81,0 (400)	Taiwan	(Mah et al. 2016)
	ND	27,5 (80)	México	(Martínez-Gómez et al. 2012)
	46,9 (405)	29,3 (99)	Chile	(Venegas et al. 2011; Angulo et al. 2013)
	ND	40,2 (102)	Argentina	(Ridruejo et al. 2011)
	67,8 (199)	54,2 (177); 63,1 (222)	Brasil	(Cavalcante et al. 2012; Bertol et al. 2015)
	60,9 (92)	57,7 (78)	Uruguay	Esta tesis (Echeverría et al. 2018)

ND: No determinado

Sin embargo, para el caso de Uruguay, se estima que un 60,0% de la población tiene un ancestro de origen español, mientras que un 40,0% tiene ascendencia italiana (Arocena 2009). Observando la Tabla 4, podemos apreciar que aunque la distribución de los genotipos en población infectada tiene similitudes con la descrita en Italia (Mottola et al. 2015; Nosotti et al. 2017), difiere ligeramente de la reportada en España (Montes-Cano et al. 2010; Milara et al. 2015). Lo contrario ocurre al considerar la distribución en población no infectada. Más aún, la prevalencia del genotipo CC (rs12979860) dentro de la población uruguaya infectada (29,5%) se asemeja más a la reportada para la población autodenominada como hispánica que a la reportada para los que se autodenominan caucásicos (Tabla Suplementaria 12).

Uruguay no tiene actualmente comunidades descendientes de indígenas ni africanos, y hasta la década del '80, su identidad nacional se consideraba casi estrictamente caucásica (Sans 2011). Más recientemente, sin embargo, diferentes reportes basados en marcadores clásicos así como en análisis de ADN nuclear han revelado que la población uruguaya tiene una considerable contribución genética indígena y africana a su ancestría (Salzano and Sans, 2014). Por tanto, existe la posibilidad de que sea esta contribución étnica, la razón por la cual las frecuencias de los SNPs estudiados se asemejan más a aquellas de poblaciones mixtas que a las de poblaciones caucásicas.

4.5.3. Análisis de desequilibrio de ligación (LD)

Los resultados del análisis de LD realizados con el *software Haploview* v4.2 (Barrett et al. 2005) mostraron que ambos polimorfismos se encuentran en débil LD (datos no mostrados), tanto en la población control ($r^2 = 0,57$) como en la población de casos ($r^2 = 0,37$). Incluso, considerando ambas poblaciones juntas, los resultados son similares ($r^2 = 0,48$). Estas observaciones, así como las diferencias significativas en la prevalencia de genotipos protectores, sugieren que dentro de la población uruguaya, rs12979860 podría ser un mejor predictor que rs8099917. Es importante mencionar que el genotipo favorable de rs8099917, que predice cerca del 90% de RVS en la población asiática (Ge et al. 2009), se encuentra en ésta en fuerte LD con rs12979860 (Shi et al. 2012; Heo et al. 2014), por lo cual se hereda junto con rs12979860, lo que determina que

un SNP se pueda utilizar como sustituto del otro. Sin embargo, similar a lo observado para la población uruguaya, el LD entre estos dos polimorfismos también ha sido reportado como débil en poblaciones provenientes de Asia Central y Europa del Este (Khudayberganova et al. 2014), o bien, moderado, para la población española (Milara et al. 2015), todas ellas para las cuales rs12979860 ha resultado mejor predictor que rs8099917.

4.5.4. Asociación entre estos SNPs y la respuesta a la terapia

Finalmente, y considerando que varios reportes de diferentes países y regiones han encontrado asociaciones fuertes entre los genotipos favorables de estos polimorfismos y una RVS a la biterapia clásica (Suppiah et al. 2009; Ridruejo et al. 2011; Venegas et al. 2011; Cavalcante et al. 2012; Martínez-Gómez et al. 2012; Shi et al. 2012; Ramos et al. 2012; de Seixas Santos Nastro et al. 2016), se prosiguió a evaluar esta posible asociación también en la población uruguaya. De los 42 pacientes infectados que fueron sometidos a terapia, 17 alcanzaron RVS mientras que 25 no (10 NR y 15 recaedores) (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencias genotípicas de los SNP rs12979860 y rs8099917 en individuos infectados crónicamente con VHC según respuesta a la terapia (n = 42)

SNP	RVS (n=17)	NR/Recaída (n=25)	Test Estadístico	p valor
<i>rs12979860, n (%)</i>			exacto de Fisher _{cd}	0,281
CC	4 (23,5)	5 (20,0)		
CT	11 (64,7)	11 (44,0)		
TT	2 (11,8)	9 (36,0)		
CT+TT _d	13 (76,5)	20 (80,0)	exacto de Fisher _d	1,000
CC+CT _r	15 (88,2)	16 (64,0)	exacto de Fisher _r	0,151
<i>rs8099917, n (%)</i>			exacto de Fisher _{cd}	0,731
TT	10 (58,8)	12 (48,0)		
TG	6 (35,3)	10 (40,0)		
GG	1 (5,9)	3 (12,0)		
TG+GG _d	7 (41,2)	13 (52,0)	χ^2_{d} 0,475	0,491
TT+TG _r	16 (94,1)	22 (88,0)	exacto de Fisher _r	0,635

χ^2 test de Chi-cuadrado
 cd = Modelo codominante
 d = Modelo dominante
 r = Modelo recesivo

Dentro de los que respondieron favorablemente, el 23,5% portaban el genotipo de buena respuesta para rs12979860 (CC) mientras que el 58,8% portaba el

genotipo favorable para rs8099917 (TT). Si bien estas frecuencias fueron menores en el grupo de NR y recaedores (20,0% - rs12979860 CC; y 48,0% - rs8099917 TT), los tests estadísticos realizados no revelaron diferencias significativas en la distribución de genotipos entre ambos grupos (test de chi-cuadrado y test exacto de Fisher considerando los tres modos de herencia previamente utilizados) (Tabla 5). A pesar de ello, los resultados sugieren una ligera tendencia hacia una mayor frecuencia de genotipos de respuesta en pacientes con RVS, una tendencia que ha sido observada en otras poblaciones de Latinoamérica, donde la frecuencia de portadores del genotipo CC en pacientes NR parece ser menor que en pacientes con RVS (2,0 vs 38,8% en Chile y 20,0 vs 33,0% en México, respectivamente) (Venegas et al. 2011; Martínez-Gómez et al. 2012).

Por tanto, desafortunadamente no se encontró evidencia que apoye la asociación entre los genotipos favorables de los SNPs cercanos al gen *IFN- λ -4* y RVS en la cohorte de individuos uruguayos estudiados. Esto podría deberse al bajo número de pacientes que se incluyeron en este reporte y que efectivamente fueron sometidos a terapia ($n = 42$, corresponde al 53,8% de los pacientes que conformaron la cohorte de casos), lo cual determinó que la cantidad de pacientes en cada grupo (RVS o NR/Recaída) fuera muy pequeña. Similarmente, investigadores chilenos encontraron resultados parecidos al analizar solamente 53 pacientes (Angulo et al. 2013), número que al aumentar permitió confirmar la asociación (Venegas et al. 2011). Sin embargo, dado que algunos autores no encuentran asociación entre estos SNPs y RVS en pacientes infectados con el GT3 de VHC (Moghaddam et al. 2011), y que principalmente esta asociación ha sido reportada para los GT1 y GT4 (Rauch et al. 2010; Thompson et al. 2010), se prosiguió con la discriminación de genotipos y respuesta al tratamiento. Desafortunadamente, solamente 24 pacientes estaban infectados con cepas de GT1 (8 exhibieron RVS y 16 NR ó recaída). Y aunque se realizaron los análisis estadísticos (tests exactos de Fisher) siguiendo los tres modelos de herencia a partir de estos 24 pacientes, nuevamente los resultados no revelaron asociación con la respuesta a la terapia (valores $p > 0,05$ en todos los casos) (datos no mostrados).

Estos resultados se explican, probablemente, por el bajo número de pacientes de GT1 sometidos a terapia. Sin embargo, se espera que si se aumenta el número de pacientes tratados, pueda corroborarse una asociación entre los genotipos favorables de los SNPs cercanos al gen *IFN-λ-4* y la respuesta a la biterapia. No obstante, los nuevos regímenes con DAAs han sido aprobados para su uso por las autoridades nacionales, y aunque sus costos sólo están cubiertos por el FNR para un subgrupo de pacientes (Fondo Nacional de Recursos 2018), es probable que en los años venideros la cobertura de estas nuevas combinaciones de DAAs se amplíe a toda la población infectada. En este contexto, aumentará el número de pacientes a tratarse con estas terapéuticas, y podría volverse importante analizar los genotipos de estos SNPs en asociación a la respuesta a estas drogas. Si bien el poder predictivo parece ser menor, de todas maneras se han revelado como informativos para acortar la duración de los tratamientos, tanto en terapias triples (*IFN/RBV/DAA*) (Holmes et al. 2012; Barreiro et al. 2013; About et al. 2015; Calisti et al. 2015; D'Offizi et al. 2017), como en terapias libres de *IFN* (Lawitz et al. 2013; O'Brien et al. 2014; Akuta et al. 2017). Incluso, las variantes favorables también se han asociado a la protección contra la anemia inducida por *RBV* en pacientes tratados con DAAs combinados con esta droga (Vasanthakumar et al. 2018). En Uruguay, el único esquema de tratamiento que involucra DAAs y *RBV* está recomendado para pacientes cirróticos que se encuentren infectados con VHC de GT3 (12 semanas de *SOF/VEL/RBV*) (Fondo Nacional de Recursos 2018), por lo cual para este subgrupo de pacientes, estos estudios podrían ser importantes.

Finalmente, es importante destacar que este estudio presentó tres limitaciones importantes que pueden explicar parte de los resultados obtenidos. En primer lugar, el hecho de no contar con información sobre la etnia de cada individuo reclutado, en segundo lugar, que el número de individuos de la cohorte control era considerablemente menor al n inicialmente estimado y en tercer lugar, que solamente se reclutaron 24 individuos de GT1 que fueron sometidos a terapia. Por tanto sería deseable poder abordar estos aspectos para poder profundizar sobre los resultados obtenidos, así como sacar conclusiones más robustas.

4.6. Conclusiones

- Los genotipos desfavorables de rs12979860 (CT/TT) se encontraron en mayor prevalencia dentro de la población infectada con VHC (70,5%) en comparación con la población no infectada (54,4%).
- Contrario a lo hipotetizado, la distribución de genotipos y alelos se asemejan a aquellas descritas para poblaciones mixtas, más que a poblaciones uniformemente descendientes de europeos; esto último concuerda con estudios previos sobre la contribución de ancestría no caucásica a la población uruguaya.
- No se encontró asociación entre estos SNPs y la respuesta a la biterapia en la cohorte de pacientes uruguayos incluida en esta tesis. Sin embargo, considerando que se observa una ligera tendencia hacia una frecuencia más alta de los genotipos de buena respuesta en los pacientes respondedores, es probable que el genotipificado de rs12979860 pueda ser de todos modos, una herramienta útil para predecir diferentes respuestas a la terapia en pacientes infectados con el GT1. En la era de los DAAs podría ser relevante sólomente en casos puntuales.
- Los resultados de este capítulo dieron origen a la siguiente publicación científica (Echeverría et al. 2018), la cual se adjunta al final de esta tesis:

Echeverría N, Chiodi D, López P, Sánchez A, Angulo J, López-Lastra M, Silvera P, Canavesi A, Bianchi C, Colistro V, Cristina J, Hernández N, Moreno P (2018). IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients. *Virology Journal*, 15(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0946-2>

5. CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN NS3 Y BÚSQUEDA DE RASs A INHIBIDORES DE LA SERÍN-PROTEASA Y OTRAS SUSTITUCIONES

5.1. Antecedentes y fundamento teórico

Como se mencionó anteriormente, el genoma de VHC codifica para una poliproteína de aproximadamente 3100AA, la cual es procesada por proteasas celulares y virales para dar lugar a 10 proteínas. La proteína NS3, junto con su cofactor, la proteína NS4A, son responsables del procesamiento de la región no estructural de la poliproteína.

NS3 es en sí misma una proteína bifuncional de 631AA, con un dominio amino-terminal (AA 1 a 180) que exhibe actividad serín-proteasa dependiente de Zn^{2+} , y un dominio carboxi-terminal (AA 181 a 631) con actividad NTPasa/ARN helicasa (Figura 14) (Bartenschlager and Lohmann 2000; Lin 2006; Dubuisson 2007; Moradpour and Penin 2013). Ambos dominios de NS3 se encuentran unidos por un segmento *linker* (residuos 182 a 194), el cual parece ser crítico para la replicación y la infectividad (Kohlway et al. 2014).

El dominio proteasa tiene el plegamiento típico de las proteasas de la superfamilia de las tripsinas/quimiotripsinas, compuesto de dos dominios de barriles β , seguido de una α hélice anfipática (α_0) involucrada en la asociación a membranas (Love et al. 1996; Brass et al. 2008). Su tríada catalítica está formada por una histidina, un aspartato y una serina en las posiciones 57, 81 y 139, respectivamente (His57, Asp81, Ser139). La proteína no estructural NS4A, de tan sólo 54AA, es un polipéptido que actúa como cofactor de la actividad serín-proteasa de NS3, que contribuye con una hebra β a dicho dominio (residuos 21 a 34), y promueve su correcto plegamiento y su acción enzimática. Asimismo, su porción N-terminal, conjuntamente con la hélice α_0 del dominio proteasa de NS3, son responsables de la asociación del complejo NS3/4A a la membrana del retículo endoplasmático (Wölk et al. 2000; Brass et al. 2008). El ión de Zn^{2+} se localiza opuesto a la tríada catalítica y está coordinado por cuatro residuos: tres cisteínas (Cys97, 99 y 145) y, a través de una molécula de agua,

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN NS3 Y
BÚSQUEDA DE RASs A INHIBIDORES DE LA SERÍN-PROTEASA Y OTRAS
SUSTITUCIONES

por una histidina en la posición 149 (His149) (Love et al. 1996; Stempniak et al. 1997).

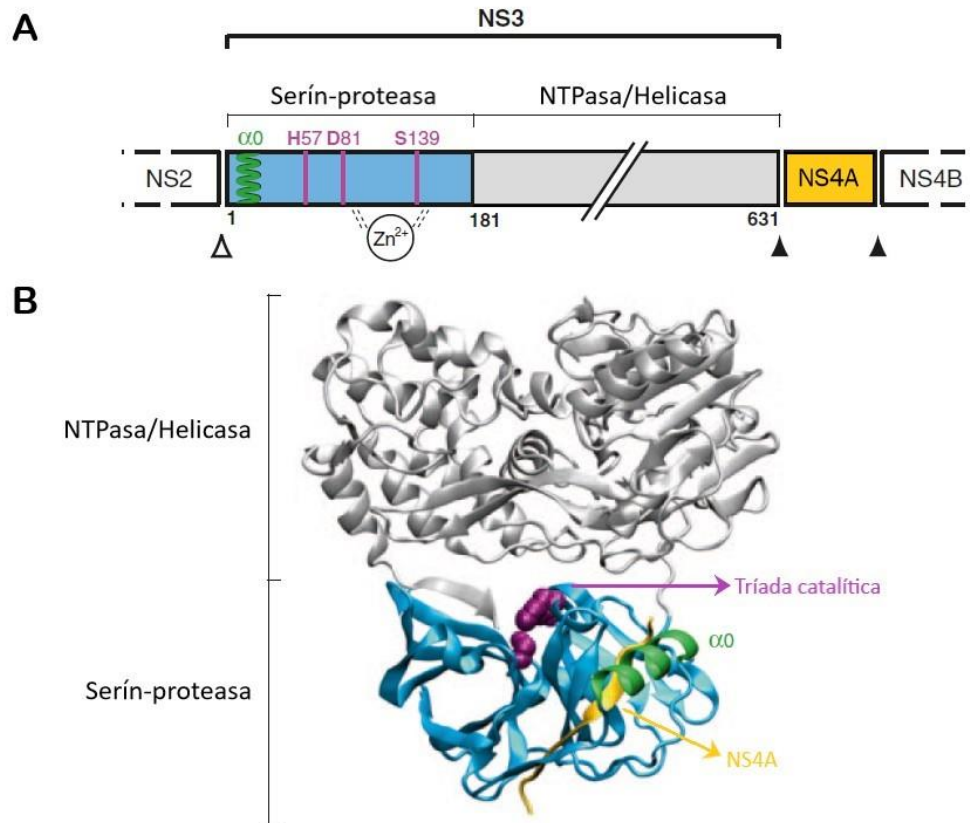


Figura 14. Estructura del heterodímero NS3/4A. **A)** Representación esquemática de la región NS3/4A de la poliproteína de VHC. Los dominios serín-proteasa y NTPasa/Helicasa están representados en celeste y gris, respectivamente. Los residuos correspondientes a la tríada catalítica (sitio activo) se indican en violeta (histidina 57 – H57, aspartato 81 – D81 y serina 139 – S139) y la hélice anfipática N-terminal α_0 en verde. Un átomo de Zn^{2+} coordinado por tres residuos de cisteína y uno de histidina estabiliza la estructura de la serín-proteasa. El cofactor NS4A se muestra en amarillo. La cabeza de flecha blanca indica el sitio de clivado por parte de la cisteín-proteasa NS2, mientras que las cabezas de flechas negras corresponden a los sitios de clivado de la serín-proteasa NS3/4A. **B)** Estructura terciaria del complejo NS3/4A (Yao et al. 1999). Los diferentes elementos se indican con iguales colores que en el panel A (modificado de Moradpour and Penin, 2013).

Adicionalmente a su rol en el procesamiento de la poliproteína viral, la actividad proteasa también está involucrada en bloquear la respuesta antiviral innata (Foy et al. 2003) mediante el clivado de moléculas adaptadoras críticas en las vías de señalización del TLR3 (del inglés: *Toll-like receptor 3*) y RIG-I (Retinoic acid – Inducible Gene I), específicamente las proteínas Trif (Li et al. 2005a) y MAVS (del inglés: *Mitochondrial AntiViral Signaling*) (Li et al. 2005b), respectivamente.

De este modo, VHC estaría interfiriendo con la respuesta antiviral mediada por IFN de tipo I.

El extremo C-terminal de NS3 codifica para una ARN helicasa de la superfamilia DexH/D-box, por lo cual es capaz de desenrollar dúplex de ARN-ARN de forma ATP-dependiente y en sentido 3' – 5' (Tai et al. 1996). Diferentes estudios *in vitro* han revelado que NS3 es capaz de interactuar consigo misma formando oligómeros. Esta capacidad es importante para la actividad helicasa, la cual se ve aumentada cuando múltiples moléculas de NS3 se unen al mismo sustrato (Sikora et al. 2008; Raney et al. 2010).

La experiencia de la industria farmacéutica con el desarrollo de inhibidores de la proteasa de VIH llevó al desarrollo de drogas antivirales dirigidas a inhibir la proteasa de VHC. La mayoría de estos inhibidores compiten con el sustrato y se unen al sitio activo de la enzima. Los inhibidores de NS3 (IPs) fueron las primeras drogas directas en ser desarrolladas contra VHC. El desarrollo y la evaluación de la capacidad inhibitoria de estas drogas solamente fue posible tras el desarrollo de replicones subgenómicos de este virus (Lohmann 2018). La primera generación de IPs se co-administraba conjuntamente con IFN- α -peg, sin embargo la incorporación de DAAs de segunda y tercera generación hicieron posibles los regímenes libres de IFN (Ahmed and Felmlee 2015).

La emergencia de mutantes resistentes es la complicación más frecuente en el desarrollo de terapéuticas cuyos blancos de acción son proteínas de virus de ARN. Esto se debe principalmente a la alta variabilidad genética que exhiben estos virus (ver sección 1.7.1 Mutación y cuasiespecies). Aquellas variantes (RAVs) que sean capaces de replicar en presencia de la droga serán rápidamente seleccionadas. Este escenario se ha visto con frecuencia, tanto en ensayos *in vitro* como en la clínica. Es importante recordar que una RAV puede estar conformada por varias sustituciones que confieran resistencia (RASs). Las RASs a inhibidores de la proteasa que se seleccionan durante tratamientos, y llevan al *breakthrough* viral (aumento de la CV previo a finalizar el tratamiento) tienden a presentar un bajo *fitness*, por lo cual son reemplazadas rápidamente por variantes primarias una vez que la presión selectiva cesa (Thomas et al. 2012; Ahmed and Felmlee 2015).

Además de las RASs que emergen como consecuencia de la presión selectiva ejercida por la droga, es frecuente la existencia de RASs basales (Palanisamy et al. 2013) o bien polimorfismos asociados a resistencia (RAPs), previo al inicio del tratamiento, algunos de los cuales reflejan diferencias entre genotipos y/o subtipos (RASs naturales) (Palanisamy et al. 2018).

La circulación de RASs en pacientes *naïve* a tratamientos con DAAs ha sido escasamente reportada en Latinoamérica, con excepción de Brasil (Peres-da-Silva et al. 2012; Zeminian et al. 2013; de Carvalho et al. 2014; Lisboa-Neto et al. 2015; Moreira et al. 2018) y Argentina (Sede et al. 2015; Martínez et al. 2017; Esposito et al. 2018).

La detección de RASs y RAPs es posible gracias a análisis genotípicos y fenotípicos. Dentro de los primeros, se incluyen la secuenciación poblacional (de Sanger) y la secuenciación profunda o masiva (NGS, del inglés: *Next-Generation Sequencing*), y cada una difiere en su capacidad de detectar sustituciones específicas dentro de la cuasiespecie viral: la secuenciación de Sanger permite identificar variantes representadas en >15,0-20,0% de la cuasiespecie, mientras que NGS alcanza a identificar variantes minoritarias en la población (0,1-1,0%) (Sorbo et al. 2018).

A pesar de que los datos disponibles sugieren que la mayoría de las RASs no conllevan un impacto significativo sobre las respuestas terapéuticas (Wyles 2017; AASLD-IDSA 2018), hasta que las nuevas DAAs se encuentren disponibles y con cobertura por los servicios de salud en todos los países, el testeo genotípico de resistencia seguirá siendo una herramienta diagnóstica importante para ajustar tratamientos más personalizados, en particular para aquellos pacientes con falla previa a terapias basadas en DAAs (AASLD-IDSA 2018; Sorbo et al. 2018).

5.2. Hipótesis

Dado que NS3 es una proteína que interacciona con diferentes proteínas y cumple diferentes funciones, se espera que las regiones de importancia funcional exhiban pocas sustituciones.

Por otra parte, varios reportes indican la existencia de resistencia basal, así como la emergencia de variantes resistentes a nivel de NS3 durante el tratamiento con IPs. Por este motivo esperamos encontrar, en pacientes *naïve* al tratamiento, algunas cepas con sustituciones de resistencia en la secuencia consenso (obtenida por secuenciación Sanger). Mientras que a nivel de las variantes minoritarias o de baja frecuencia dentro de las cuasiespecies, se espera hallar mayor cantidad de cambios de resistencia.

5.3. Objetivos Específicos Capítulo 3

Objetivo Específico 3a: Establecer las relaciones filogenéticas, a partir de la región que codifica para la proteasa NS3, entre las diferentes cepas provenientes de pacientes uruguayos, como abordaje para descartar posibles eventos de recombinación intragenotípica.

Objetivo Específico 3b: Analizar la variabilidad genética de la región NS3 mediante la identificación de sustituciones (en su secuencia consenso y en variantes de las cuasiespecies), en búsqueda tanto de marcadores indicativos de resistencia a DAAs así como otras sustituciones que puedan interferir con interacciones proteína-proteína y/o con sus funciones.

5.4. Materiales y Métodos

5.4.1. Muestras y consideraciones éticas

Se utilizaron las 44 muestras que fueron introducidas en el Capítulo 1 (Tabla Suplementaria 2 y Tabla Suplementaria 3), recolectadas entre los años 2015–2018 y suministradas por la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina en el marco del proyecto Fondo María Viñas FMV_ 1_2014_1_104171 ($n = 37$ pacientes). Estas muestras fueron tomadas bajo consentimiento informado y el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas el 17 de diciembre de 2014.

5.4.2. Amplificación por PCR de la región genómica que codifica para NS3

Para la extracción de ARN viral y la RT se siguieron los protocolos detallados en el Capítulo 1 (secciones 3.4.2 y 3.4.4). Una vez obtenido el ADNc, se lo utilizó como templado en diferentes abordajes para amplificar la región genómica que codifica para la serín-proteasa NS3. Debido a la gran variabilidad exhibida por los aislamientos, se debieron poner a punto 4 aproximaciones diferentes que permitieran amplificar la región de interés. Tres abordajes se emplearon para amplificar la región NS3 completa (PCR semi-anidada o anidada, PCR subtipo específica ó *One-step* PCR), mientras que uno amplificó únicamente el dominio proteasa de NS3 (PCR anidada). En todos los casos, las reacciones de amplificación contaron con un control positivo previamente caracterizado, así como un control negativo de amplificación, y fueron realizadas en un termociclador Applied Biosystems ABI 2720.

a. Amplificación de la región NS3 completa mediante PCR semi-anidada o anidada:

Estas PCRs permitieron amplificar una región que abarca parte del gen que codifica para la proteína NS2, todo el gen de NS3 y parte del de NS4A (Figura 15). Para el caso de la PCR semi-anidada se utilizaron los cebadores p519fw y p520rv (primer *round*), y p519fw y p523rv (segundo *round*). El producto de PCR generado fue de 2835pb (nt 2640 al 5474 referente al genoma de VHC cepa H77, número de acceso al *GenBank*: AF009606). Para la PCR anidada se

utilizaron los cebadores p519fw y p520rv (primer *round*), y p525fw y p523rv (segundo *round*). El producto de PCR generado fue de 2133pb (nt 3342 al 5474). Todos estos cebadores, así como los de secuenciación fueron descritos previamente (Vicenti et al. 2012) (Tabla Suplementaria 13), y aunque son degenerados, amplifican preferencialmente el GT1.

La mezcla de PCR para el primer *round* fue realizada en un volumen final de 25µl que contenía 5µl de buffer (5X) con MgCl₂, 0,5µl de dNTPs (10µM), 1µl de cebador p519fw (10µM), 1µl de cebador p520rv (10µM), 0,5µl de enzima Phusion High Fidelity (2U/µl, Thermo Scientific, USA), 2,5µl de ADNc y agua DEPC hasta completar el volumen. Utilizando como molde 5µl del primer *round*, se realizó una reamplificación, utilizando ya sea el cebador p519fw (utilizado en el primer *round*) o bien p525fw (interno al anterior), y un cebador reverso interno, el p523rv. La mix de reacción se realizó en un volumen final de 50µl conteniendo 10µl de buffer (5X) con MgCl₂, 1µl de dNTPs (10µM), 2µl de cada cebador (10µM), 1µl enzima Phusion High Fidelity (2U/µl, Thermo Scientific, USA), 5µl de molde y agua DEPC hasta completar el volumen.

Las condiciones de PCR fueron: 98°C por 5min; 35 ciclos de 98°C por 45seg, 53°C por 30seg y 72°C por 3min, y 6min finales a 72°C. Para el segundo *round* las condiciones de ciclado fueron similares. Sin embargo, los ciclos se repitieron 40 veces, la temperatura de hibridación fue más alta (55°C en la PCR semi-anidada y 54°C en la anidada) y el tiempo de extensión fue menor (2min).

b. Amplificación de la región NS3 completa mediante PCR subtipo-específica

Para aquellas muestras que no pudieron ser amplificadas con el protocolo anterior, se intentó un abordaje de PCR con cebadores específicos para diferentes subtipos que habían sido descritos previamente (Chusri et al. 2015) y modificados ligeramente en el marco de esta tesis (Tabla Suplementaria 13). Se utilizaron cebadores específicos para los subtipos 1a, 1b y 3a que abarcan la NS3 completa incluyendo parte de la región codificante de NS2 (tamaños esperados: 2116pb – 1a, 2061pb – 1b y 2091pb – 3a) (Figura 15).

La mezcla de PCR se realizó en un volumen final de 50µl, y contenía: 10µl de buffer (5X), 1µl de dNTPs (10mM), 2µl de cebador *forward* (10µM), 2µl de

cebador reverso (10 μ M), 1 μ l de enzima Phusion High-Fidelity (2U/ μ l, Thermo Scientific, USA), 10 μ l de ADNc y agua DEPC hasta completar el volumen. El ciclo fue idéntico al descrito por Chusri et al., (2015) e igual para todos los subtipos.

c. Amplificación de la región NS3 completa mediante *One-step* PCR

Para aquellas muestras que no pudieron ser amplificadas con ninguno de los protocolos anteriores, se realizó la amplificación de la misma región amplificada en **(a)** (2133pb) pero utilizando una estrategia de *One-Step* PCR. La mezcla de reacción (volumen final = 30 μ l) contenía: 15 μ l de mix de reacción 2X (con 0,4mM de cada dNTP y 3,2mM MgSO₄); 1 μ l de cebador p525fw (10 μ M); 1 μ l de cebador p523rv (10 μ M); 0,2 μ l de RNAsa OUT (40U/ μ l; Fermentas, Vilnius, Lituana); 0,6 μ l de mix de retrotranscriptasa SuperScript III/Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 7,2 μ l de agua DEPC y 5 μ l de ARN. El ciclado para la *One-Step* PCR fue: 45min a 48°C para la etapa de RT; 95°C por 5min; 40 ciclos de 95°C por 30seg, 54°C por 30seg, 72°C por 2min; y 6min finales a 72°C.

d. Amplificación del dominio proteasa de NS3 mediante PCR anidada

Por último, aquellas muestras en las que resultó extremadamente difícil la amplificación de la región completa, se sometieron a una amplificación parcial de NS3, enfocando en el dominio proteasa. Para ello se realizó una PCR anidada que permitió amplificar un producto de 770pb (1a) ó 766pb (1b) (Figura 15). El protocolo incluyó un primer *round* a partir de una *One-Step* PCR y un segundo *round* de PCR clásica utilizando cebadores descritos previamente por Peres-da-Silva et al. (2010) (Tabla Suplementaria 13).

La mezcla de reacción del primer *round* (*One-Step*) fue realizada en un volumen final de 30 μ l que contenía: 15 μ l de mix de reacción 2X (con 0,4mM de cada dNTP y 3.2mM MgSO₄); 1 μ l de cada cebador 1 (10 μ M, *forward* y reverso); 0,2 μ l de RNAsa OUT (40U/ μ l; Fermentas, Vilnius, Lituana); 0,6 μ l de mix de retrotranscriptasa SuperScript® III/Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 7,2 μ l de agua DEPC y 5 μ l de ARN. Para el caso del segundo *round* la mezcla de reacción, realizada en un volumen final de 50 μ l, fue la siguiente: 10 μ l de buffer (5X), 1 μ l de dNTPs (10mM), 2 μ l de cada cebador 2

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN NS3 Y BÚSQUEDA DE RASs A INHIBIDORES DE LA SERÍN-PROTEASA Y OTRAS SUSTITUCIONES

(10 μ M, *forward* y *reverso*), 1 μ l de enzima Phusion High-Fidelity (2U/ μ l, Thermo Scientific, USA), 1 μ l del primer *round* y agua DEPC hasta completar el volumen. El ciclado para la *One-Step* PCR fue: 45min a 45°C para el paso de RT; 2min a 94°C; 40 ciclos de 94°C por 30seg, 54°C por 30seg y 68°C por 90seg; y 5min de extensión final a 68°C. El ciclado para el segundo *round* fue el siguiente: 98°C por 5min; 40 ciclos de 98°C por 45seg, 58°C por 30seg y 68°C por 90seg; y finalmente 68°C durante 5min.

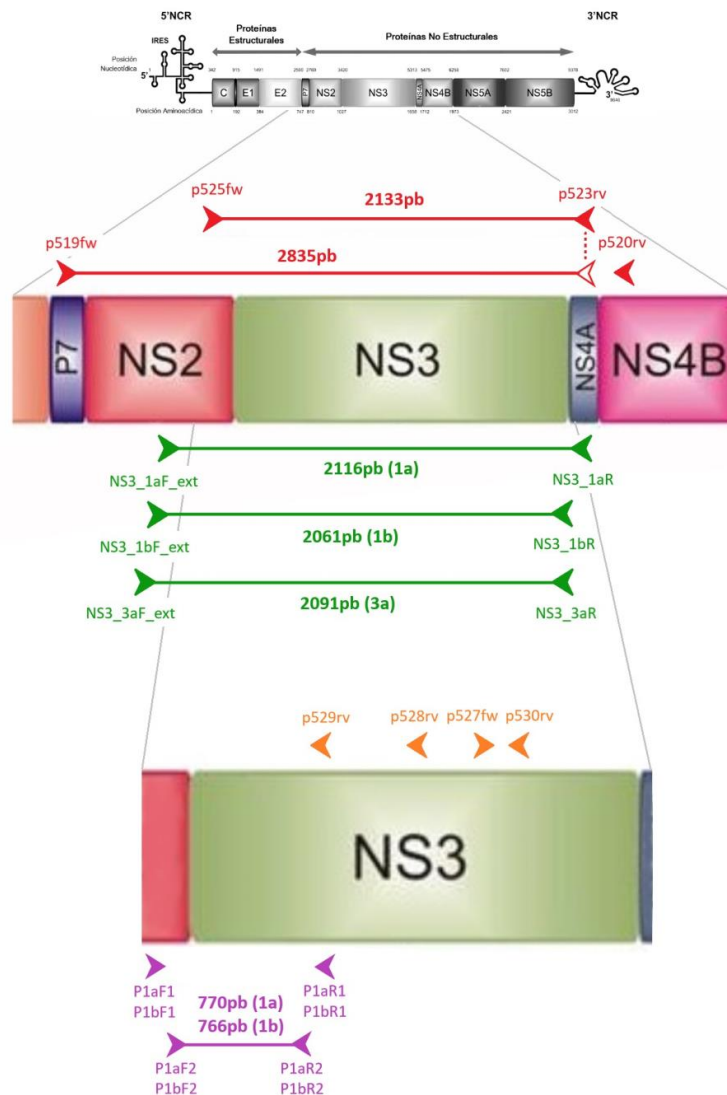


Figura 15. Esquema de la localización de los cebadores utilizados para la amplificación de la región que codifica para la proteasa NS3 de VHC. En el esquema central se indican en rojo los cebadores utilizados para las PCR semi-anidada, anidada y *One-step* y en verde aquellos empleados para las PCRs subtipo-específicas. En el esquema inferior se muestran en anaranjado los cebadores de secuenciación y en violeta los utilizados para amplificar la región proteasa de NS3. Se indican además los tamaños de los productos de PCR generados.

5.4.3. Visualización de productos de PCR, purificación y secuenciación

En todos los casos la visualización de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1%, siguiendo protocolo descrito en sección 3.4.6, mientras que la purificación y la secuenciación se realizaron según lo detallado en la sección 3.4.7. La secuenciación se realizó en Macrogen Korea, utilizando cebadores internos a los productos de PCR, así como con aquellos empleados en la reacción de PCR (Tabla Suplementaria 13).

5.4.4. Análisis filogenéticos a partir de la región que codifica para NS3

Con el fin de establecer las relaciones filogenéticas y descartar posibles eventos de recombinación intragenotípica, las secuencias de NS3 obtenidas en este trabajo fueron editadas con el programa *Seqman* implementado en el paquete DNASTar 5.01 (DNASTAR, Madison, USA). Posteriormente, fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson et al. 1994) conjuntamente con las 40 secuencias utilizadas en el Capítulo 1 (sección 3.4.8), correspondientes a cada uno de los 8 genotipos de VHC (Tabla Suplementaria 4). A partir de estas secuencias, e incluyendo las obtenidas de las muestras uruguayas, se generaron 2 alineamientos diferentes: uno correspondiente a la región casi completa de NS3 (1869pb de un total de 1893pb del gen) y otro correspondiente al dominio proteasa y al segmento *linker* (582pb), para poder incluir aquellas muestras que solamente amplificaron esta región parcial.

Se determinó la señal filogenética de cada uno de los alineamientos, mediante estudios de *Likelihood Mapping* (Strimmer and von Haeseler 1997), siguiendo el mismo protocolo de la sección 3.4.8. Previamente se determinó el mejor modelo evolutivo para describir cada conjunto de datos (protocolo descrito en sección 3.4.8). Una vez determinado el modelo evolutivo y verificada la señal, se construyeron árboles filogenéticos de *Maximum Likelihood* utilizando el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013), con 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* para evaluar la robustez de cada nodo. Los árboles obtenidos se editaron mediante el programa FigTree v1.4.4 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

5.4.5. Análisis de mutaciones y sustituciones en NS3 a nivel de la secuencia consenso

Primeramente se analizó la cantidad de mutaciones nucleotídicas presentes en cada una de las secuencias consensos obtenidas por secuenciación Sanger. Para ello se realizó el análisis de estimación de distancia pareada [implementado en el programa MEGA6 (Tamura et al. 2013)] estableciendo de este modo el número de diferencias (mutaciones) entre una secuencia problema versus una “secuencia de referencia consenso mundial” del genotipo correspondiente.

Estas “secuencias de referencia consenso mundiales” fueron generadas para cada uno de los subtipos estudiados (1a, 1b y 3a), mediante la utilización del programa *SeqMan* versión 7.0.0 (DNASTAR, Madison, USA), y a partir de secuencias de NS3 circulantes en diferentes países del mundo (108 secuencias de GT1a, 108 de GT1b y 36 de GT3a), disponibles en Los Alamos HCV sequence database (Kuiken et al. 2005) a enero de 2015 (Tabla Suplementaria 14). Utilizar estas secuencias reconstruidas a partir de diferentes secuencias de NS3 mundiales tuvo como propósito que las mutaciones y sustituciones observadas en las muestras estudiadas no se confundieran con variaciones derivadas de la diversificación de este virus.

Posteriormente, cada una de las secuencias consenso de NS3 fueron traducidas *in silico* a secuencia de aminoácidos y comparadas con la correspondiente secuencia de referencia consenso mundial a fin de identificar las sustituciones presentes en cada una de ellas. El análisis de sustituciones se realizó por inspección visual, comparando cada secuencia traducida con la correspondiente secuencia de referencia mundial. Asimismo, se utilizó la herramienta *Geno2pheno[HCV]* (Kalaghatgi et al. 2016), para verificar las sustituciones halladas y determinar si confieren resistencia a IPs. Esta herramienta analiza los primeros 181 AA de NS3 (dominio proteasa) y permite realizar el análisis de secuencias problema de VHC, estableciendo el genotipo y subtipo de cada secuencia y el perfil de resistencia de forma rápida, fácil, actualizada y de acceso libre.

Con el fin de analizar si había diferencias entre la distribución de mutaciones y sustituciones halladas en muestras de diferentes subtipos, así como provenientes de pacientes que habían recibido diferente tipo de tratamiento, se realizaron tests de análisis de varianza (ANOVA) de una vía (*One-way*) seguidos por tests de comparación múltiple para su corrección (test de Bonferroni). Un valor p menor a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Primeramente se verificó que los datos siguieran una distribución normal empleando el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Estos análisis se realizaron con el *software* GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

5.4.6. Construcción de librerías para secuenciación masiva

Con el objetivo de analizar en mayor profundidad la presencia de sustituciones de resistencia a nivel de NS3 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 (NS3 completa) a fin de someterlos a secuenciación masiva.

Con este fin se seleccionaron 10 muestras:

- 7 de ellas tomadas previo al tratamiento con DAAs, provenientes de pacientes que posteriormente fueron tratados y de los que se cuenta con información de respuesta a la terapia,
- 3 muestras post-tratamiento con DAAs provenientes de pacientes no respondedores o recaedores.

En ninguno de los casos se observó la presencia de RASs en la secuencia obtenida por Sanger. Las librerías se realizaron con el *TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit* (Illumina, San Diego, CA, USA), según protocolo del fabricante.

El ADN a utilizar como templado fue cuantificado mediante un método fluorométrico con el Qubit 2.0 Fluorometer dsDNA HS Assay (Life Technologies, Eugene, OR, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, el protocolo de preparación de las librerías incluyó los siguientes pasos:

- fragmentación del ADN en ~350pb (con el ultrasonicador *Covaris M220*);

- reparación de extremos y selección de tamaño;
- adenilación de extremos 3' y ligación de adaptadores;
- enriquecimiento de fragmentos con adaptadores en ambos extremos (PCR);
- cuantificación de las librerías generadas (método fluorométrico);
- verificación de su calidad (corrida en la plataforma *Agilent Technology 2100 Bionalyzer* con un “*High Sensitivity DNA chip*”, Waldbronn, Germany);
- normalización de cada una a 4nM y finalmente pooleado de librerías.

5.4.7. Secuenciación Masiva

La secuenciación se llevó a cabo en *reads* de 250nt de forma *paired-end* (2X250). Se empleó el *MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle)* (Illumina, San Diego, CA, USA) y el instrumento MiSeq (Illumina), del servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo, bajo la guía del Dr. Gonzalo Greif.

5.4.8. Análisis de datos masivos

Las etapas de pre-procesamiento, alineamiento y visualización de datos fueron realizadas empleando la plataforma web Galaxy (servidor público disponible en usegalaxy.org) (Afgan et al. 2018). Para la detección de variantes minoritarias se contó con la colaboración del MSc. Martín Sónora (Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares, Institut Pasteur de Montevideo), con quien se realizó la asignación de SNPs mediante línea de comando.

Pre-procesamiento de datos

Con el fin de chequear la calidad de los datos crudos, éstos fueron primeramente analizados mediante el programa FastQC (Andrews 2010). A continuación se realizó la limpieza (trimado) de los datos para eliminar fuentes de contaminación, empleando la herramienta Trimmomatic (Bolger et al. 2014). Se utilizó el algoritmo de *sliding window* (de a 4nt) para remover adaptadores, secuencias de cebadores y todos los *reads* con un promedio de calidad $Q < 25$, y posteriormente el algoritmo MINLEN, para remover todos los *reads* < 36 nt. Luego del trimado, se verificó la calidad de los archivos resultantes con el programa FastQC.

Alineamiento y ensamblado

Posterior al trimado, se continuó con el paso de alineamiento de los *reads* procesados (que se denominarán de ahora en más como *reads* de buena calidad) contra un genoma de referencia. Para ello se mapearon contra las secuencias consensos respectivas obtenidas mediante secuenciación Sanger, empleando el programa BWA-MEM (Li 2013). Para cada muestra se generaron 3 archivos resultantes binarios ordenados (*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). Se utilizó la herramienta Qualimap 2 (Okonechnikov et al. 2015) para evaluar los alineamientos, la que permitió determinar los perfiles de cobertura para cada muestra, así como la cantidad de *reads* procesados que mapearon con cada secuencia consenso Sanger de NS3.

Visualización de datos masivos y obtención de secuencia consenso

Los archivos *.bam* resultantes de los alineamientos contra las secuencias consenso Sanger fueron visualizados con el *software* Integrative Genomics Viewer v2.4.10 (Robinson et al. 2011). A partir de esta visualización se pudo extraer la secuencia consenso de los *reads* de secuenciación masiva, la cual se utilizó para realinear los *reads* de buena calidad (con el programa BWA-MEM). La comparación de diferencias entre las secuencias consenso Sanger y Masiva se realizó utilizando el *pairwise distance* implementado en el software MEGA6.

SNP calling (determinación de variantes)

El *SNP calling* se realizó utilizando el algoritmo *MPileUp* de la herramienta SAMTools (Li et al. 2009) (configurando los parámetros por defecto y una profundidad de 1000000). Como archivos de partida se emplearon los archivos *.bam* del alineamiento contra la secuencia consenso de la secuenciación masiva. Con los archivos *.vcf* resultantes se calcularon las frecuencias de cada base a nivel de los sitios de interés (sitios que generan resistencia a DAAs, regiones de interacción con NS4A y APOBEC3G, sitios de unión al Zn^{+2} y la tríada catalítica).

5.5. Resultados y Discusión

Para cumplir con los objetivos se amplificó la región de interés (NS3 completa) y se la sometió a secuenciación Sanger y profunda.

5.5.1. Amplificación de la región NS3

Se partió de muestras provenientes de 37 pacientes, 34 de los cuales eran *naïve* a DAAs. Se contaba con 44 muestras a analizar. 6 de ellas no rindieron producto de amplificación con ninguno de los abordajes desarrollados. Estas muestras correspondieron a las intratratamiento y la post-tratamiento de pacientes que alcanzaron una RVS (25_7d, 36_15d, 37_7d, 39_7d y 39_post), así como a la muestra 14 (recaedor a un tratamiento con IP). De las 38 restantes (34 *naïve* y 4 recaedores a DAAs), 33 fueron amplificadas exitosamente abarcando la totalidad del gen. Las otras 5 muestras (13, 16, 17, 19, 28) solamente rindieron producto cuando se amplificó el dominio proteasa de NS3.

5.5.2. Análisis filogenéticos

Para los estudios de *Likelihood Mapping* se trabajó con 2 sets de datos conteniendo los alineamientos de 40 secuencias representativas de los 8 genotipos de VHC y las secuencias Uruguayas: NS3 casi completa (1869nt, con 33 secuencias uruguayas) y NS3 parcial (582nt, con 38 secuencias uruguayas). El modelo evolutivo que mejor se ajustó a cada set de datos fue el GTR + γ + I.

Como puede observarse en la Figura 16A, el alineamiento de la región casi completa es capaz de resolver correctamente el 92,6% de los árboles filogenéticos, mientras que la región parcial resuelve el 87,7% (datos no mostrados). Es decir que esta región es aún más informativa para inferencias filogenéticas que las previamente empleadas (Figura 8). Claro está que, de todos modos, estos alineamientos son más largos que los correspondientes al IRES y a NS5B, lo cual puede contribuir a proveer de más sitios informativos.

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN NS3 Y BÚSQUEDA DE RASs A INHIBIDORES DE LA SERÍN-PROTEASA Y OTRAS SUSTITUCIONES

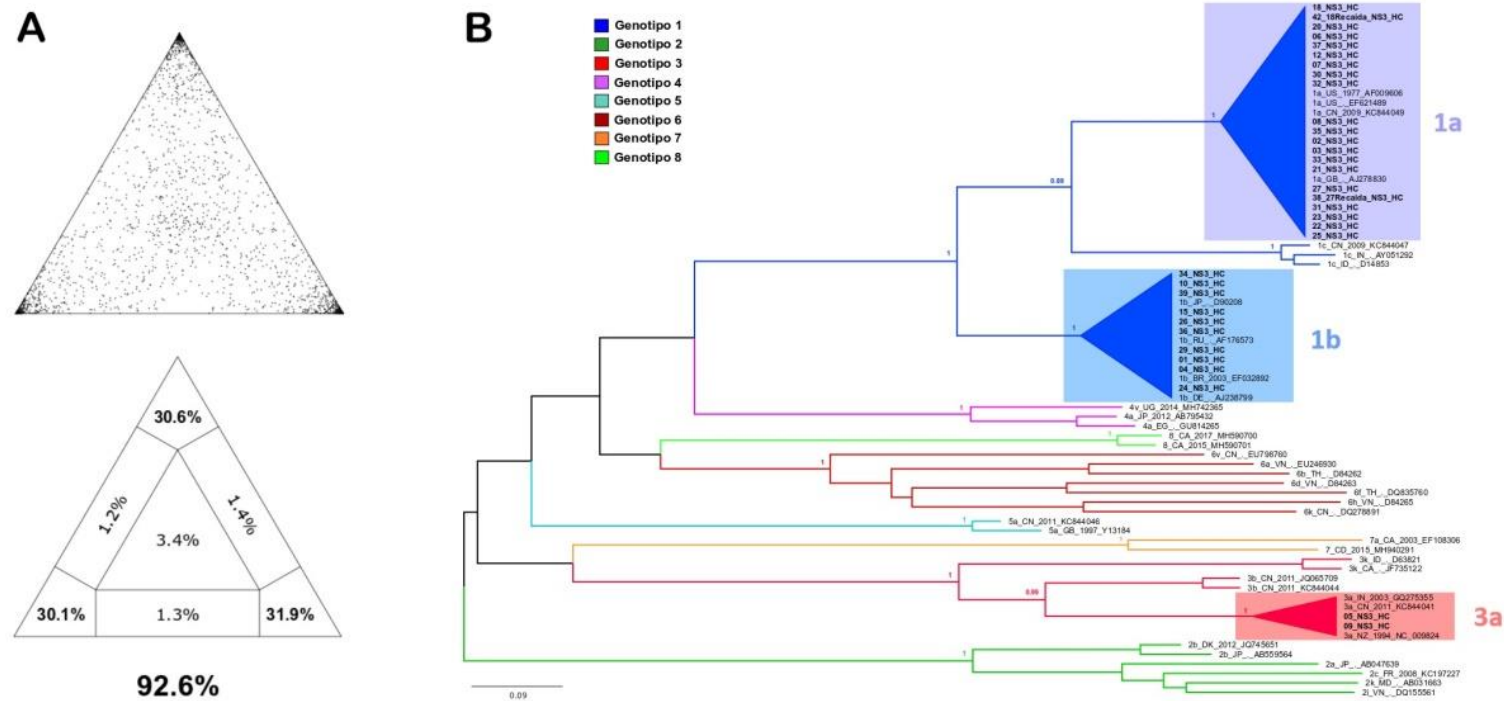


Figura 16. Análisis filogenéticos de la región que codifica para la proteína NS3. Análisis realizados sobre el alineamiento correspondiente a la región casi completa del gen NS3 (1869nt, incluyendo 40 secuencias representativas de los 8 genotipos de VHC y 33 secuencias de las muestras uruguayas) y a partir del modelo evolutivo GTR + γ + I. **A)** *Likelihood Mapping*, implementado en el programa Tree Puzzle v5.3 (Schmidt et al., 2002). El 92,6% de los árboles se resuelven completamente. **B)** Árbol filogenético de máxima verosimilitud. Se utilizó el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) con 500 pseudo-réplicas de bootstrap como medida de robustez de cada nodo. Las secuencias referencia se indican con el genotipo, el país de aislamiento (código de 2 letras), el año de aislamiento (si es desconocido se indica con un punto) y el número de acceso del *GenBank*. Las muestras uruguayas incluidas en esta tesis se indican en negrita con el número de la muestra, la región (NS3) y el origen (HC: Hospital de Clínicas). Con diferentes colores se indica cada uno de los genotipos, y los subtipos de interés se encuentran condensados y resaltados. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* para aquellos nodos con valores mayores al 70% (0,70).

Los estudios filogenéticos de la región NS3 permitieron corroborar la asignación previa de genotipos y subtipos (Capítulo 1), no detectándose ninguna incongruencia filogenética que nos hiciera pensar en la presencia de cepas recombinantes (Figura 16B). Sin embargo, la mayoría de los sitios de entrecruzamiento en los aislamientos recombinantes intergenotipo y algunos de los intersubtipo (dentro del GT1) se han reportado entre el core y NS2 (ver revisión detallada en Echeverría et al. 2015), por lo cual no puede descartarse la existencia de este evento ya que la región IRES solamente permitió genotipificar correctamente las muestras de GT3. Vale la pena mencionar que se logró subtipificar la muestra 19 (GT1b), lo cual no había sido posible con las aproximaciones anteriores (Capítulo 1). En la Figura 16B se muestra el árbol correspondiente a los primeros 1869nt de NS3, donde se observa con claridad la asignación de subtipos. Una topología similar es reconstruida a partir de la región parcial (datos no mostrados).

En conclusión, de las 38 muestras que amplificaron NS3, 23 corresponden al subtipo 1a (21 pacientes), 13 al subtipo 1b y 2 al subtipo 3a. Esta región reveló, por tanto, ser muy informativa para la genotipificación de aislamientos de VHC, y su amplificación parcial ha sido propuesta previamente como una alternativa a kits comerciales basados en otras regiones (Neukam et al. 2017), sobre todo para poder cumplir con dos fines simultáneos: genotipificación y detección de RASs (Besse et al. 2012; Di Maio et al. 2016).

5.5.3. Variabilidad genética de la región NS3

El análisis de la variabilidad genética de la región NS3 se abordó desde el punto de vista de la distancia genética (cuantificando el número de sitios con mutaciones y sustituciones) entre cada secuencia consenso obtenida (1869pb, 33 secuencias) y la respectiva “secuencia de referencia consenso mundial”.

No se observaron diferencias significativas entre muestras según el tratamiento recibido (*naïve* a todo tratamiento, NR a IFN- α -peg/RBV (PR) o NR a DAAs) (*One-way* ANOVA, $p > 0,05$, Figura 17A y B).

Por el contrario, al analizar el número de sitios mutados entre muestras correspondientes a diferentes genotipos y subtipos, se aprecia que el GT1a es significativamente menos variable (*One-way ANOVA*, $p < 0,05$), tanto a nivel de nt (Figura 17C) como de AA (Figura 17D).

Discriminando por tratamiento y genotipo, no se observan diferencias significativas (*Two-way ANOVA*, $p > 0,05$; datos no mostrados) a pesar de que dentro de las muestras GT1b se detecta una tendencia hacia un mayor número de sitios nucleotídicos mutados en aquellas provenientes de pacientes NR a PR (se excluyeron de estos análisis las muestras de GT3a y aquellas de NR a DAAs por representar valores de n muy pequeños).

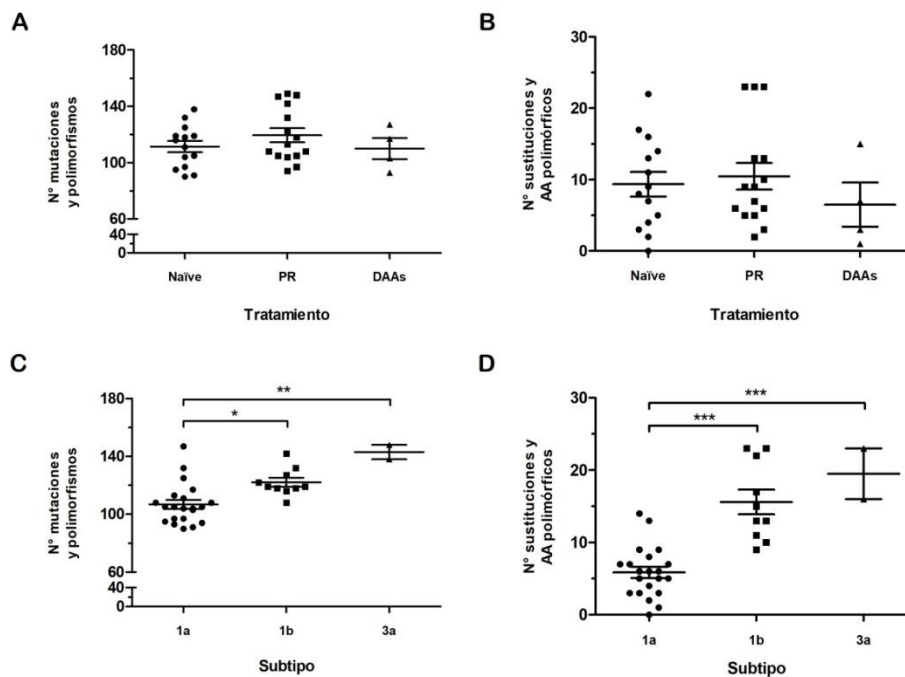


Figura 17. Número de sitios nucleotídicos y aminoácidos mutados/sustituídos en la región NS3 de acuerdo al tratamiento y el subtipo viral. Análisis realizado a partir de las secuencias casi completas de NS3 (1869pb, 33 secuencias de muestras uruguayas) que incluye el número de sitios mutados (nt) o con sustituciones (AA) así como aquellos sitios que revelaron ser polimórficos. Las comparaciones se realizaron por el test de ANOVA de una vía, con la corrección de Bonferroni. Las barras indican los errores estándares de la media (SEM, del inglés: *Standard Error Mean*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Gráficos y análisis estadísticos realizados con el software GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com). Número de sitios mutados y polimórficos de acuerdo al tratamiento (A) o al subtipo viral (C). Número de sustituciones y AA polimórficos de acuerdo al tratamiento (B) o al subtipo viral (D). PR: IFN- α -peg/RBV; DAA: cualquier combinación que incluyera una DAA.

5.5.4. Análisis de sustituciones halladas en la secuencia consenso de NS3

a. Sustituciones Asociadas a Resistencia (RASs)

El objetivo principal de este capítulo fue la identificación de sustituciones en la región NS3 de aislamientos de VHC provenientes de pacientes uruguayos, haciendo énfasis en la búsqueda de marcadores de resistencia a los DAAs.

Los resultados de este estudio permitieron la identificación de RASs a diferentes inhibidores de NS3 en el 33,3% de las muestras de GT1 analizadas (12/36). Cuatro de ellas presentaron la asociación de dos RASs diferentes en una misma cepa viral (Tabla Suplementaria 15). De los 12 pacientes que evidenciaron la presencia de RASs, 11 eran *naïve* a DAAs, lo cual refleja que las RASs a inhibidores de IPs son muy frecuentes en la población uruguaya infectada crónicamente con VHC previo al tratamiento (Tabla 6) (32,4% de 34 pacientes *naïve*). Si solo se considera a las cepas de GT1 ($n = 32$) de pacientes *naïve* a DAAs, este porcentaje es aún más alto (34,4%).

Tabla 6. Frecuencia de RASs halladas en las secuencias consensos de NS3 de GT1 obtenidas por secuenciación poblacional, provenientes de pacientes *naïve* a DAAs.

Genotipo ^a	WT ^b	Residuo	Variante	Frecuencia (% ^c)
1a ($n_{total} = 20$)	Q	80	K	3 (15,0)
	Q	80	R	2 (10,0)
	S	122	G	2 (10,0)
1b ($n_{total} = 12$)	T	54	S	1 (8,3)
	Y	56	F	1 (8,3)
	Q	80	K	1 (8,3)
	R	117	H	3 (25,0)
	S	122	G	1 (8,3)
	S	122	R	1 (8,3)

^a No se incluyen las muestras de pacientes recaedores a DAAs (en una de ellas se halló la RAS V36L).

^b WT: *wild-type*

^c Calculado en base al total de secuencias analizadas de cada subtipo

Esta alta prevalencia de RASs basales ya ha sido reportada en diferentes países del mundo (Martínez et al. 2017; Bertoli et al. 2018; Esposito et al. 2018) e incluso a partir de análisis de secuencias de diferentes bases de datos (Alves et al. 2013; Chen et al. 2016; Patiño-Galindo et al. 2016). La prevalencia de RASs a

IPs hallada en la cohorte de pacientes uruguayos *naïve* de GT1 es más alta que la reportada en Brasil (3,7% - 12,8%) (de Carvalho et al. 2014; Nishiya et al. 2014; Lisboa Neto et al. 2017; Moreira et al. 2018), pero es comparable a los reportes más recientes de Argentina (36,9% y 39,2%) (Martínez et al. 2017; Esposito et al. 2018). Algunas de estas diferencias pueden deberse a que no existe aún un consenso definitivo con respecto a la categorización de cuáles sustituciones son efectivamente RASs. De cualquier forma, es notoria la distribución diferencial de RASs entre países de la región.

La RASs más frecuentemente hallada en este trabajo fue Q80K (asociada principalmente con resistencia a SMV – 10 *fold change* – y en menor grado a asunaprevir - ASV, PTV y VOX). Fue identificada a nivel de la secuencia consenso de 4 cepas de VHC de GT1 (3 GT1a y 1 GT1b) provenientes de pacientes *naïve* a DAA (12,5% dentro del GT1). Esta prevalencia es mayor a la descrita en Argentina y Brasil (0%-2,5% y 1%-6%, respectivamente) (Peres-da-Silva et al. 2012; Martínez et al. 2017; Moreira et al. 2018; Esposito et al. 2018). Estas diferencias, para el caso de Argentina, podrían radicar en el hecho de que se analizan casi el doble de secuencias de GT1b que de GT1a (Martínez et al. 2017; Esposito et al. 2018), mientras que la proporción de genotipos en pacientes *naïve* uruguayos es inversa (20 GT1a y 12 GT1b). Esto es relevante ya que la RAS Q80K es más frecuente en el subtipo 1a que en el 1b. Sin embargo, ambos estudios argentinos analizaron mayor cantidad de secuencias de subtipo 1a que en esta tesis, y de todas maneras encontraron una baja proporción de Q80K, lo cual sugiere diferencias geográficas importantes en la distribución de RASs. De hecho, el 40% de las secuencias 1a de Estados Unidos y el 19,8% de las de Europa portan esta sustitución (Sarrazin et al. 2015; Vidal et al. 2016). Asimismo, se ha descrito que las secuencias de este subtipo se clasifican en dos clados genéticos distintos que presentan diferente distribución geográfica así como frecuencia de Q80K (De Luca et al. 2015), donde esta RAS solamente se encuentra en cepas correspondientes al clado I. En esta tesis, la frecuencia de Q80K dentro del subtipo 1a se asemeja a la de las cepas europeas (15,0% de los pacientes) y las 3 muestras que la portan pertenecen al clado I (Figura 18). Si bien la mayoría de las muestras uruguayas de subtipo 1a

agrupan en este clado, ocurre lo mismo con muchas de las argentinas (Martínez et al. 2017; Esposito et al. 2018) y de las brasileras (Peres-da-Silva et al. 2012), por tanto es claro que dentro del clado debe haber diferencias evolutivas que expliquen la disparidad de prevalencias de esta RAS en particular. Curiosamente, la sustitución Q80R (asociada a resistencia a SMV) se identificó en dos cepas de subtipo 1a pero correspondientes al clado II (Figura 18).

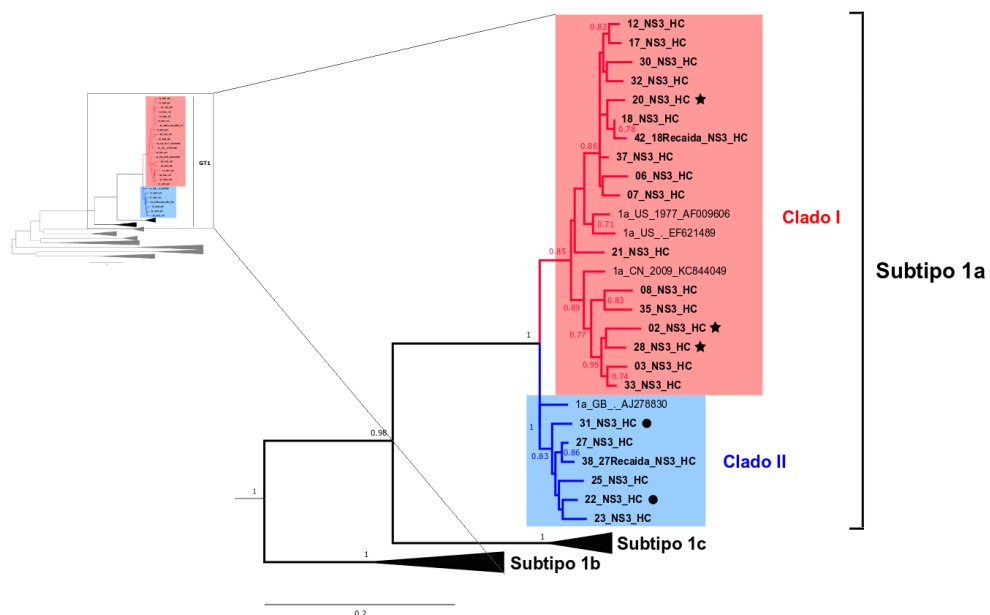


Figura 18. Árbol filogenético de máxima verosimilitud del dominio proteasa de NS3 (582nt) que muestra exclusivamente los diferentes clados del subtipo 1a. Se realizó a partir de un alineamiento con 40 secuencias representativas de los 8 genotipos de VHC y 38 secuencias de las muestras uruguayas. Se utilizó el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) con 500 pseudo-réplicas de bootstrap y el modelo evolutivo GTR+ γ +I. Las secuencias referencia se indican con el genotipo, el país de aislamiento (2 letras), el año de aislamiento (si es desconocido se indica con un punto) y el número de acceso del *GenBank*. Las muestras uruguayas incluidas en esta tesis se indican en negrita con el número de la muestra, la región (NS3) y el origen (HC: Hospital de Clínicas). Con diferentes colores se indica cada uno de los clados del subtipo 1a. Sólo se muestra ampliado el GT1, donde los subtipos 1b y 1c se esquematizan condensados. Con estrellas y círculos negros se señalan las muestras de subtipo 1a portadoras de las RASs Q80K y Q80R, respectivamente.

La RAS S122G fue hallada en 3 cepas, asociada en 2 de ellas a Q80K (Tabla Suplementaria 15). Este cambio en la posición 122 ha sido asociado a resistencia *in vitro* a VOX y SMV cuando se encuentra combinado con R155K (6,2 y 10 *fold change*, respectivamente) (Dvory-Sobol et al. 2017), lo cual no sucede en las secuencias analizadas.

Por otra parte, en un único paciente se identificó la RAS S122R, asociada con resistencia a SMV (>10 *fold change*), en combinación con la RAS R117H (Tabla Suplementaria 15). Esta última (R117H), fue asociada con un bajo nivel de resistencia a TVR y BOC (2,6 y 4 *fold change*, respectivamente) (Susser et al. 2012), y fue identificada en 3 pacientes infectados con VHC de GT1b (Tabla 6). Sin embargo, debido al hecho de que la producción de estas drogas ha sido discontinuada, esta RAS tiene al día de hoy poca relevancia.

Otras dos RASs a TVR y BOC identificadas en este estudio, la V36L y la T54S (Tabla 6), revierten mayor importancia que la anterior, ya que además presentan resistencia cruzada a otros IPs de primera y segunda generación cuando se encuentran combinadas, ya sea entre ellas o con otras sustituciones. Lo curioso sobre el cambio V36L es que no se asocia a resistencia a PTV, no obstante se identificó en el paciente recaedor a la terapia con Viekira Pak (que incluye PTV).

Finalmente, la RAS Y56F se identificó en una única cepa viral (Tabla 6). En cepas de GT1b se asocia a bajos niveles de resistencia a GZV, pero parece emerger en pacientes recaedores a terapias con esta droga (Merck & Co. Inc 2016).

A pesar de la alta prevalencia de RASs a IPs detectada en este trabajo en pacientes *naïve* a DAAs, es importante resaltar que no se halló ninguna sustitución en las posiciones 155 y 168, las cuales se han asociado a altos valores de resistencia a la mayoría de las drogas disponibles globalmente dirigidas a inhibir NS3. Esto posiblemente se explique por el bajo número de muestras analizadas, ya que RASs basales en esas posiciones se han encontrado en frecuencias menores al 3% en otros estudios (Alves et al. 2013; Martínez et al. 2017; Moreira et al. 2018). Más importante aún, la única sustitución hallada que afecta el EC_{50} a PTV es Q80K, y si se considera que actualmente esta es la única droga dirigida a la proteasa cubierta por el FNR en Uruguay (en la combinación comercial Viekira Pak), uno se vería tentado a pensar que el *screening* de esta sustitución previo al inicio de un tratamiento con este régimen sería apropiado. Sin embargo, visto que se combina con drogas dirigidas a inhibir los otros dos blancos virales más importantes (NS5A y NS5B),

sería conveniente, tanto analizar las sustituciones en esas otras dos regiones, como aumentar la cantidad de muestras antes de sacar conclusiones apresuradamente. De hecho, el único régimen para el cual se recomendaba el *screening* de esta sustitución previo a su empleo es el de SMV, por tratarse de una monoterapia (Janssen Products 2013). De todos modos, es importante tener presente esta RAS aunque no se emplee SMV, ya que frecuentemente se asocia con RASs en otras posiciones, y aumenta el nivel de resistencia no solamente a PTV, sino también a ASV y GZV (McPhee et al. 2012; Howe et al. 2014).

En conclusión, se encontró una alta proporción de cepas virales provenientes de pacientes *naïve* a DAAs con RASs basales a IPs (32,4%). Parte de esta prevalencia se explica por la alta frecuencia de Q80K.

b. Polimorfismos Asociados a Resistencia (RAPs) y sustituciones emergentes en pacientes recaedores

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 7 pacientes en las posiciones 107, 117, 122 y 123 (Tabla 7).

A nivel del AA 117 se identificaron las RAPs R117C/Y (muestras 02, 26 y 15), mientras que en la posición 122 las RAPs identificadas fueron S122N/T (muestras 04 y 16). Las RASs reportadas en estas posiciones fueron mencionadas en la sección anterior (R117H – BOC, TVR; S122G/R – SMV, VOX). Asimismo se identificó la RAP V107D (muestra 10), en la posición donde se ha descrito la RASs V107I, la cual confiere resistencia a GZV únicamente en el subtipo 1b (Merck & Co. Inc 2016). Finalmente, se detectó el cambio a una lisina en el residuo 123 (R123K), posición en la cual una glicina (R123G) se seleccionó en un clon resistente a ASV pero con un *fitness* viral tan bajo que no era capaz de replicar (McPhee et al. 2012).

Por último es importante destacar que en 6 muestras provenientes de pacientes *naïve* a DAAs se detectaron sustituciones en el dominio helicasa que han sido

reportadas como emergentes en pacientes con falla virológica al tratamiento con PTV: P334S (n=5) y S342P (n=1) (AbbVie Inc 2014) (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de RAPs y sustituciones emergentes halladas en las secuencias consensos de NS3 obtenidas por secuenciación poblacional.

Tipo de sustitución ^a	Cambio hallado	RAS descrita ^b	Frecuencia (%)
RAPs (n = 36)	R117C/Y	R117H	3 (8,3)
	S122N/T	S122G/R	2 (5,5)
	V107D	V107I	1 (2,8)
	R123K	R123G	1 (2,8)
Emergentes (n = 31)	P334S	NC	5 (16,1)
	S342P	NC	1 (3,2)

^a Emergentes: Refiere a sustituciones que fueron reportadas como emergentes en pacientes con falla virológica al tratamiento con paritaprevir (AbbVie Inc 2014). Como se localizan en la región helicasa, se analizaron únicamente en aquellas muestras en las que se obtuvo la secuencia de NS3 completa.

^b **NC:** No corresponde

En conclusión, se encontró una gran diversidad de sustituciones relacionadas a resistencia (RASs, RAPs y emergentes) en varios de los aislamientos analizados. De estos pacientes, sólo 4 fueron tratados con Viekira Pak posterior a la toma de muestra, y en 3 de ellos se alcanzó una RVS (10 – RASs R117H+S122G, RAP V107D; 25 – Sustitución emergente P334S; 36 – RAP R123K) mientras que el paciente restante (35), el cual portaba la RAS V36L debió ser posteriormente re-tratado con otra combinación de drogas y también se curó. Es importante mencionar que además de estos 4 pacientes, otros 6 se curaron gracias a tratamientos con DAAs, pero estos tratamientos no incluían IPs (04, 06, 14, 19, 20 y 22).

c. Sustituciones no asociadas *a priori* con resistencia a DAAs

En referencia a las sustituciones no asociadas previamente con un fenotipo resistente, se hallaron un total de 79 cambios diferentes en los aislamientos de GT1a (n = 21), 90 en los de GT1b (n = 10) y 36 entre los de GT3a (n = 2) (Tabla Suplementaria 16). La diferencia tan notoria en cantidad de sustituciones entre el GT1 y el GT3 se correlaciona directamente con el bajo número de muestras correspondientes a este genotipo.

- **Conservación de la tríada catalítica, residuos de unión al Zn^{2+} y residuos importantes del dominio helicasa**

El análisis de sustituciones reveló, como era de esperarse, un gran nivel de conservación tanto a nivel de la tríada catalítica (H57, D81 y S139) como a nivel de los residuos involucrados en la unión al Zn^{2+} (C97, C99, C145 y H149). Aunque en algunas muestras ($n = 10$) se detectaron sustituciones en posiciones contiguas a estos residuos, la mayoría refieren a cambios que no modifican las propiedades fisicoquímicas de los AA involucrados. Este nivel de conservación demuestra la relevancia de mantener esos residuos incambiados con el fin de poder cumplir con su rol de clivado de la poliproteína viral para generar de este modo, proteínas funcionales (Bartenschlager and Lohmann 2000). Además de su función en el ciclo replicativo, la conservación de estos sitios permite al virus interferir con la respuesta inmune mediada por IFN, clivando moléculas intermediarias como MAVS y Trif (Li et al. 2005a; Li et al. 2005b).

Asimismo, no se hallaron sustituciones en el dominio helicasa que abroguen su actividad (AAs 432 y 501) (Raney et al. 2010) o que reduzcan el *fitness* viral (AAs 438, 524, 525, 527, 528 y 532) (Stross et al. 2016).

- **Sustituciones en sitio de interacción con NS4A**

No obstante, se identificaron sustituciones en sitios involucrados en la interacción con el co-factor NS4A, región que corresponde a los residuos 1 al 30 de NS3 (Failla et al. 1994; Love et al. 1998). Si bien se encontraron las sustituciones Q9H y R24K, presentes cada una solamente en una muestra, se hallaron otros cambios en mayor frecuencia en las secuencias analizadas, particularmente en los residuos 7, 13, 14, 18 y 26 (Tabla Suplementaria 16). Aunque la mayoría de estos cambios no afectan las propiedades fisicoquímicas de los AA, muchas posiciones son muy conservadas en los diferentes genotipos, lo cual hace pensar que estos cambios podrían afectar de algún modo la unión con el co-factor, el cual se sabe es fundamental para el posicionamiento de la tríada catalítica y del sustrato (Love et al. 1998), hecho que debería ser estudiado en más profundidad.

- **Sustituciones en sitios de interacción con enzima APOBEC3G**

Finalmente, en 4 cepas de VHC se identificaron las sustituciones N256T, T269P + T298S, D555E y N556T, las cuales se localizan en diferentes regiones de interacción entre NS3 y la enzima celular APOBEC3G (A3G) (Zhu et al. 2015). A3G es una citidina deaminasa que cataliza la deaminación de citosina a uracilo en sustratos de ADN simple hebra y que restringe la replicación de diversos virus de ARN (VIH, VHB, VHC, entre otros), tanto por mecanismos dependientes como independientes de su función (Cullen 2006; Nguyen et al. 2007; Peng et al. 2011). La hipermutación G>A, resultado de la edición, sólo se ha detectado en VIH (Zhang et al. 2003), lo cual motivó la búsqueda del mecanismo asociado a la inhibición de la replicación en VHC. Así es que se determinó que el mecanismo se basa en la inhibición de la actividad helicasa de NS3, mediante la unión de los extremos C-terminales de ambas proteínas (Zhu et al. 2015). Los virus afectados por la actividad antiviral de esta enzima, han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestarlo. El ejemplo mejor conocido es el de VIH, quien mediante su proteína Vif, marca a A3G para ser ubiquitinada y posteriormente degradada (Sheehy et al. 2002; Marin et al. 2003). La estrategia de VHC es aún desconocida y ha suscitado controversias. Mientras que un reporte a partir de ensayos en cultivo celular sugiere que, de algún modo, VHC disminuye gradualmente los niveles intracelulares de la deaminasa, asegurando así su replicación (Zhu et al. 2015), otros estudios encuentran que la expresión de esta enzima estaría aumentada en pacientes infectados crónicamente por este virus (Komohara et al. 2006; Zhu et al. 2016). Considerando lo anterior, los cambios hallados en esta tesis en NS3 en sitios de interacción con A3G podrían representar un modo de evadir la acción de esta enzima, comprometiendo su unión y por tanto posibilitando la correcta actividad helicasa de NS3.

5.5.5. Análisis de Secuenciación Masiva

a. Control de calidad: librerías para NGS y resultados de NGS

Como se mencionó en Materiales y Métodos (Sección 5.4.6) se seleccionaron para secuenciación profunda 10 muestras de 9 pacientes (7 pre y 3 post-

tratamiento) que no exhibían RASs en NS3 en las secuencias consensos obtenidas por secuenciación Sanger. Seis de esos pacientes (12, 25, 34, 36, 37, 39), cuyas muestras correspondían a tomas basales, fueron tratados con Viekira Pak (PTV/Ritonavir/OBV/DSV) y se curaron. Sin embargo, el paciente 12 alcanzó una RVS recién un año post-finalización de terapia (previo a esa fecha el ARN de VHC se mantuvo detectable, pero no cuantificable). También se incluyeron dos pacientes recaedores a terapias con DAAs (01, tratado con terapia triple de PR/TVR; y 42, tratado con SOF/LDV, sin IP), así como el paciente 27, del cual se contaba con la muestra pre-tratamiento con DAAs, y la muestra post recaída con SOF/LDV (38).

Una vez generadas las librerías a partir de los productos de PCR de la región NS3 completa, se analizó su calidad (integridad del ADN) utilizando el Bioanalyzer. Este análisis permitió corroborar que la distribución de los fragmentos con adaptadores seguía una distribución gaussiana en todas las muestras, tal y como era esperable, con fragmentos de tamaños estimados promedio de 400-650pb (Figura suplementaria 3).

El rendimiento teórico del kit de secuenciación empleado (MiSeq Reagent Kit v2, 2x250) es de 7,5–8,5 *gigabytes* (Gb), y en este caso el rendimiento fue excelente (8,9Gb). Del total de bases secuenciadas, el 78,4% (7,0Gb) presentó una calidad promedio $\geq Q30$ (Figura suplementaria 4A) lo cual se encuentra dentro de los valores esperados de calidad según las especificaciones de Illumina para este kit y secuenciador (>75%).

Posterior a la secuenciación, los resultados crudos permitieron determinar además que el indexado de las secuencias funcionó correctamente ya que el 97,0% de los *reads* mostraron contener los adaptadores en los extremos. Asimismo, cada muestra obtuvo entre 4,6 y 11,2% del total de *reads* secuenciados (Figura suplementaria 4B), lo cual, a pesar de no reflejar una distribución homogénea, sugiere que ninguna de las muestras se encuentra muy sobrerrepresentada.

A partir de los datos crudos, se procedió al trimado para remover secuencias contaminantes y aquellas de baja calidad (Figura suplementaria 5A). Primeramente se removieron adaptadores y *reads* con promedios de calidad <Q25 (3,5%-9,3% de *reads* fueron removidos en este paso de trimado inicial). A continuación se removieron todas las secuencias en las cuales los cebadores empleados se encontraran sobrerrepresentadas y todos aquellos *reads* cuyos tamaños fueran menores a 36nt (trimado final). Este último filtrado resultó en 39,5%-67,5% de *reads* de buena calidad, dependiendo de la muestra, lo que corresponde a $9,6 \times 10^5 - 1,1 \times 10^6$ *reads* por muestra (Tabla Suplementaria 17).

La calidad de estos *reads* filtrados (resultado del trimado final) fue analizada con el programa FastQC (Andrews 2010). Los resultados fueron similares para todas las muestras. Los datos mostraron que a pesar de la selección de tamaños mayores a 36pb, la amplia mayoría de los *reads forward* tenían tamaños promedios de 245pb (Figura suplementaria 5B) mientras que los reversos eran más pequeños (~180pb) (no mostrado). La calidad a lo largo de las diferentes posiciones de los *reads forward* se mantuvieron altas (Figura suplementaria 5C) con un promedio por *read* de Q37 (Figura suplementaria 5D). Para los *reads* reversos, la calidad se mantuvo alta a lo largo del *read*, pero para aquellos mayores a 200pb, a partir de esas posiciones la calidad era más baja (Q28). A pesar de ello, el promedio de calidad por *read* reverso fue de Q36 (no mostrado).

b. Alineamientos de datos masivos filtrados

Los datos ya filtrados (calidad, largo y sin contaminantes), se alinearon con las secuencias consensos de cada muestra de NS3 obtenida por secuenciación Sanger. Así se obtuvo que los porcentajes de *reads* de cada muestra que alinearon con NS3 variaron entre 22,1%-74,0% (Figura suplementaria 6).

c. Cobertura y calidad de la región NS3

La cobertura a lo largo de todo el gen es relativamente uniforme, con excepción de los extremos (Figura 19). En promedio, la cobertura de cada muestra varió entre 26.000X y 137.000X. Si se tiene en cuenta que se trata de muestras virales en las cuales se desea caracterizar las variantes de baja frecuencia (<15%) así

como aquellas minoritarias (entre 0,1-1%), una cobertura de 10.000X permite identificar variantes que se encuentren en una frecuencia de 0,1%, por tanto, todas parecen ser suficientes para cumplir con el objetivo propuesto.

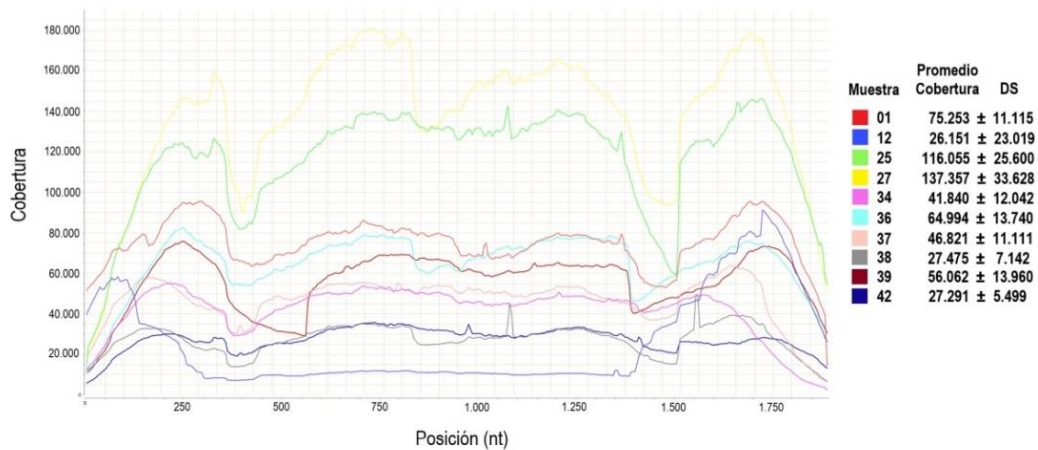


Figura 19. Cobertura a lo largo del gen de NS3 luego del alineamiento de los reads filtrados. Cada color representa una muestra. A la derecha se indica la cobertura promedio y su desviación estándar (DS). Calculado con la herramienta Qualimap 2 (Okonechnikov et al. 2015)

d. Secuencias consenso generadas a partir de la secuenciación masiva

A modo de control entre los resultados obtenidos por secuenciación Sanger vs masiva, se compararon las secuencias obtenidas por ambos métodos. Esta comparación se realizó utilizando el *pairwise distance* implementado en el software MEGA6 (incluyendo o no, sitios polimórficos).

Estos estudios mostraron en la mayoría de las muestras una gran concordancia entre ambos métodos de secuenciación (similaridad nucleotídica mayor al 98%, y aminoacídica mayor al 99%) (Figura 20), con excepción de la muestra 27. La mayoría de los cambios refieren a posiciones polimórficas, ya sea evidenciadas por dobles picos en cromatogramas de secuenciación Sanger, o por sitios con varias bases (con frecuencias mayores a 30%) reveladas por NGS. En la muestra 27, además de múltiples posiciones polimórficas en una u otra secuenciación, se revelaron 55 cambios nucleotídicos, 6 de los cuales fueron no sinónimos. Estas diferencias pueden deberse a aspectos técnicos, ya sea en el proceso de pre-amplificación de las librerías, o a que el amplicón secuenciado

por Sanger no fue exactamente el mismo que al secuenciado por masiva (ya que el volumen no fue suficiente y se debió reamplificar la muestra).

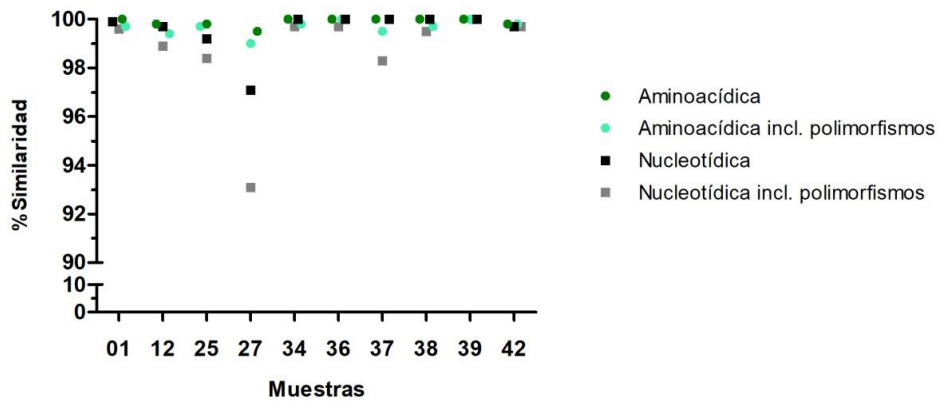


Figura 20. Similitud nucleotídica y aminoacídica entre las secuencias consenso de NS3 obtenidas por secuenciación Sanger vs NGS. Gráfico realizado con el software GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

e. Identificación de cambios minoritarios y de baja frecuencia

Para determinar las variantes minoritarias se recomienda alcanzar profundidades de *reads* >10.000X ya que la tasa de error del equipo MiSeq de Illumina es de 1 error cada 1000 bases (Loman et al. 2012). Dado que la plataforma web Galaxy, que se utilizó hasta los análisis anteriores, no ha sido diseñada para el análisis de secuenciación de virus de ARN (ya que solo permite analizar profundidades de hasta 8000 *reads*), el *SNP calling* se realizó empleando línea de comando.

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

En este estudio se focalizó en la búsqueda de cambios a nivel de regiones de interés, como las de interacción con el co-factor NS4A, con la enzima celular A3G, con el Zn²⁺, así como cambios a nivel de la tríada catalítica y en las posiciones donde fueron descritas previamente RASs y RAPs.

- **Regiones de interacción con NS4A y con A3G**

Las regiones de interacción con NS4A y A3G mostraron una gran variabilidad: en la mayoría de las muestras (9/10) se encontraron entre 1 y 9 sustituciones diferentes por muestra en la región de unión al co-factor, y de 1 a 5 sustituciones en las regiones de interacción con A3G (datos no mostrados). La amplia mayoría de estos cambios son minoritarios (<1%), y tan solo 5 de ellos se encontraron en baja frecuencia (entre 1,2-6,0%). En la muestra restante (12) se encontraron 22 sustituciones en la región de interacción con NS4A y 5 en la región de unión a A3G, todos como cambios minoritarios.

- **Tríada catalítica y región de interacción con el Zn²⁺**

Inesperadamente, a pesar de la conservación de la tríada catalítica a nivel de las secuencias consensos previamente analizadas, se detectaron cambios en los AA H57, D81 y S139 en 4 muestras (en todos los casos en frecuencias minoritarias) (datos no mostrados). En los sitios de interacción con el Zn²⁺, se identificó un cambio en la cisteína 145 como cambio minoritario. Interesantemente, en una de las muestras (12) se halló una variante mayoritaria (C99G–23,9%), que no fue detectada por secuenciación Sanger. Esto refleja que el umbral de detección de la secuenciación Sanger, normalmente establecido en 15-20%, puede variar. Más importante aún, surge la interrogante si estas variantes en sitios claves para la funcionalidad de la proteína, podrían representar genomas defectivos con alguna función en la progresión de la infección.

- **RASs y RAPs**

Un hallazgo sorprendente refiere a la baja cantidad de RASs y RAPs identificadas por NGS, ya que se esperaba encontrar mayor cantidad de variantes de resistencia minoritarias o de baja frecuencia que no se revelaran en las secuencias consensos Sanger. Sin embargo, sólo se hallaron RASs de baja frecuencia en 4 de las 10 muestras estudiadas, todas ellas de GT1a (Tabla 8). Es importante recordar que ninguna de las muestras sometidas a NGS exhibía RASs en sus secuencias consensos.

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA REGIÓN NS3 Y BÚSQUEDA DE RASs A INHIBIDORES DE LA SERÍN-PROTEASA Y OTRAS SUSTITUCIONES

Tabla 8. RASs halladas como variantes minoritarias (0,1-1%) y de baja frecuencia (1-15%) en las muestras analizadas por NGS.

Muestra	Tratamiento ^a	RASs (% conteo) ^b	Resistencia a DAAs ^c	Referencias
12	Naïve	V36A (0,13%, 64/48920)	ASV, BOC, GZV, SMV, TVR, VOX	(Lenz et al. 2010; McPhee et al. 2012; Ogert et al. 2013; Howe et al. 2014; Dvory-Sobol et al. 2017)
		T54A (0,13%, 39/29761)	BOC, TVR	(Tong et al. 2008; Susser et al. 2009; Lenz et al. 2010)
		V55A (0,19%, 56/29520)	BOC, TVR, VOX	(Susser et al. 2009; Dvory-Sobol et al. 2017)
25	PR	S122G (0,34%, 300/88610)	SMV, VOX	Idem al anterior S122G
38	SOF/LDV	R155K (4,56%, 999/21887)	ASV, BOC, GZV, PTV, SMV, TVR, VOX	(Tong et al. 2008; Susser et al. 2009; Lenz et al. 2010; Howe et al. 2014; Pilot-Matias et al. 2015; Sulkowski et al. 2015; Jensen et al. 2015; Dvory-Sobol et al. 2017)
42	SOF/LDV	S122G (1,12%, 215/19158)	SMV, VOX	Idem al anterior S122G
1	PRT	-	-	-
36	Naïve	-	-	-
27/34/37/39	PR	-	-	-

^a PR - IFN- α -peg/RBV; PRT - IFN- α -peg/RBV/Telaprevir; SOF/LDV - Sofosbuvir/Ledipasvir

^b Conteo = cantidad de *reads* con la variante/profundidad en esa posición. En negrita se indican las variantes de baja frecuencia (1-15%)

^c ASV: Asunaprevir, BOC: Boceprevir, GZV: Grazoprevir, PTV: Paritaprevir, SMV: Simeprevir, TVR: Telaprevir, VOX: Voxilaprevir. Se incluyen aquellas con niveles de resistencia bajos y altos (valores de EC₅₀ >20 *fold change* para IPs de 2da generación como GZV y VOX, o >10 *fold change* para IPs de 1a generación como ASV, BOC, PTV, SMV, TVR). La RAS S122G (SMV, VOX), así como la mayoría de las RASs a VOX generan resistencia únicamente en combinación con otras.

Las RASs V36A, T54A y V55A se encontraron en frecuencias minoritarias en la muestra 12, siendo ésta la muestra que exhibió más cambios de resistencia. La mayoría de ellos no habían sido identificados en ninguna muestra por secuenciación Sanger, probablemente porque son variantes de muy bajo *fitness* replicativo que usualmente emergen como mayoritarias bajo presión selectiva (Susser et al. 2009; Lenz et al. 2010; McPhee et al. 2012). Adicionalmente, esta misma muestra presentó dos sustituciones minoritarias reportadas como emergentes a la terapia con Viekira Pak: S342P y V406A (profundidades <10.000X). La gran variabilidad encontrada en esta muestra, que se diferencia notoriamente de las restantes, podría en parte ser reflejo de problemas durante la secuenciación, que hayan derivado en una cobertura asimétrica (Figura 19) y en una sobrerrepresentación de *reads* con mutaciones. Sin embargo, no puede descartarse que los numerosos cambios, aún en frecuencias minoritarias, no

sean capaces de influir en la habilidad de este aislamiento de persistir en el hospedero. Muchos de los cambios otorgarían un menor *fitness* a dichas variantes y otros permitirían evadir la acción antiviral de A3G, todo lo cual podría contribuir a que estas variantes permanezcan en el hospedero, tal vez posibilitando su persistencia en diferentes sitios extrahepáticos. Se debe recordar que este paciente, posterior a la toma de muestra, fue tratado con SOF/LDV/RBV, y si bien a la semana 4 (intra-tratamiento) la CV fue negativa, 12 y 24 semanas post-finalización del tratamiento, el ARN viral fue detectable pero no cuantificable, y recién al año de finalizar la terapia el ARN fue indetectable. Esta situación es inusual ya que, si bien se han reportado casos de viremia detectable al EOT, alcanzan una RVS a la semana 12 (RVS₁₂) (Childs-Kean and Hong 2017; Malespin et al. 2017; Maasoumy et al. 2018). Solamente hay un caso reportado donde se detectó presencia viral al EOT (EOT+), con ARN indetectable a la semana 4 post-tratamiento, pero con el desarrollo de una recaída entre las semanas 4 y 12 luego del tratamiento (Malespin et al. 2017). Dadas las características virológicas, el caso del paciente 12 podría categorizarse como una RVS tardía ya que hasta la semana 24 post-tratamiento el ARN era aún detectable. Todas estas particularidades hacen repensar las causas previamente sugeridas para explicar los casos de EOT+/SVR₁₂ (viriones y ARNs defectivos que pueden ser eliminados por una respuesta inmune efectiva), ya que no explicarían la permanencia del ARN viral en el tiempo. Si la respuesta inmune fuera defectiva, eventualmente el paciente hubiera recaído. Por tanto una opción podría ser que la respuesta inmune fuera subóptima y por tanto incapaz de eliminar rápidamente los viriones residuales. Esto podría explicar por qué se necesitó de un año para resolver la infección completamente.

La RAS S122G se halló como variante minoritaria en la muestra 25 (NR a la biterapia clásica) y como variante de baja frecuencia en la muestra 42 (recaedor a SOF/LDV), conjuntamente con las RAPs F43C (0,11%) y R117C (1,59%).

La RAS R155K, se encontró en el 4,56% de las variantes de la cuasiespecie de la muestra 38. Curiosamente, las dos muestras con RASs de baja frecuencia en sus cuasiespecies corresponden a muestras de pacientes recaedores a terapias

con DAAs (SOF/LDV), pero que no incluían ningún inhibidor de NS3. Aunque para la muestra 42, no se cuenta con el análisis de la muestra pre-tratamiento, para la 38, su muestra basal (27) no exhibió ninguna RASs, ni siquiera como variantes minoritarias. Esto podría indicar que la RAS R155K podría estar ligada a alguna mutación emergente en NS5A o NS5B. Desafortunadamente, no se cuenta con los análisis de NGS de estas otras regiones al momento de escritura.

Dos muestras de las que no presentaron RASs, sí presentaron RAPs como variantes minoritarias: A156D (0,52%, muestra 34) y F43C (0,11%, muestra 37). Las RASs reportadas en estas posiciones son A156F/G/L/N/S/T/V y F43I/L/S/V, las cuales confieren resistencia a múltiples IPs.

El uso de NGS para identificar RASs a DAAs en VHC se ha abordado casi paralelamente a la aprobación de los diferentes antivirales directos. No obstante, su utilidad para guiar la elección de un tratamiento o bien su duración, parece ser importante únicamente para las RASs a inhibidores de NS5A (AASLD-IDSA 2018). De todos modos, el desarrollo y la aprobación de los DAAs es un campo muy activo y las recomendaciones de testeo de RASs pueden variar en el futuro. Igualmente, es de hacer notar que 4 de los 6 pacientes que no presentaron RASs minoritarias ni de baja frecuencia, fueron posteriormente tratados con un régimen que incluía PTV y alcanzaron una RVS (34, 36, 37 y 39).

En suma, en este trabajo se identificaron pocas sustituciones de resistencia con un límite de detección (*cut-off*) de 0,1-1% (n = 4) y de 1-15% (n = 2) (Tabla 8). Sin embargo, a pesar de que se esperaba encontrar mayor cantidad por muestra así como en mayor número de muestras, la amplia mayoría de los reportes sobre identificación de RASs de baja frecuencia en NS3 (empleando NGS) parecen indicar que lo observado en los pacientes uruguayos sería la norma. Estos estudios, realizados en pacientes crónicos en diferentes países, han identificado muy baja cantidad de RASs por paciente, así como en una baja proporción de éstos (Svarovskaia et al. 2012; Margeridon-Thermet et al. 2014; Gaspareto et al. 2016; Pedersen et al. 2018; Esposito et al. 2018), sin importar el método de secuenciación masiva empleado (Ion Torrent, 454/Roche, MiSeq Illumina).

5.6. Conclusiones

- Se pudo amplificar exitosamente la región NS3 en 38 muestras. Tanto a nivel de nt como de AA, el GT1b demostró ser más variable que el GT1a.
- La frecuencia de RASs a IPs en pacientes *naïve* a DAAs infectados con el GT1 fue de 34,4%.
- La distribución de RASs, difiere a la reportada en países vecinos, donde la sustitución Q80K es poco frecuente y en esta tesis, se reportó en el 15,0% de las cepas de GT1a de pacientes *naïve* a DAAs.
- En las secuencias consenso, además de RASs, se hallaron RAPs y sustituciones emergentes al tratamiento con PTV. Por NGS se revelaron pocas RASs como cambios minoritarios y de baja frecuencia en cepas que no presentaron sustituciones de resistencia en sus secuencias consenso Sanger.
- Aunque a nivel de secuencias consenso Sanger se constató una gran conservación de los AA de la tríada catalítica y de unión al Zn^{2+} , estos sitios fueron más variables al analizar variantes dentro de la cuasiespecie.
- Múltiples sustituciones fueron encontradas en regiones de interacción con otras proteínas, tanto en secuencias consenso como en variantes minoritarias y de baja frecuencia.
- Resultados parciales de este capítulo dieron origen a la siguiente publicación científica (Echeverría et al. 2016), la cual se adjunta al final de esta tesis:

Echeverría N, Betancour G, Gámbaro F, Hernández N, López P, Chiodi D, Sánchez A, Boschi S, Fajardo A, Sónora M, Moratorio G, Cristina J, Moreno P (2016). Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: Their relevance for developing countries. *Virus Research*, 223, 140–146. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.07.008

6. CAPÍTULO 4

VARIANTES NATURALES DEL IRES Y SU EFICIENCIA TRADUCCIONAL VIRAL

6.1. Antecedentes y fundamento teórico

La iniciación de la traducción es un proceso complejo que en eucariotas requiere de más de 12 factores de inicio (eIFs). Este mecanismo de iniciación es cap-dependiente y es el mecanismo canónico utilizado por el 95-97% de los mensajeros celulares (Gale et al. 2000).

Sin embargo, existen mecanismos de iniciación de la traducción cap-independiente, los cuales son utilizados tanto por las células eucariotas en situaciones de *stress* así como por diferentes agentes virales (Gale et al. 2000; Martínez-Salas et al. 2012). Uno de estos mecanismos, y el más ampliamente utilizado por diferentes familias virales es dependiente de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Este mecanismo fue descrito por primera vez en 1988 en el virus del polio (Pelletier and Sonenberg 1988). Estos estudios permitieron concluir que el IRES es un elemento genético estructurado que facilita la entrada del ribosoma al ARNm independientemente de la presencia del cap, y con menores requerimientos de factores canónicos de inicio traduccional que la célula eucariota. La mayoría de los IRES virales descritos hasta el momento presentan estructuras secundarias extensas que se encuentran en regiones 5'NCR que hacen incompatible el escaneo ribosomal hasta el codón de inicio, por lo cual este mecanismo de iniciación les provee de una ingeniosa alternativa para la producción de sus proteínas. Adicionalmente se han descrito factores celulares que actúan en *trans* (ITAFs) y promueven la traducción mediando interacciones con el ribosoma y el ARNm. Estas interacciones entre proteínas del hospedero y los IRES contribuyen a la especificidad de rango de huésped y a la virulencia (Gale et al. 2000). Tanto la estructura secundaria como la secuencia primaria del IRES cumplen roles fundamentales en el inicio de la traducción y de ser alteradas pueden afectar, tanto de forma positiva como

negativa, la actividad traduccional (Fernández-Miragall and Martínez-Salas 2003; Barría et al. 2009; Angulo et al. 2016).

Como ya fue indicado, VHC emplea un mecanismo IRES-dependiente para la traducción de sus proteínas. El IRES se localiza en el extremo 5'NCR (Pestova et al. 1998) y se extiende desde aproximadamente el nucleótido 42 del extremo 5'NCR a los primeros 12 a 30 nucleótidos del core, conformando los dominios II al IV del IRES (Honda et al. 1996b; Reynolds et al. 1996) (Figura 21).

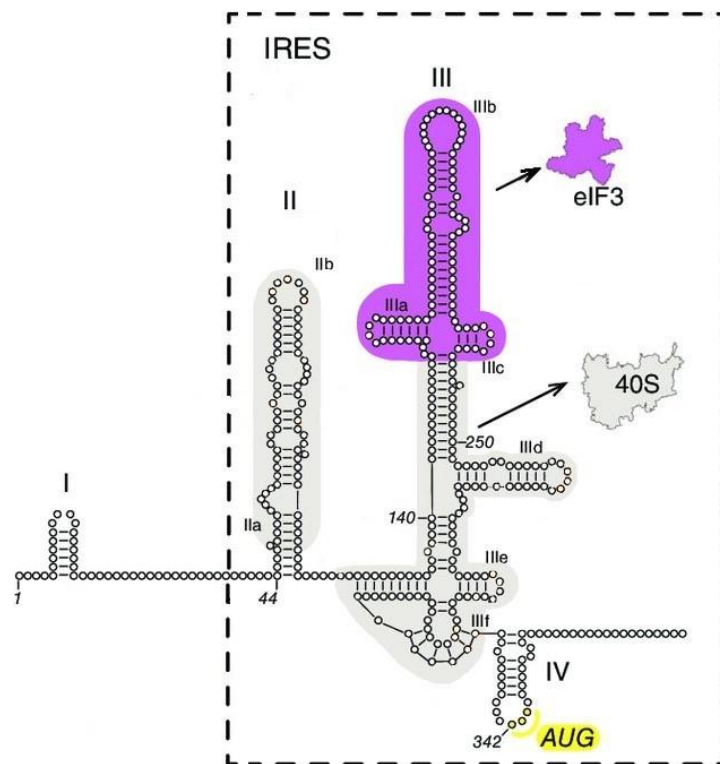


Figura 21. Estructura secundaria del IRES de VHC. La estructura mínima del IRES de VHC se conforma de los dominios II, III y IV del extremo 5'NCR (se indica recuadrada con líneas cortadas). En amarillo se señala el codón de inicio de la traducción. Sombreado en gris y en violeta se muestran los sitios de contacto con la subunidad ribosomal menor (40S) y el factor de inicio de la traducción eIF3, respectivamente (modificado de Mailliot and Martin, 2018).

En este caso, la subunidad menor del ribosoma es reclutada directamente al codón de inicio (Pestova et al. 1998) y son necesarios pocos factores canónicos de inicio de la traducción para estabilizar el complejo de pre-iniciación (Ji et al.

2004). Los dominios II y III interactúan directamente con la subunidad ribosomal 40S y ayudan al posicionamiento de ésta sobre el codón AUG (en el dominio IV) (Berry et al. 2010). Además, el dominio III regula la unión al factor eIF3 (Sizova et al. 1998) mientras que el dominio II regula la hidrólisis de GTP mediada por el factor eIF5 (Locker et al. 2007).

En general, mutaciones que alteran regiones de doble hebra generan efectos detrimentales para la traducción, a no ser que sean acompañadas por mutaciones compensatorias que restauren el apareamiento de bases Watson-Crick (Wang et al. 1994). Por el contrario, las que se localizan en bucles (regiones simple hebra) tienden a mantener la eficiencia traduccional. Una excepción se da en el subdominio III_d (triplete de Gs) que interactúa con el ARN ribosomal 18S, y cuyos cambios disminuyen drásticamente la eficiencia traduccional (Jubin et al. 2000; Barría et al. 2009; Angulo et al. 2016).

Como se mencionó en la Introducción (sección 1.7.1), VHC circula *in vivo* como una cuasiespecie (Martell et al. 1992). Aunque es claro que la variabilidad del IRES afecta el tropismo celular (Sáiz et al. 1999; Laporte et al. 2000; Laskus et al. 2000), existen controversias respecto a la relación entre la diversidad de las cuasiespecies, la eficiencia traduccional y la persistencia viral en el organismo. Algunos estudios muestran que variantes mayoritarias de IRES provenientes de sitios extrahepáticos tales como células dendríticas y tejidos cerebrales, serían poco eficientes a nivel traduccional, lo cual sugeriría que estos sitios podrían estar actuando como reservorios o santuarios virales (Laporte et al. 2003; Forton et al. 2004), contribuyendo así a la persistencia del virus en el individuo. Sin embargo, otros estudios arriban a resultados controversiales ya que muestran que algunas variantes presentes en baja frecuencia en suero son ineficientes en células hepáticas, mientras que presentan eficiencias traduccionales variables en diferentes células linfoides (Laporte et al. 2000; Lerat et al. 2000).

A pesar de los cambios revolucionarios en las terapias anti-VHC en los últimos años, el desarrollo de vacunas profilácticas para prevenir la infección permanece elusivo, aún luego de dos décadas de investigaciones. Ninguno de los múltiples abordajes empleados contempla el diseño de vacunas a virus atenuados,

estrategia que fue exitosamente empleada con la vacuna contra el virus del polio (PV) (Sabin and Boulger 1973). Las tres formulaciones de la vacuna de PV contienen cepas que, por pasajes sucesivos en células no humanas, seleccionaron mutaciones a lo largo del genoma viral. De ellas, la principal responsable del fenotipo atenuado es una mutación en el dominio V del IRES de PV que reduce drásticamente la eficiencia traduccional viral (Macadam et al. 1991).

En nuestro país, si bien se ha indagado previamente sobre la diversidad de la región 5'NCR en cepas de VHC de pacientes uruguayos crónicamente infectados (Moratorio et al. 2007), no existen estudios que aborden la eficiencia traduccional de estas variantes del IRES, ni tampoco análisis que intenten relacionar la capacidad del virus de generar proteínas, con parámetros de la infección tales como la CV o la respuesta a la terapia.

Asimismo, como ya se mencionó, existen estudios contradictorios respecto al rol de variantes ineficientes en la persistencia viral. Visto que otros aspectos del ciclo viral se han vuelto objeto de estudios más recientes (ver Capítulos 3 y 5), es necesario profundizar en el análisis de este tipo de variantes por la implicancia que pueden tener en la persistencia, incluso en la era de los DAAs. Se ha determinado que existe riesgo de recaída tardía post tratamiento con DAAs (Hayashi et al. 2018; Pisaturo et al. 2019), aún luego de trasplante hepático (Erard-Poinsot et al. 2018), pero no se han estudiado los posibles mecanismos involucrados. Aunque la relación con recaídas tardías no se abordará en esta tesis, se considera importante continuar con la caracterización de variantes ineficientes del IRES que permitan dar puntapié a estudios más profundos sobre la relación entre estas variantes, la persistencia en el organismo y la recaída al tratamiento.

Finalmente, la posibilidad de emplear variantes virales traduccionalmente atenuadas como una estrategia vacunal, es interesante. A este respecto, conocer qué mutaciones pueden causar atenuación traduccional podría proveer de nueva información para el desarrollo de una posible vacuna atenuada que combine esta estrategia junto con otras que eviten la persistencia viral.

6.2. Hipótesis

Según lo planteado anteriormente, es de esperar que a nivel de las secuencias mayoritarias, las eficiencias traduccionales sean similares a las exhibidas por las secuencias de referencia. De existir algunas traduccionalmente ineficientes, esto podría correlacionar con menores títulos virales y posiblemente con una mejor respuesta a la terapia.

Por otra parte, se plantea la existencia de subpoblaciones de variantes con diferentes eficiencias traduccionales dentro de la cuasiespecie viral. En este contexto, aquellas poblaciones poco eficientes traduccionalmente, son las que podrían pasar “desapercibidas” ante el sistema inmune del hospedero, contribuyendo a la persistencia de esta infección.

6.3. Objetivos Específicos Capítulo 4

Objetivo Específico 4a: Analizar las diferentes variantes naturales del IRES (a nivel de secuencias mayoritarias y a nivel de clones presentes en baja frecuencia en la cuasiespecie) provenientes de cepas aisladas de pacientes crónicamente infectados por VHC y evaluar el efecto de las diferentes mutaciones encontradas en la eficiencia traduccional viral mediante ensayos *in vitro* utilizando vectores bicistrónicos.

Objetivo Específico 4b: Analizar la diversidad de las cuasiespecies de aquellas muestras cuyos IRES demuestren ser más ineficientes a nivel traduccional.

6.4. Materiales y Métodos

6.4.1. Muestras

Se analizó la región IRES a partir de todas las muestras incluidas en esta tesis (sección 3.4.1) para las cuales se pudo amplificar la región de interés de forma completa (ASESP: n = 22 y HC: n = 40) (el protocolo de amplificación se detalla en la sección 3.4.3). Los cebadores empleados (Barría et al. 2009) incorporan sitios de corte para las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI* de modo que los amplicones pudieran clonarse en un vector de expresión bicistrónico.

6.4.2. Análisis de mutaciones en secuencias consenso

Con el fin de identificar mutaciones en esta región, las secuencias consensos obtenidas por secuenciación Sanger se analizaron por comparación con secuencias de referencia del GT1a (cepa H77, N° de acceso: AF009606), GT1b (cepa Con1, N° de acceso: AJ238799) y GT3a (cepa NZL1, N° de acceso: D17763), según correspondiera con el genotipo de la muestra determinado por secuenciación de NS5B.

6.4.3. Obtención de secuencia consenso y variantes por clonado

Para poder analizar la eficiencia traduccional de las secuencias de los IRES identificados en muestras de pacientes uruguayos, fue imprescindible poder obtener de forma aislada la variante correspondiente a la secuencia consenso, en caso de existir. Para ello se seleccionaron las muestras que presentaron algún cambio de interés respecto a las secuencias de referencia. Esto determinó que se analizaran 19 combinaciones de mutaciones diferentes. Para ello, los productos de PCR del IRES fueron clonados mediante el protocolo que se detalla a continuación.

Adenilación:

Los productos de PCR amplificados y purificados (secciones 3.4.3 y 3.4.7) fueron adenilados para posteriormente ser ligados al vector pGem-T-Easy (Promega, Madison, USA). Este paso fue necesario debido que la polimerasa de alta

fidelidad utilizada en la amplificación produce extremos romos, por lo que se necesitaba añadir una adenina a ambos extremos para poder realizar la clonación de estos productos en el vector T. La cantidad de producto de PCR purificado a adenilar fue calculado teniendo en cuenta la longitud del vector, el tamaño del producto de PCR a insertar, la cantidad de vector (para ligar un *ratio* de 3:1 entre inserto y vector) así como el volumen de adenilación a emplear en la ligación (3µl):

$$\frac{(50\text{ng pGem-T-Easy}) \times (391\text{pb inserto})}{(3015\text{pb pGem-T-Easy})} \times 3 = 19,4\text{ng inserto a ligar en } 3\mu\text{l}$$

La mezcla de adenilación utilizada fue la siguiente: 1µl de buffer (10X), 0,5µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dATP (10mM), 1µl de Taq polimerasa recombinante (5U/µl, Fermentas, Vilnius, Lituana), y agua DEPC y producto de PCR purificado (equivalente a 19,4 x 3,33 = 64,6ng) hasta completar un volumen final de 10µl. La mezcla fue incubada durante 30min a 72°C.

Ligación en el vector pGem-T-Easy:

El producto de PCR adenilado fue posteriormente ligado en el vector pGem-T-Easy (Promega, Madison, USA) según instrucciones del proveedor, el que permite la selección de colonias por α-complementación.

Transformación y plaqueo:

Posterior a la ligación, se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* XL1-Blue o DH5α por el método de shock térmico. A cada vial de células, se les agregó 10µl de ligación y se incubaron en hielo por 20min. Finalmente se les realizó un *shock* térmico durante 1min a 42°C. El total del volumen de cada vial fue plaqueado en placas de LB agar/AMP (100µg/mL, Sigma Aldrich, China), IPTG (1M, Biotline, Londres, UK) y X-Gal (2%, Thermo Scientific, Italia). Finalmente, las placas fueron incubadas a 37°C durante 16-18 horas (h).

Finalizado el tiempo de incubación, se seleccionaron 10-15 colonias blancas por muestra y fueron crecidas en 2mL de LB/AMP (100µg/mL) por 18h a 37°C y con una agitación de 220 revoluciones por min (rpm). Una vez crecidas, las muestras

fueron centrifugadas durante 3min a velocidad máxima. Posteriormente los pellets bacterianos fueron empleados para la extracción plasmídica.

Extracción plasmídica por MiniPrep y PCR para verificar inserto:

Las minipreps fueron realizadas con el kit PureLink Quick Plasmid MiniPrep (Invitrogen, Vilnius, Lituania) según instrucciones del proveedor. La presencia del inserto se verificó por PCR con cebadores universales (M13F y M13R) que hibridan en los extremos del sitio de clonado múltiple. Éstos permitieron diferenciar una muestra con inserto (622pb) de una que no lo poseía (231pb). Esta PCR se realizó en un volumen final de 25µl que contenía: 2,5µl de buffer (10X), 0,5µl de dNTPs (10µM), 1µl de cada cebador M13 (10µM cada uno), 1,5µl de MgCl₂ (50mM), 0,25µl de Taq polimerasa recombinante (5U/µl, Fermentas, Vilnius, Lituana), 1µl de ADN plasmídico y agua DEPC hasta completar el volumen. El ciclado de PCR consistió de 10min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30seg, 55°C por 30seg, 72°C por 45seg; y 10min finales a 72°C.

Las muestras positivas fueron enviadas para su secuenciación (con los cebadores M13F y M13R) al servicio de secuenciación de Macrogen Korea. Las secuencias que correspondieran con los IRES consensos fueron seleccionadas para continuar. Asimismo, en los casos donde se detectaron variantes de baja frecuencia (presentes sólo en un clon de ~10) que difirieran en alguna posición respecto a la secuencia consenso, también fueron seleccionadas.

6.4.4. Construcción de vectores bicistrónicos con IRES de interés

La mejor manera de caracterizar y analizar la funcionalidad de un IRES determinado, es el uso de vectores bicistrónicos (Feller & Lau, 1999; Mehrtens & Reboll, 2014; Q. S. Wang et al., 2013), los cuales se basan en la expresión de un ARN bicistrónico que comprende dos genes reporteros independientes, donde el IRES de interés se coloca en la región intercistrónica y dirige la expresión del segundo cistrón, mientras que el primero es de traducción Cap-dependiente. Para estos ensayos se contó con el vector DL-HCV-1b cedido amablemente por el Dr. Marcelo López-Lastra (Pontificia Universidad Católica de Chile). El primer cistrón de este vector codifica para la luciferasa de *Renilla*

(RLuc) y el segundo para la luciferasa de *Firefly* (FLuc) (Figura 22). Entre ambos cistrones se encuentra el IRES de VHC de subtipo 1b (cepa Con1) el cual puede ser escindido utilizando las enzimas *XhoI* y *EcoRI* (Barría et al. 2009).

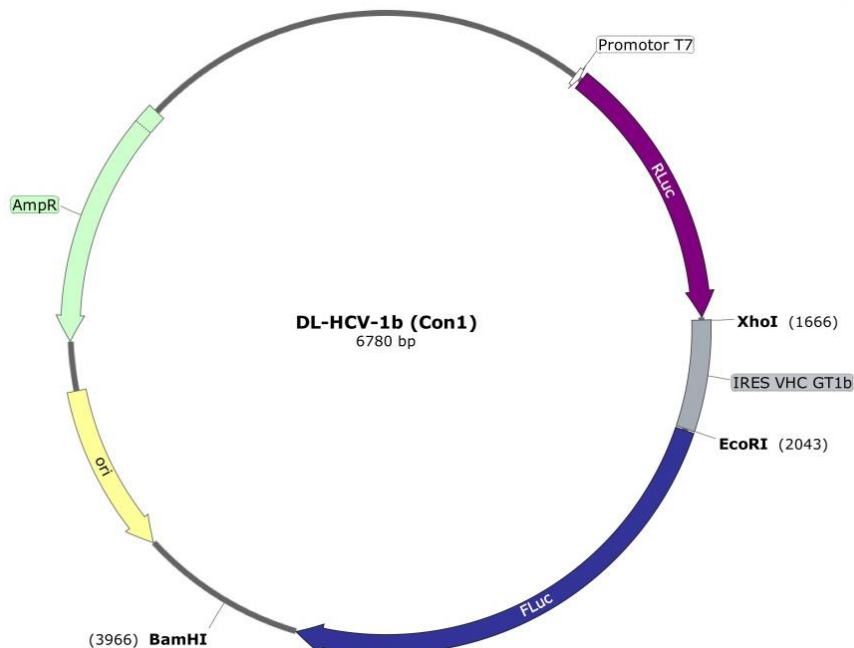


Figura 22. Representación esquemática del vector bicistrónico DL-HCV-1b empleado para los ensayos de eficiencia traduccional de los IRES de interés. En violeta y azul se indican los cistrones de los genes reporteros (RLuc y FLuc, respectivamente). Entre ellos se localiza el IRES a evaluar (en gris), flanqueado por los sitios de restricción de *XhoI* y *EcoRI*. En el esquema se indican además el gen de resistencia a AMP (AmpR en verde claro), el origen de replicación plasmídico (ori, en amarillo), el promotor T7 (en blanco) y el sitio de restricción único *BamHI*. Creado con SnapGeneViewer v4.2.6 (GSL Biotech; disponible en snappgene.com).

Generación del *backbone* dual-luc:

Para poder clonar los IRES de interés, fue necesario obtener el esqueleto del vector dual-luc (*backbone*) mencionado mediante escisión del IRES control 1b.

A tal fin se digirieron 5µg de vector DL-HCV-1b con 50U de *XhoI* y 50U de *EcoRI* (Invitrogen, Life Technologies, Vilnius, Lituania), 2X de Buffer H y agua DEPC hasta completar el volumen final (60µl). Esta mezcla se incubó por 2h a 37°C. Luego de inactivar las enzimas (20min a 65°C), se sembró el volumen total en un

gel con SYBR Safe como intercalante, donde se pudo verificar la digestión completa. La banda de alto peso molecular (6410pb) fue escindida y purificada a partir del gel empleando el *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK), según instrucciones del fabricante. El ADN purificado fue medido en un nanodrop y constituyó el *backbone* para construir los vectores dual-luc con los IRES de interés.

Escisión de IRES de interés a partir del vector pGem-T-Easy:

Los IRES de secuencia igual a la consenso y aquellos de interés encontrados en baja frecuencia fueron escindidos de los vectores pGem mediante doble digestión, similar a la realizada para obtener el *backbone*, con la salvedad de que en estos casos se purificó la banda del inserto (370pb).

Ligación de IRES de interés en *backbone* dual-luc y transformación:

A partir de 100ng de *backbone* (6410pb) se calculó la cantidad de IRES a ligar según fórmula empleada previamente (página 109). El protocolo de ligación y transformación fue similar al de la sección 6.4.3. El volumen total de las células transformadas fue sembrado en placas de LB/AMP (100µg/mL, Sigma Aldrich, China) las cuales fueron incubadas por 16-18h a 37°C. Luego se seleccionaron 5 colonias por muestra para amplificarlas y realizar la extracción plasmídica con el PureLink Quick Plasmid MiniPrep Kit (Invitrogen, Vilnius, Lituania). Una vez más se verificó por PCR la presencia de inserto. En este caso se emplearon los cebadores RLucNic1 (Cáceres et al. 2018) y ToeFLuc120 (Carvajal et al. 2016), que hibridan en cada una de las luciferasas. Las condiciones de PCR y el ciclado fueron similares a la verificación de inserto a partir de pGem, pero con una temperatura de hibridación menor (53°C). El tamaño esperado fue de 584pb. Los vectores positivos se enviaron a secuenciar con los mismos cebadores para verificar la identidad de secuencia antes de proseguir.

Vectores controles:

Dado que los genotipos a estudiar corresponden al 1a, 1b y 3a, lo más apropiado era tener vectores controles de cada uno de dichos genotipos. Visto

que se contaba solamente con el control 1b, se debieron generar los correspondientes a 1a y 3a.

Para el GT1a, se procedió como con los IRES de interés ya que un clon de la muestra 1018 (IRES 12) mostró una secuencia sin cambios respecto a la cepa de referencia H77 (DL-HCV-1a). El IRES control del GT3a se generó por mutagénesis sitio dirigida a partir de la secuencia consenso de la muestra 991 (que contenía una sola mutación, IRES 16) empleando los siguientes cebadores:

- RU-O-24047 fw 5' CCCCGCGAGATCACTAGCCGAG 3'
- RU-O-24048 rv 5' TCGGCTAGTGATCTCGCGGGGG 3'

Para ello, la mezcla de reacción de PCR, realizada en un volumen final de 40µl, incluyó 8µl de buffer (5X) con MgCl₂, 1µl de dNTPs (10µM), 3,2µl de cada cebador (10µM), 0,5µl de enzima Phusion High Fidelity (2U/µl, Thermo Scientific, USA), 500-1000ng de vector DL a mutar y agua DEPC hasta completar el volumen. El ciclado de PCR fue: 98°C por 5min; 35 ciclos de 98°C por 30seg, 60°C por 30seg y 72°C por 4.5min, y 10min finales a 72°C.

A continuación, se degradó el ADN molde, que por haber sido amplificado en bacterias, se encontraba metilado. Por tanto se empleó la enzima de restricción *DpnI*, que sólo reconoce sitios metilados. La mezcla de digestión incluyó 20U de *DpnI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 1X del Cutsmart Buffer, el total del producto de PCR y agua DEPC hasta completar un volumen final de 50µl. Se incubó 1h a 37°C y luego se inactivó la enzima a 80°C por 20min. Se corrieron geles pre y post digestión para corroborar la amplificación y la digestión. Finalmente, 10µl de la digestión fueron utilizados para transformar y plaquear bacterias *E. coli* quimiocompetentes siguiendo protocolo ya descrito. Se seleccionaron 3 colonias para amplificar los vectores. Se realizó la extracción de éstos por miniprep y se enviaron a secuenciar para corroborar la exitosa generación del control DL-HCV-3a (con la secuencia de la cepa NZL1).

Los tres controles (DL-HCV-1a, 1b y 3a) contienen la región correspondiente a los nt 36-377 de cada IRES, de igual secuencia a las secuencias de referencia. Además de estas construcciones, empleadas como controles positivos de expresión, se utilizó un vector bicistrónico con un IRES deficiente (DL-ΔEMCV)

como control negativo. Este fue también amablemente cedido por el Dr. Marcelo López-Lastra (Pontificia Universidad Católica de Chile) (Barría et al. 2009).

6.4.5. Transcripción *in vitro* (IVT) de ARNs bicistrónicos

Con el fin de realizar las transcripciones *in vitro* (IVT, del inglés: *In Vitro Transcription*) de los ARNs bicistrónicos, los plásmidos fueron linearizados con la enzima *BamHI*, cuyo sitio de corte se localiza río abajo del cistrón FLuc.

Linearización de vectores Dual-Luc:

La mezcla de digestión contenía 30U de *BamHI* (Invitrogen, Life Technologies, Vilnius, Lituania), 1X de Buffer K, 3µg de vector y agua DEPC hasta completar un volumen final de 30µl. Se incubó 2h a 30°C y luego 20min a 65°C para inactivar la enzima. Luego de verificar la linearización en un gel de agarosa, se precipitaron los ADN lineales empleando 1/10 volumen de acetato de sodio (3M, pH5,2) y 2,5 volúmenes de etanol frío. Se precipitó por 1h a -20°C, y luego de centrifugar (20000g por 30min a 4°C), se lavó el pellet con etanol 70%. Posteriormente se recentrifugó (5min), se dejó secar el pellet y se resuspendió en agua DEPC. La concentración de ADN se midió espectrofotométricamente.

IVT:

Se realizaron con el HiScribe T7 ARCA mRNA kit with tailing (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) según protocolo del fabricante. La purificación de los ARNm bicistrónicos (con CAP y poliA) generados se realizó mediante el empleo de cloruro de litio (LiCl), y según el protocolo del fabricante del kit. Las concentraciones de ARN se determinaron espectrofotométricamente y la integridad se monitoreó por electroforesis en geles de agarosa no desnaturizantes teñidos con *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Madison, USA). Previo a cargar los geles, 1µg de ARN se mezcló con 1X de *ARN loading dye* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), fueron pre-calentadas por 10min a 70°C, y enfriadas en hielo, para desnaturizar estructuras secundarias.

6.4.6. Traducción *in vitro* en lisado de reticulocitos de conejo (RRL)

Las traducciones *in vitro* se realizaron en RRL tratado con nucleasa micrococcal para eliminar ARNm endógenos (Promega, Madison, USA). Aunque estos lisados contienen todos los componentes necesarios para la síntesis proteica, fueron optimizados con el agregado de acetato de potasio (1M, pH7,5) y de magnesio (5mM), según protocolo ya descrito (Svitkin et al. 2005). Se realizaron en un volumen final de 25µl y a partir de 25ng de ARNm purificado. En todos los casos se realizaron al menos 3 experimentos independientes con 2 réplicas técnicas cada uno. Las mezclas de reacción se incubaron a 30°C por 90min y luego fueron almacenadas a -80°C hasta la medición de bioluminiscencia.

6.4.7. Análisis de la eficiencia traduccional de clones y consensos

Con el fin de analizar las eficiencias traduccionales, se midió la actividad de las luciferasas con el Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, USA) y mediante el empleo de un luminómetro de placas LUMIstar OPTIMA (BMG Labtech). El protocolo de medición fue el siguiente: a 5µl de traducción se agregaron 25µl de reactivo LARII y luego de mezclar por pipeteo 3 veces, se midió luminiscencia por 2seg. Se retiró la placa, se agregaron 25µl de reactivo Stop&Glo, se mezcló por pipeteo 3 veces y se midió luminiscencia nuevamente por 2seg. La relación FLuc/RLuc fue usada como índice de actividad del IRES (eficiencia traduccional), y en cada experimento, el promedio de este índice fue considerado 100% para cada uno de los controles (DL-HCV-1a, 1b ó 3a).

6.4.8. Generación de mutantes únicos

Visto que algunos IRES de GT1a y GT3a con múltiples mutaciones evidenciaron una eficiencia traduccional disminuida, fueron seleccionadas para estudios más profundos con el objetivo de discernir el efecto de cada una de las mutaciones individuales. Por tanto, se generaron mutantes únicos mediante mutagénesis sitio dirigida siguiendo similar protocolo al descrito para la generación del vector control DL-HCV-3a. Los cebadores empleados fueron diseñados en el marco de esta tesis y se detallan en la Tabla Suplementaria 18.

6.4.9. Estudio de la estructura secundaria de los IRES evaluados

Con el fin de determinar si las diferentes combinaciones de mutaciones podrían afectar la estructura secundaria de los dominios II y III del IRES, se realizaron predicciones *in silico* utilizando el RNAfold WebServer (disponible en <http://rna.tbi.univie.ac.at/>) (Gruber et al. 2008).

6.4.10. Análisis estadísticos

Las diferencias en eficiencias traduccionales entre los IRES analizados y los controles se evaluaron mediante tests de ANOVA de una vía seguidos por tests de comparación múltiple (test de Bonferroni). Un valor p menor a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Estos análisis se realizaron con el software GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

6.4.11. Análisis de la diversidad de las cuasiespecies por NGS

Con el objetivo de analizar en mayor profundidad la diversidad de las cuasiespecies de aquellos IRES que presentaron secuencias consensos y/o clones de baja eficiencia, 6 muestras fueron sometidas a secuenciación masiva (GT1a: 624, 996, 1019 y 1021; GT3a: 05 y 1016). Estas muestras se corresponden con los IRES 5, 8, 10 y 11 (GT1a) y los IRES 18 y 19 (GT3a), respectivamente. La preparación de librerías, la secuenciación en sí misma y el análisis de datos se realizó conjuntamente con las muestras de NS3 y siguiendo el mismo protocolo (ver secciones 5.4.6, 5.4.7 y 5.4.8). Como secuencias de referencia para el ensamblado se utilizaron las correspondientes secuencias consensos obtenidas previamente por secuenciación Sanger. Luego del SNP *calling* se analizaron todas las posiciones que presentaron variantes de baja frecuencia (<15%).

6.5. Resultados y Discusión

Con el objetivo de analizar las diferentes variantes naturales del IRES y evaluar su eficiencia traduccional, se amplificó la región a partir de muestras de pacientes crónicamente infectados con VHC, se clonó en vectores bicistrónicos y se determinó la relación de actividad bioluminiscente como índice de actividad traduccional. La variabilidad a nivel de las cuasiespecies fue abordada mediante secuenciación masiva.

6.5.1. Variabilidad de los IRES a nivel de secuencias consensos

El análisis de los IRES provenientes de las muestras uruguayas, mostró, a nivel de las secuencias consensos, la presencia de diferentes mutaciones distribuidas a lo largo de la secuencia (Tabla 9). Solamente 16 de las 62 muestras amplificadas y secuenciadas mostraron secuencias idénticas a las secuencias de referencia, 2 de GT1a y 14 de GT1b. La muestra que resultó más variable fue una de GT3 que mostró 1 cambio y 17 sitios polimórficos en el IRES (muestra 09). Esta gran cantidad de cambios probablemente fue la causa de que los análisis filogenéticos a partir de esta región mostraran a esta muestra más ancestral dentro del clado del GT3 (Figura 9).

La mayoría de las mutaciones observadas se localizan en los dominios II y III del IRES (Tabla 9 y Figura 23), involucrados principalmente en la hidrólisis de GTP mediada por el factor eIF5, la unión a la subunidad ribosomal menor (40S) y la unión al factor eIF3, respectivamente (Sizova et al. 1998; Locker et al. 2007). De acuerdo con la importancia funcional del subdominio III_d (que une al ARN ribosomal 18S) (Jubin et al. 2000; Angulo et al. 2016), no se encontró ningún cambio en el triplete de Gs simple hebra.

Casi la mitad de las posiciones mutadas se ubican en sitios doble hebra (nt 78, 97, 107, 207, 247 y 248), aunque parecen reinstaurar uniones Watson-Crick. El resto se localizan en regiones simple hebra, donde es esperable que impacten en menor medida en la estructura secundaria (nt 119, 203, 204, 205, 214, 243, 340 y 358). Sin embargo, no puede descartarse que esas posiciones no sean importantes para las interacciones con eIF3, el ribosoma o diferentes ITAFs.

Tabla 9. Mutaciones encontradas en las secuencias consensos de los IRES de los aislamientos de VHC uruguayos.

Genotipo	N° IRES (ensayos de traducción)	Mutaciones ^a	Localización en estructura secundaria ^b	Muestras (n)
1a	DL-HCV-1a	Sin cambios	-	2
	1	G107A	D.II	1
	2	A204C	subD.IIIb	9
	3	A204U	subD.IIIb	2
	4	Ins205U	subD.IIIb	1
	5	A243G	D.III	1
	6	G107A+A204C	D.II y subD.IIIb	4
	7	G107A+Ins207A	D.II y subD.IIIb	1
	8	A204U+C340U	subD.IIIb y D.IV	1
	9	A204C+A243G	subD.IIIb y D.III	3
	10	G107A+A204C+A243G	D.II, subD.IIIb y D.III	3
	11	A119C+A204C+U248C	D.II, subD.IIIb y D.III	1
	12	A204C+U248C+A358U	subD.IIIb, D.III y core	1
	NA	Ins207A	subD.IIIb	1
NA	A204C+G331G/A	subD.IIIb y D.IV	2	
NA	G107A+Ins204C+A243G	D.II, subD.IIIb y D.III	1	
1b	DL-HCV-1b	Sin cambios	-	14
	13	C204U	subD.IIIb	2
	14	Ins207A	subD.IIIb	1
	15	Ins207A+A214U	subD.IIIb	1
	NA	U78C	D.II	1
	NA	C204C/U+G243G/A	subD.IIIb y D.III	1
	NA	G243A+U248U/C+G331G/C+C340C/A	D.III y D.IV	1
	NA	G331G/C	D.IV	1
3a	DL-HCV-3a	Sin cambios	-	0
	16	U247C	D.III	1
	17	A119C+G203A	D.II y subD.IIIb	1
	18	A119C+G203A+G243A	D.II, subD.IIIb y D.III	2
	19	A119C+G203A+Ins207A+G243A	D.II, subD.IIIb y D.III	1
	NA	C97U y 17 sitios polimórficos	Todos los dominios	1

^a Referente a las cepas de referencia H77 (1a), Con1 (1b) y NZL1 (3a).

^b **D**: Dominio; **subD**: subdominio

NA: Efecto traduccional no analizado

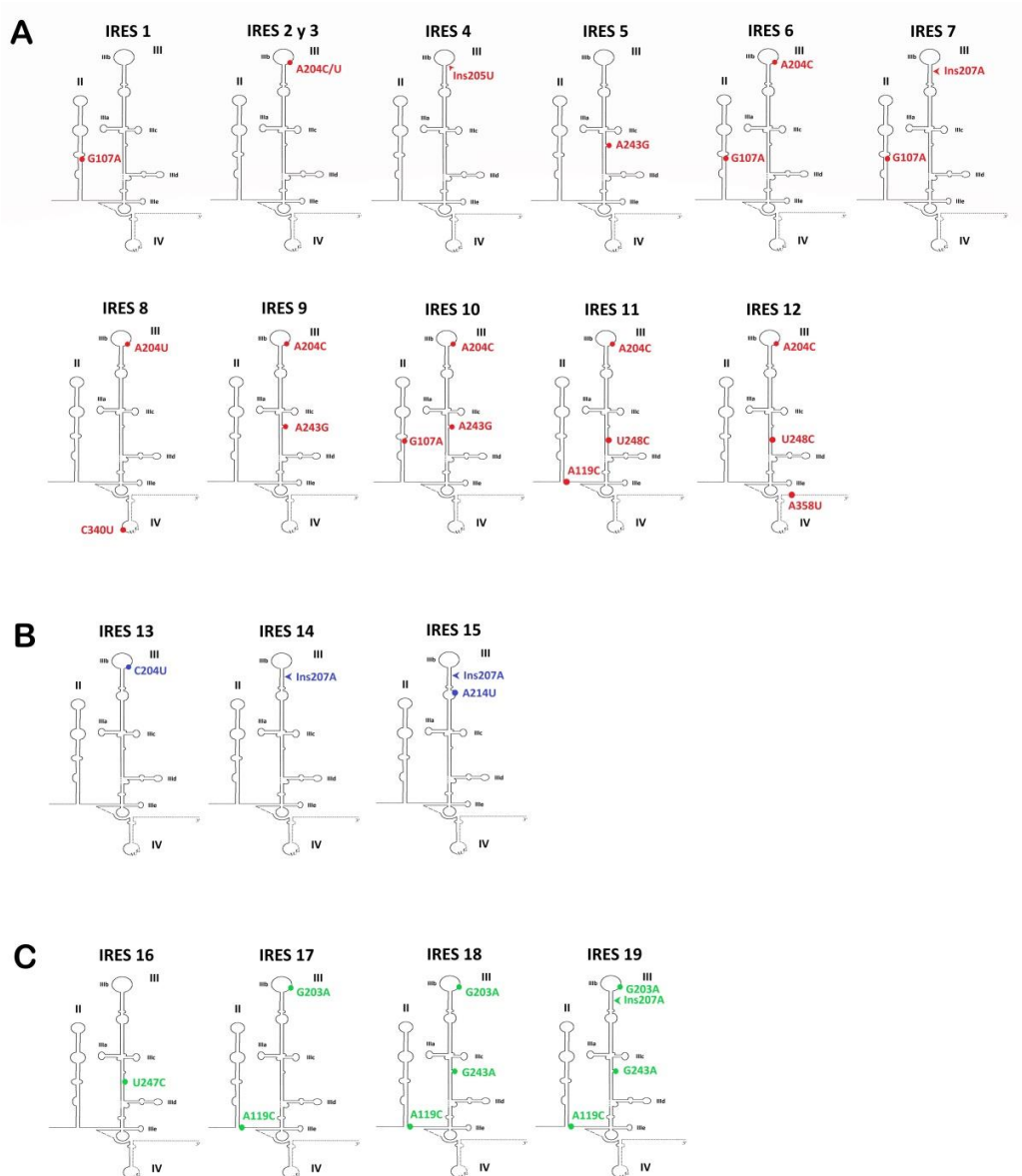


Figura 23. Localización de las mutaciones encontradas en los IRES consensos cuyas eficiencias traduccionales fueron evaluadas. Se esquematiza la estructura secundaria del IRES (dominios II al IV de la región 5'NCR) según propuesta de Honda et al. (1999) y se señalan las 19 combinaciones de mutaciones diferentes evaluadas a nivel traduccional. Con puntos de color se indican los cambios nucleotídicos, mientras que con flechas se indican las inserciones. **A)** IRES de GT1a, mutaciones en rojo. **B)** IRES de GT1b, mutaciones en azul. **C)** IRES de GT3a, mutaciones en verde.

Los cambios más frecuentes se detectaron en las posiciones 204, 243 y 107 (en 26, 13 y 10 muestras, respectivamente). Con excepción de la mutación A204U, las mutaciones identificadas en estos sitios han sido frecuentemente reportadas

en aislamientos de diferentes países (Bukh et al. 1992; Yamamoto et al. 1997; Soler et al. 2002; Laporte et al. 2003; Forton et al. 2004; Thelu et al. 2004; Moratorio et al. 2007; Motazakker et al. 2007; Vera-Otarola et al. 2009; Barría et al. 2009), y si bien se ha intentado asociarlas a diferentes respuestas a terapia o con linajes genéticos determinados, los resultados son contradictorios por lo cual es más probable que sean posiciones con pocas restricciones estructurales y/o funcionales y que esa sea la razón por la cual son sitios polimórficos a nivel de las diferentes poblaciones de VHC.

Algunas mutaciones halladas en aislamientos de GT1a no han sido descritas en la literatura (A204U, Ins204C, Ins205U y A358U), según la información de la “Hepatitis C Virus IRES Variation Database” (Floden et al. 2016). El cambio en la posición 358 es el único encontrado en la región codificante del IRES, y constituye un cambio no sinónimo de una lisina a una isoleucina en el AA 6.

6.5.2. Obtención de IRES consensos e IRES de baja frecuencia por clonado

La gran mayoría de los clones, obtenidos a partir de la ligación de los IRES de interés en el vector pGEM, evidenciaron contener secuencias idénticas a las consensos determinadas por Secuenciación Sanger. Sin embargo, en algunas muestras se detectaron algunos clones (1 o 2 por muestra) que presentaban secuencias con cambios respecto a sus consensos lo cuales también fueron seleccionados para ser analizados (Tabla 10).

Tabla 10. Clones del IRES hallados en baja frecuencia a los que se les evaluó su eficiencia traduccional.

Genotipo	N° IRES	Secuencia Consenso	N° Clon	Secuencia Clones
1a	5	A243G	A	A243G+del367G
	8	A204U+C340U	B	A73G+A204U+C340U
			C	A85G+A204U+C340U
	10	G107A+A204C+A243G	D	G107A+A204C+A243G+U248C
3a	19	A119C+G203A+Ins207A+G243A	E	U61C+A119C+G203A+Ins207A+G243A
	18	A119C+G203A+G243A	F	A119C*

En rojo se indican los cambios diferentes a las secuencias consenso.

* El clon no presentaba las mutaciones G203A y G243A que se encontraban en la secuencia consenso.

Como se puede observar en la Tabla 10, con excepción de un clon de GT3a, que exhibió una sola mutación de las 3 presentes en la secuencia consenso, los restantes contenían una mutación adicional. De ellas, solo una había sido identificada en otras secuencias consenso (U248C). De las otras 4 mutaciones adicionales identificadas, una corresponde con una delección de una guanina en la región codificante (del367G), la cual cambia el marco de lectura de esa variante viral generando un codón *stop* prematuro en el core. Las restantes 3 se localizan en el dominio II del IRES, donde dos de ellas (A73G y A85G) se encuentran en bucles (simple hebra), mientras que la tercera (U61C) reinstaura una unión Watson-Crick.

6.5.3. Eficiencia traduccional de los IRES consensos

Los resultados de la eficiencia traduccional de los IRES consenso pueden observarse en la Figura 24. Como se desprende de la figura, la eficiencia traduccional de las secuencias consenso demostraron ser, en la mayoría de los casos, comparables a las secuencias de referencia para los subtipos 1a y 1b. Solamente dos de los IRES de subtipo 1a resultaron ser menos eficientes que el control H77 (disminución entre 19,7-31,5%): el IRES 5 (mutación A243G), y el IRES 11 (mutaciones A119C+A204C+U248C).

La mutación A243G ha sido previamente analizada en cultivo celular donde se observó que no afectaba la eficiencia traduccional en relación al control de referencia (Motazakker et al. 2007), por tanto la disminución de eficiencia *in vitro* podría no reflejar lo que estaría sucediendo en el contexto de la infección. Sobre la combinación de mutaciones presentes en el IRES 11, no existen ensayos de eficiencia traduccional hasta el momento. Por otra parte, la mutación A204U, que no había sido previamente reportada, parece ser beneficiosa para el virus ya que permite una mayor producción proteica, a pesar de que el aumento es modesto (IRES 3).

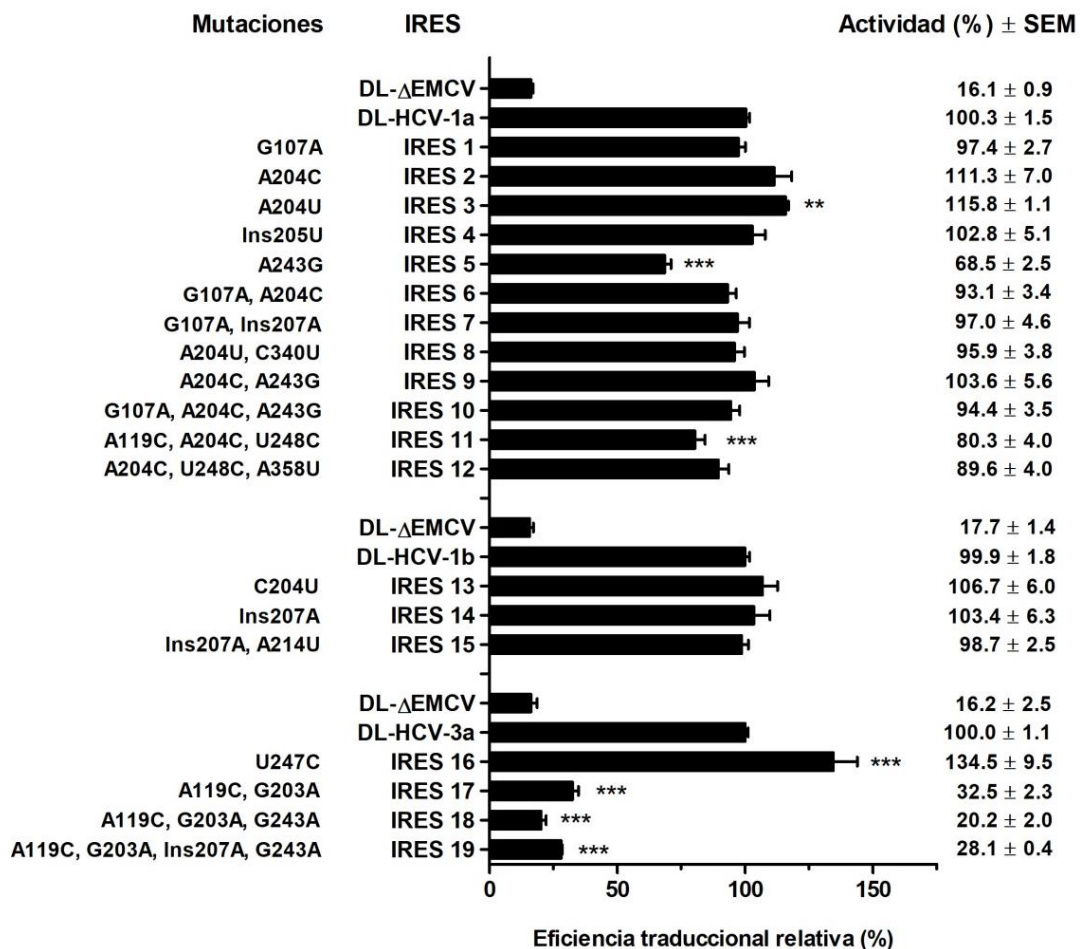


Figura 24. Eficiencia traduccional de variantes naturales del IRES presentes en secuencias consenso de aislamientos clínicos uruguayos. Los IRES corresponden a las secuencias consenso que fueron aisladas en el vector de pGem-T-easy y posteriormente subclonadas en el vector dual-luc. En la parte superior se muestran los IRES de GT1a, en el medio los de GT1b y en la parte inferior aquellos de GT3a. Variaciones naturales en las secuencias nucleotídicas fueron identificadas por secuenciación y alineamiento con secuencias de referencia de VHC GT1a (cepa H77, AF009606) GT1b (cepa Con1, AJ238799) y GT3a (cepa NZL1, D17763). La actividad traduccional de cada IRES fue evaluada *in vitro* en RRL comparando con su respectivo control positivo (DL-HCV-1a, DL-HCV-1b y DL-HCV-3a) y se empleó el vector DL-ΔEMCV como control negativo (ineficiente). Las actividades de RLuc y FLuc fueron medidas y la relación FLuc/RLuc se empleó como índice de actividad. La relación correspondiente a cada uno de los controles se designó arbitrariamente como 100%. Se grafican los promedios y los errores estándar (SEM) de al menos 3 experimentos independientes. Diferencias significativas en eficiencias se calcularon el test *one-way* ANOVA, con corrección de Bonferroni: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Deficiencias más importantes en la eficiencia fueron halladas en 3 IRES consenso de GT 3a (reducción entre 67,5-79,8% en la eficiencia), las cuales son comparables al control ineficiente (DL- Δ EMCV). Las 3 combinaciones presentan 2 mutaciones en común: A119C y G203A, por lo cual, o bien una de ellas o la combinación podrían ser directamente responsables del fenotipo observado.

Contrario a lo reportado por Barría et al. (2009), quienes hallaron que la combinación A119C+G203A+G243A exhibía 88,4% de eficiencia, en esta tesis dicha combinación (IRES 18), exhibió la menor eficiencia traduccional (20,2%) (Figura 24). Sorprenden estas diferencias ya que tanto en el estudio mencionado como en esta tesis, se empleó el mismo sistema *in vitro*, y los mismos cebadores para generar las construcciones. La integridad de los ARNs y la correcta adición de la cola poliA fue verificada en geles de agarosa nativos (Figura 25) a fin de descartar que este efecto observado se debiera a la degradación de los ARNs (lo que podría generar que solo se expresara el primer cistron, llevando a valores muy pequeños de FLuc/RLuc) o a ARNs sin colas poliA [necesarias para una buena iniciación de traducción de ARNm celulares (Jacobson 1996)].

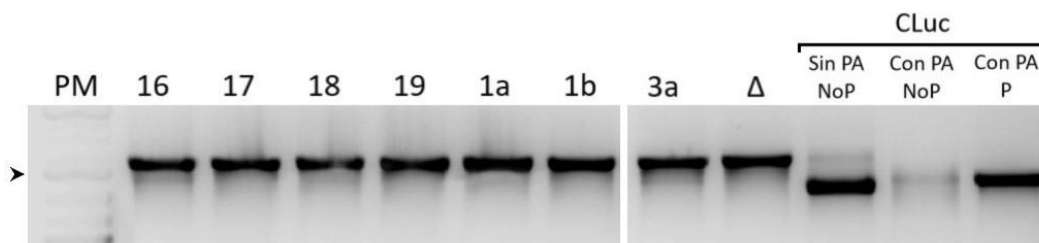


Figura 25. Gel nativo de agarosa al 1% para visualizar la integridad de los ARNs bicistrónicos. Gel con SYBR Safe incorporado como intercalante. Carriles 1-4: IRES consenso de GT3a (IRES 16 a 19). 1a, 1b, 3a y Δ corresponden a los vectores DL-HCV controles. CLuc es el control positivo del kit de transcripción utilizado. PM: Peso molecular de ADN doble hebra, 1Kb plus (Fermentas). La cabeza de flecha indica la banda correspondiente a 1.5Kb. PA: cola poliA. NoP: No purificado. P: Purificado. Ejemplo para los ARNs de GT3a; similares resultados se obtuvieron para los ARNs de otros genotipos.

En conclusión, la única causa que resta ser considerada refiere a la posibilidad de que cambios en los lotes de RRL sean responsables de las diferencias en eficiencia, lo cual lleva a cuestionarse si estos sistemas *in vitro* son los más apropiados para evaluar la actividad IRES con estas construcciones como para poder comparar con otras investigaciones.

Por otro lado, uno de los IRES 3a mostró la mutación U247C, la cual aumenta la eficiencia a 134,5%. Si bien la presencia de esta mutación ya había sido reportada, no se le había analizado su actividad traduccional (Forton et al. 2004).

Contrario a la hipótesis planteada, los IRES menos eficientes no provienen de aquellas muestras con menor carga viral ya que las muestras a las que corresponden presentan CVs que abarcan un amplio rango comprendido entre $1,2 \times 10^5$ y $1,2 \times 10^8$ UI/mL (equivalente a 5,08 y 8,09 logs, respectivamente) (Tabla 11). No fue posible asociar la eficiencia traduccional a la respuesta a la terapia ya que para la mayoría de las muestras de eficiencia disminuida no se contaba con dato de tratamiento (Tabla 11).

Tabla 11. Cargas virales y respuesta al tratamiento de muestras cuyas secuencias consensos (secuenciación Sanger) evidenciaron baja eficiencia traduccional

Genotipo	Muestra	N° IRES	Eficiencia traduccional (% \pm SEM) ^a	CV (log10) ^b	Tratamiento ^c	Respuesta
1a	996	5	68,5 \pm 2,5	5,62	ND	ND
	1021	11	80,3 \pm 4,0	5,79	ND	ND
	1017	17	32,5 \pm 2,3	6,17	Naïve	NC
3a	982	18	20,2 \pm 2,0	5,08	PR	NC ^d
	05		8,09	Naïve	NC	
	1016	19	28,1 \pm 0,4	6,09	ND	ND

^a SEM: Error estándar

^b Logaritmo en base 10 de la carga viral (CV) determinada en unidades internacionales por mililitro (UI/mL).

^c **ND**: no determinado o desconocido, **PR**: IFN- α -peg/ribavirina

^d El tratamiento debió suspenderse por intolerancia

NC: No corresponde

6.5.4. Eficiencia traduccional de IRES de baja frecuencia y análisis de mutaciones únicas

Con el fin de estudiar la eficiencia traduccional de IRES que se encontraran en bajas frecuencias en la población viral, una vez seleccionados los IRES de interés, éstos fueron clonados en los vectores bicistrónicos y posteriormente se procedió a los estudios traduccionales para determinar su eficiencia. Por otra parte, con el objetivo de evaluar la contribución de cada una de las mutaciones a los fenotipos ineficientes, éstas fueron analizadas por separado (Figura 26).

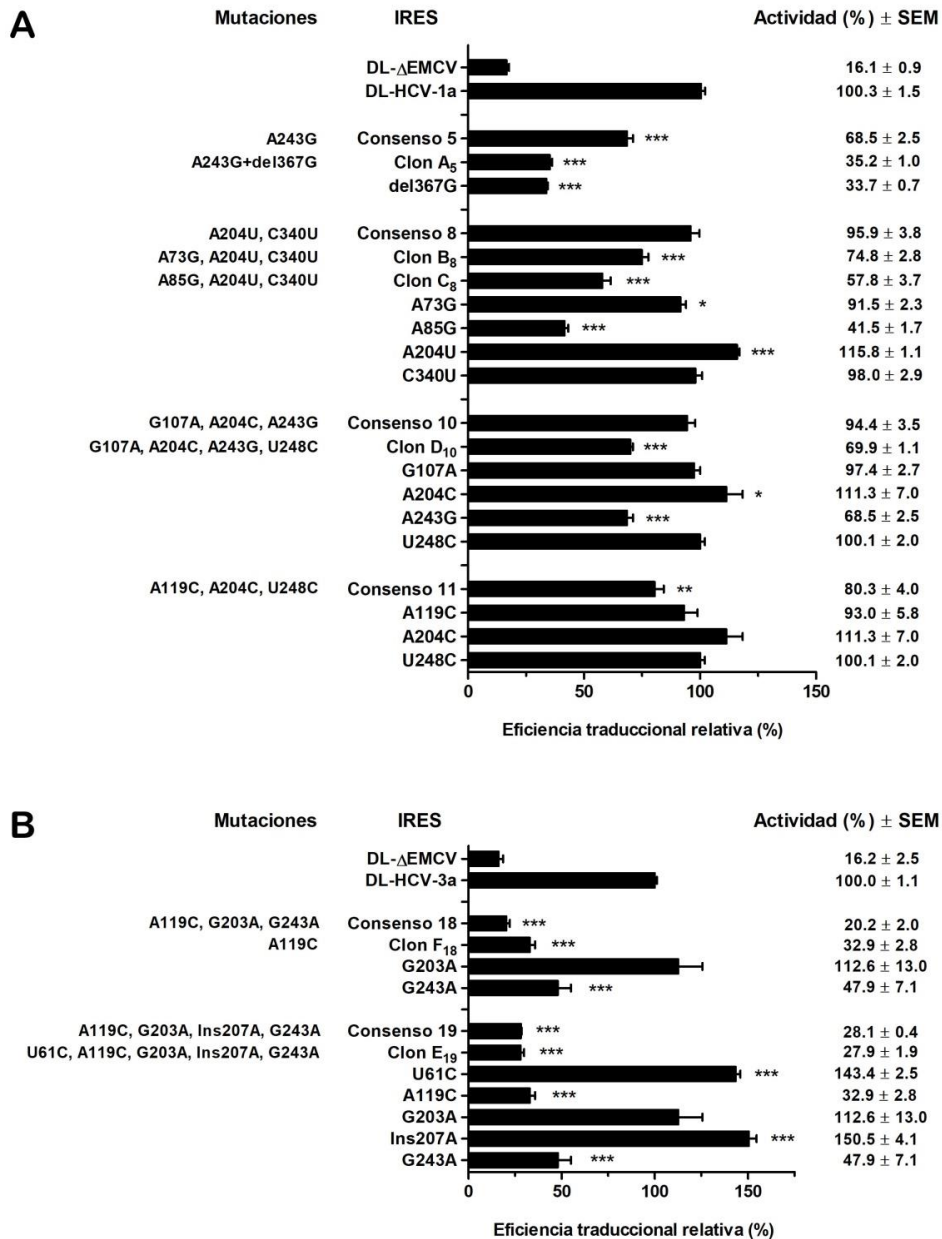


Figura 26. Eficiencia traduccional de variantes naturales del IRES presentes en baja frecuencia así como de mutantes únicos generados por mutagénesis sitio-dirigida. Se muestran los respectivos IRES consensos, además de los IRES de baja frecuencia hallados y cada uno de los mutantes únicos. En la parte superior de cada gráfica se muestran los controles. La actividad traduccional de cada IRES fue evaluada *in vitro* en RRL comparando con su respectivo control positivo (DL-HCV-1a o DL-HCV-3a) y se empleó el vector DL-ΔEMCV como control negativo (ineficiente). Las actividades de RLuc y FLuc fueron medidas y la relación FLuc/RLuc se empleó como índice de actividad. La relación correspondiente a cada uno de los controles se designó arbitrariamente como 100%. Los valores graficados corresponden con los promedios de al menos 3 experimentos independientes y las barras representan errores estándar (SEM). Con asteriscos se indican aquellos IRES con diferencias significativas en su eficiencia (*one-way* ANOVA, con corrección de Bonferroni: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). **A)** IRES de GT1a. **B)** IRES de GT3a.

Con excepción de la delección en la posición 367 y la mutación A243G, los demás cambios en el subtipo 1a no parecen explicar por sí solos el fenotipo traduccional ineficiente de los IRES consensos o sus clones, aunque claramente contribuyen (Figura 26A). El caso de la combinación de mutaciones de la secuencia consenso 11 (A119C+A204C+U248C) representa una situación donde claramente la disminución de eficiencia se debe a la acción en conjunto de estas 3 mutaciones, ya que ninguna de ellas por separado parece afectar la capacidad traduccional. Una situación similar se observó en el caso del IRES consenso 10 (G107A+A204C+A243G). Si bien la mutación A243G parece influir negativamente en la combinación de mutaciones presente en el clon D₁₀ (G107A+A204C+A243G+U248C), no ejerce el mismo efecto sobre la secuencia consenso. Por tanto, en el caso de este clon se observa que la acción en conjunto de la combinación de mutaciones parece influir negativamente en la eficiencia traduccional. Mientras que, en la secuencia consenso, a pesar de incluir un cambio que por sí solo es detrimental (A243G), se encuentra de algún modo compensado por las otras mutaciones (G107A y A204C) (Ver Figura 26).

La delección de la guanina en la posición 367, no sería biológicamente relevante debido al cambio en el marco de lectura y al codón *stop* prematuro, pero podría contribuir a generar péptidos truncos que tengan alguna función en el ciclo viral, aún desconocida. A nivel funcional, la delección se localiza en una región en la que previamente se han descrito mutaciones que impactan en la estructura del IRES río abajo del codón AUG (Piron et al. 2005). Se ha demostrado que cuando estas regiones son muy estructuradas se inhibe la traducción (Rijnbrand et al. 2001), por lo cual es posible que esté sucediendo esto con ese mutante.

El efecto negativo de las mutaciones A73G y A85G sobre la eficiencia ya había sido descrito anteriormente (Kalliampakou et al. 2002; Barría et al. 2009), si bien las magnitudes reportadas eran distintas (inferiores a las evidenciadas en este trabajo). Sin embargo, el contexto genotípico difería para la posición 73 (donde se analizó en el subtipo 1b, y en esta tesis correspondió con el subtipo 1a) (Barría et al. 2009), mientras que la construcción con el cambio A85G (de GT1a), poseía además otro cambio en el bucle apical (Kalliampakou et al. 2002).

Un panorama diferente se observa para las mutaciones del genotipo 3a, donde la combinación de mutaciones A119C y G243A parecen ser responsables de los fenotipos ineficientes (Figura 26B), e incluso, otros cambios que por sí solos tienden a ser beneficiosos (U61C, G203A e Ins207A), no alcanzan a compensar el efecto negativo generado por las primeras. Similarmente a lo observado con las secuencias consenso, también en el análisis de mutaciones únicas los resultados indican que el cambio A119C en el GT3a influye negativamente la eficiencia traduccional, aunque en mayor grado que lo reportado anteriormente (Motazakker et al. 2007; Barría et al. 2009). Una vez más, se analizaron los geles de ARN donde se observaron bandas nítidas y todas de igual tamaño (datos no mostrados), descartando que se trate de problemas con el ARNm empleado como molde para las traducciones *in vitro*.

Estos estudios permitieron revelar que existen variantes traduccionalmente ineficientes tanto a nivel de las secuencias consensos, como también dentro de subpoblaciones de la cuasiespecie representadas en menor frecuencia. En algunos casos, algunas mutaciones puntuales parecen ser responsables de estos fenotipos, sin embargo, también se observó el fenómeno de compensación entre mutaciones, el cual lleva a eficiencias traduccionales comparables a los controles. El caso de la mutación A119C evidenció, además, la importancia del contexto genético donde se encuentre el cambio, ya que parece no afectar en el GT1a, pero resultó detrimental en el GT3a.

6.5.5. Estudio de la estructura secundaria de los IRES ineficientes

A modo de abordar una de las posibles causas por las cuales las mutaciones estudiadas pudieran estar ocasionando los fenotipos observados, se realizaron predicciones *in silico* de los dominios II y III por separado, cada uno incluyendo la mutación o la combinación de mutaciones traduccionalmente ineficiente. También se incluyó la predicción del dominio IV hasta el nt 377 para poder modelar la delección en la posición 367. Los mutantes son estructuralmente similares a sus respectivos controles *wild type* (datos no mostrados). La energía libre es similar en la mayoría de los casos, aunque se observaron diferencias en la probabilidad de apareamiento de bases. Estos hallazgos no son

determinantes ya que, con el afán de recrear la estructura comúnmente aceptada de los dominios del IRES, se hicieron predicciones a partir de éstos, y no del IRES completo, y para los casos de múltiples mutaciones, éstas se localizaban en diferentes dominios. Por otra parte, aún si la estructura secundaria no cambia, mutaciones puntuales en la secuencia primaria pueden igualmente afectar la función de esta región al interferir con la unión de diferentes factores celulares (ITAFs, ribosomas, etc).

6.5.6. Diversidad de las cuasiespecies a nivel del IRES

Las muestras 996, 624, 1019, 1021, 05 y 1016 (IRES 5, 8, 10, 11, 18 y 19, respectivamente), fueron analizadas por secuenciación masiva para determinar la diversidad de sus cuasiespecies, ya que fueron las que a nivel de las secuencias consenso y/o de sus clones de baja frecuencia mostraron eficiencias traduccionales significativamente menores a las secuencias de referencia.

Alineamiento, cobertura y secuencias consensos Sanger y masiva:

Sobre la calidad de las librerías y de los datos de secuenciación se discutió en profundidad en el Capítulo 3 (sección 5.5.5). Los datos ya filtrados por calidad y largo y sin contaminantes, fueron alineados con las correspondientes secuencias consensos de cada muestra de IRES obtenida previamente por secuenciación Sanger. Los porcentajes de *reads* de cada muestra que alinearon con esta región variaron entre 0,4% y 3,4% (datos no mostrados), lo cual difiere enormemente con aquellos que alinearon con NS3 (Figura suplementaria 6). Si bien era esperable que fuera una menor cantidad de *reads* ya que el largo del IRES es 5 veces menor que el de la proteasa, los porcentajes obtenidos son bastante inferiores. Esto sugiere que, o bien se partió de una cantidad de IRES subóptima, o muchos *reads* correspondientes al IRES fueron eliminados en el proceso de filtrado.

Al analizar la cobertura a lo largo de todo el IRES (Figura 27), se ve que decrece hacia los extremos, igual que lo observado para NS3 (Figura 19). En promedio, la cobertura de cada muestra varió entre 2.400X y 15.300X.

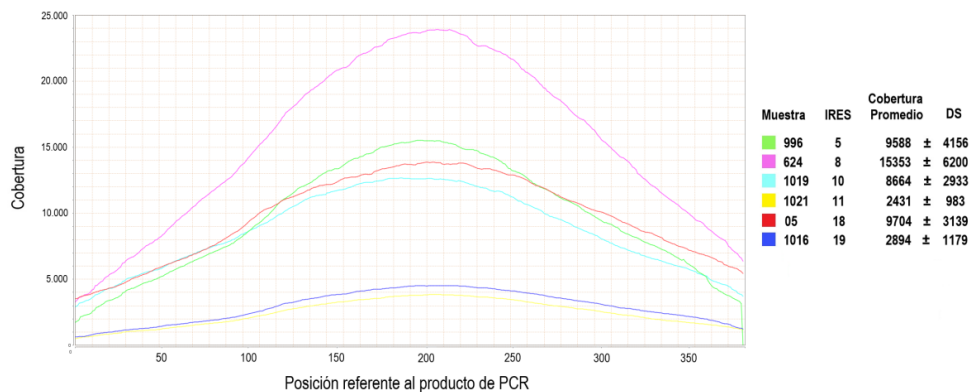


Figura 27. Cobertura a lo largo del IRES luego del alineamiento de los reads filtrados. Se indican en diferentes colores las distintas muestras y a qué IRES corresponden. En el esquema derecho se muestra la cobertura promedio y su desviación estándar (DS). Calculado con la herramienta Qualimap 2 (Okonechnikov et al. 2015).

Afortunadamente, la comparación de las secuencias consensos obtenidas por Secuenciación Sanger y masiva rindió 100% de concordancia en 4 de las muestras (05, 624, 996 y 1019). En las 2 restantes (1016 y 1019), sólo se identificó un cambio en cada una, en posiciones que parecían polimórficas en los cromatogramas (doble pico), pero que resultaron no serlo al analizar los reads de NGS (resultados no mostrados), o viceversa.

Identificación de mutaciones en subpoblaciones dentro de la cuasiespecie

Para cada muestra analizada se identificaron cambios presentes en diferente frecuencia dentro de la población viral (presentes en 1-15%). Con excepción de la muestra 1021 (IRES 11), las muestras de GT1a mostraron ser relativamente homogéneas en términos de cantidad de mutaciones con frecuencias menores al 15%, que no habían sido detectadas por secuenciación poblacional (Figura 28A); la muestra 996 (IRES 5) no presentó cambios de baja frecuencia. La mayoría de los cambios identificados refieren a posiciones que ya habían sido descritas como variables en otras muestras en las secuencias consenso (107, 119, 204, 243, 248, 340 y 358).

VARIANTES NATURALES DEL IRES Y SU EFICIENCIA TRADUCCIONAL VIRAL

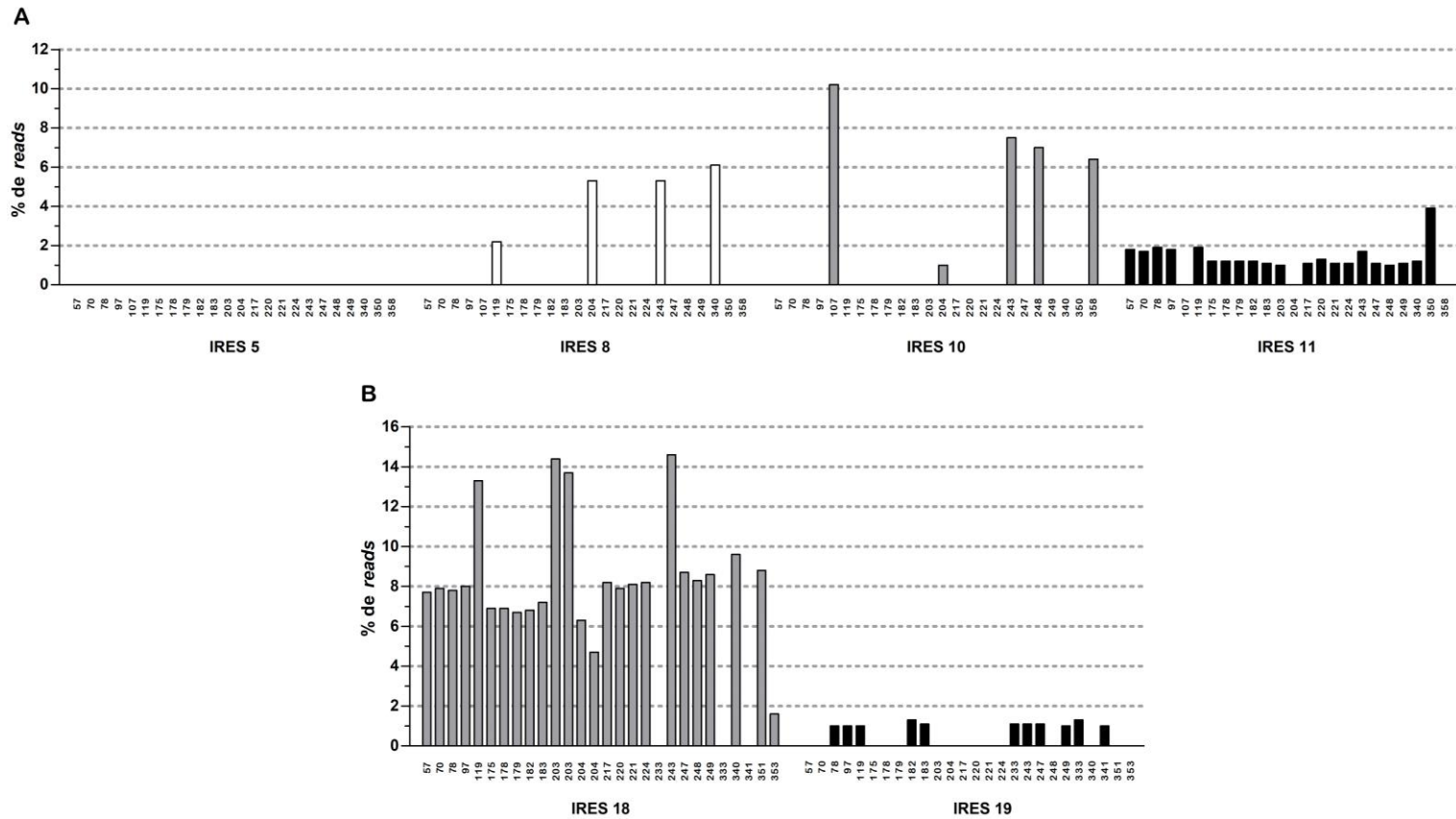


Figura 28. Distribución de variantes de baja frecuencia identificadas en las cuasiespecies de los IRES analizados por NGS. Se muestran los IRES amplificados y secuenciados de forma profunda cuyos consensos o clones evidenciaron menor eficiencia traduccional. Se indican sólo aquellas posiciones nucleotídicas que revelaron la presencia de mutaciones de baja frecuencia (1-15% de reads). **A)** IRES correspondientes a muestras de GT1 (996 - IRES 5; 624 - IRES 8; 1019 - IRES 10; 1021 - IRES11). **B)** IRES correspondientes a muestras de GT3a (05 - IRES 18; 1016 - IRES 19). Notas: El IRES 5 no mostró mutaciones de baja frecuencia. El IRES 18 exhibió dos mutaciones diferentes de baja frecuencia en las posiciones 203 y 204.

Las muestras de GT3a (Figura 28B) así como el IRES 11 (GT1a), revelaron un panorama diferente en cuanto a la variabilidad de sus cuasiespecies, con múltiples sitios con cambios de baja frecuencia. Estudiando los cambios y sus frecuencias detalladamente, se observa que tanto los del IRES 11 (1a, muestra 1021) como los del IRES 18 (3a, muestra 05) se localizan en las mismas posiciones y son opuestos (la variante minoritaria en una cuasiespecie, es variante mayoritaria en la otra, y viceversa). Esto motivó la comparación de las secuencias de referencia 1a y 3a para determinar si estos cambios podrían corresponder con sitios que naturalmente difieren entre ambos subtipos. Sorprendentemente, las 19 posiciones que diferencian estos subtipos a nivel de la región no codificante del IRES, se corresponden con las posiciones que presentan variantes de baja frecuencia dentro de cada cuasiespecie. Como se observa en la Figura 29, en el IRES 11, las variantes presentes en frecuencias de 1,0-1,9% se corresponden con el GT3a mientras que las mayoritarias son de GT1a. Por el contrario, en el IRES 18, las variantes presentes en frecuencias de 6,7-8,7% se corresponden con el GT1a, mientras que las mayoritarias son de GT3a. Por tanto, es probable que estas muestras reflejen infecciones mixtas donde el genotipo viral predominante es el detectado a nivel de las secuencias consenso de las diferentes regiones analizadas por secuenciación Sanger. Este hallazgo representa una novedad respecto a los métodos convencionales de detección y genotipificación, ya que gracias a la técnica de NGS es posible suponer la existencia de infecciones mixtas en cada uno de estos pacientes, los cuales hasta el momento han sido tratados como infectados con un único genotipo viral. No obstante, restan PCRs genotipo-específicas confirmatorias. La utilidad de NGS en la detección de este tipo de infecciones ha tomado mayor relevancia con el desarrollo de los DAAs ya que no todos son pangentotípicos. Recientemente se ha empleado esta técnica para realizar diagnósticos certeros en diferentes partes del mundo, lo cual subraya la importancia de poder acceder a estas metodologías (Qiu et al. 2015; del Campo et al. 2018; McNaughton et al. 2018; Pedersen et al. 2018; Bukowska-Ośko et al. 2018).

El caso del IRES 19 (muestra 1016 - GT3a) representa una situación intermedia ya que si bien exhibe cambios en algunas de las posiciones que diferencian los

genotipos 1a y 3a, también involucra otros cambios. Sin embargo, dado que esta muestra fue una de las que presentó menor cobertura (Figura 27), en caso de existir una infección mixta con un genotipo muy minoritario, podría estar pasando indetectado.

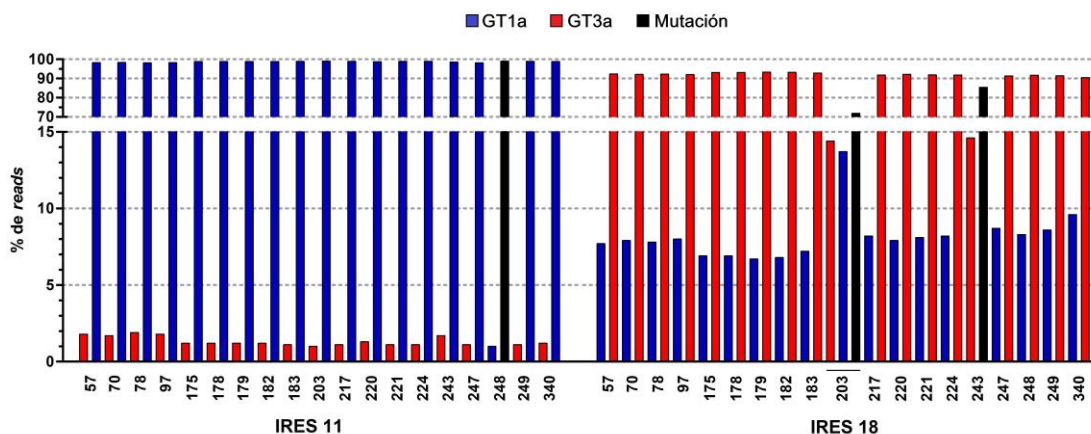


Figura 29. Variantes mayoritarias y de baja frecuencia identificadas en las cuasiespecies de los IRES provenientes de muestras con infecciones mixtas presuntivas analizados por NGS. Se muestran los IRES 11 y 18, provenientes de muestras de GT1a (1021) y 3a (05), respectivamente. Se indican solo aquellas posiciones nucleotídicas que son diferentes entre los subtipos mencionados a nivel de la región no codificante del IRES. Se representan tanto los cambios de baja frecuencia (1-15% de *reads*) como los mayoritarios: en azul aquellos específicos del GT1a, en rojo los específicos de GT3a y en negro aquellos que representan mutaciones (nucleótidos diferentes a los de las referencia de uno u otro genotipo). Nota: El IRES 18 exhibió dos mutaciones diferentes de baja frecuencia en la posición 203.

Es importante mencionar que, algunas de las mutaciones que fueron halladas en los clones menos eficientes traduccionalmente (del367G en clon A5, U61C en clon E19, A73G en clon B8, A85G en clon C8, ver Figura 26), no fueron detectadas mediante secuenciación profunda a nivel de variantes de baja frecuencia. Sin embargo, se encontraron como variantes presuntamente minoritarias (<1%), ya que la profundidad lograda fue menor a 10.000X. Esta discordancia con los resultados de NGS llevó a que se reconfirmara la existencia de estos mutantes por clonación nuevamente. En esta oportunidad se analizaron entre 37 y 58 clones por muestra mediante secuenciación Sanger, y se determinó que la combinación de mutaciones exhibida por éstos se halló en frecuencias entre 2,0 y 4,5%.

6.5.7. Relevancia de las subpoblaciones traduccionalmente ineficientes

Aunque la eficiencia traduccional se ha asociado con la respuesta a la biterapia (IFN- α -peg/RBV) en GT3 (Yasmeen et al. 2006), existen también reportes contradictorios (Sáiz et al. 1999). En este trabajo no pudo evaluarse tal relación ya que no se contaba con información completa sobre respuesta a la terapia. Sin embargo, los resultados obtenidos (Tabla 11) no parecen apoyar la suposición de que eficiencias traduccionales bajas podrían correlacionar con menores CVs.

A pesar de ello, es claro que no solo existen poblaciones mayoritarias que exhiben bajas eficiencias traduccionales *in vitro*, sino también subpoblaciones presentes en menor frecuencia. Por ello surge la pregunta: ¿qué importancia pueden tener estas variantes en la progresión de la infección? Varios reportes sugieren que la eficiencia traduccional difiere dependiendo del contexto celular en el cual se estudie, y proponen que la disponibilidad diferencial de ITAFs podría ser el motivo (Sáiz et al. 1999; Laporte et al. 2000; Lerat et al. 2000; Laporte et al. 2003; Forton et al. 2004; Durand et al. 2010). Algunos autores han observado que variantes obtenidas a partir de plasma, con baja eficiencia *in vitro* o en células derivadas de hepatocitos, tienden a ser más eficientes en células linfoides, lo cual proponen favorecería el tropismo extrahepático. No obstante, también se han descrito variantes traduccionalmente ineficientes tanto en hepatocitos como en otros tipos celulares, que parecerían contribuir con la persistencia viral por mecanismos diferentes (la baja producción de proteínas llevaría a una respuesta inmune inefectiva y podría dar cuenta de las infecciones ocultas). Por tanto, la identificación de variantes menos eficientes podría estar indicando el progreso hacia diferentes modos de persistencia viral, y sería un factor más a considerar para un apropiado seguimiento de estos individuos.

Por otra parte, un análisis más profundo de estas variantes naturales, podría dar puntapié al desarrollo de estrategias vacunales atenuadas, tal y como fue generada la vacuna contra el polio (Sabin and Boulger 1973; Macadam et al. 1991). Sin embargo, considerando la posible relación entre estas variantes y la persistencia viral, sería imperioso combinar un IRES atenuado con alguna otra característica que le impida a la cepa viral persistir en el organismo.

6.6. Conclusiones

- Los IRES de GT1a y 3a resultaron más variables que los de GT1b en términos de cantidad de cepas que presentaron sitios mutados.
- La amplia mayoría de las mutaciones identificadas se localizan en los dominios II y III del IRES, y no parecen afectar la estructura secundaria de éstos, según predicciones *in silico*.
- Se evidenció la existencia de variantes ineficientes traduccionalmente tanto a nivel de secuencias mayoritarias como a nivel de subpoblaciones dentro de la cuasiespecie.
- Algunas mutaciones puntuales serían, en algunos casos, las responsables de las deficiencias en la actividad traduccional. Sin embargo, también se observó que ciertas mutaciones parecen compensar a estas mutaciones detrimentales.
- El contexto genético en el que se encuentran los cambios en la posición 119 es importante y afecta la capacidad de producir proteínas.
- El análisis de la diversidad de cuasiespecies por NGS reveló que, en general, las muestras de GT1a presentan menos cantidad de variantes de baja frecuencia que las muestras de GT3a. Sin embargo, esto podría explicarse por posibles infecciones mixtas con genotipos de baja frecuencia, los cuales podrían estar revelándose por cambios en los sitios que diferencian distintos subtipos virales a nivel del IRES. Al momento de escritura, estos genotipos presentes en baja frecuencia no se han confirmado con PCRs genotipo-específicas.
- Las variantes ineficientes podrían indicar el potencial del virus de persistir en el organismo, y por tanto sería interesante tenerlas presentes para un correcto seguimiento del paciente.

7. CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN PUTATIVA ENTRE miR-122 Y EL DOMINIO IV DEL IRES

7.1. Antecedentes y fundamento teórico

Los microARNs (miRNAs) son ARN cortos (19-22nt) de simple cadena que normalmente promueven la degradación e inhiben la traducción de ARN mensajeros celulares (ARNm) (Bartel 2009). Esta función es ejercida mediante su unión, generalmente a la región 3' no traducida (3'UTR) de los ARNm. Este apareamiento miRNA/ARNm no es perfecto y suele abarcar una región de 6-7 bases de complementariedad, denominada "semilla" (Brennecke et al. 2005). Sin embargo, los sitios de reconocimiento de miRNAs son potenciados por apareamientos adicionales de sus regiones 3' (Grimson et al. 2007)

Diferentes virus han desarrollado estrategias para usurpar miRNAs celulares y utilizarlos en beneficio propio y VHC no es la excepción. Como se mencionó en la Introducción y en el capítulo anterior, VHC traduce su poliproteína gracias a un mecanismo IRES dependiente (Pestova et al. 1998). La secuencia primaria de la región IRES se encuentra bastante conservada entre los diferentes genotipos y comprende aproximadamente 340nt (desde el nucleótido 44 a los primeros 12 a 30nt del core) estructurados en los dominios II al IV (Wang et al. 1993; Honda et al. 1996b; Reynolds et al. 1996). miR-122 es el miRNA más abundante a nivel hepático, donde en condiciones normales cumple diversos roles implicados en el desarrollo, diferenciación y homeostasis hepática (Bandiera et al. 2015). Este miRNA se une en al menos 5 sitios ya caracterizados a lo largo del genoma de VHC: dos en el extremo 5'NCR, dos en la región codificante para la polimerasa viral y otro en el extremo 3'NCR (Nasheri et al. 2011; Gerresheim et al. 2017). La unión ocurre por complementariedad de bases Watson-Crick con la región "semilla" del micro ARN, tal cual ocurre entre miRNAs de origen animal y sus secuencias blanco (Du and Zamore 2005), si bien algunas uniones se han visto potenciadas por apareamientos auxiliares al 3' de miR-122 (Shimakami et al. 2012b).

La interacción con el extremo 5'NCR ocurre en 2 sitios adyacentes (S1 y S2, por fuera de los dominios que conforman el IRES) (Jopling et al. 2008) (Figura 30A y B) y es fundamental para la replicación viral (Jopling et al. 2005), por lo cual se lo considera un determinante clave del hepatotropismo. Esta unión recluta a la proteína argonauta (AGO), y contrario a lo que usualmente ocurre a nivel celular, impide la degradación del ARN viral por exorribonucleasas así como la detección por el sistema inmune innato (Shimakami et al. 2012a; Sedano and Sarnow 2014). Esta interacción actúa secuestrando miR-122 y disminuye la disponibilidad de este miRNA para cumplir con sus roles fisiológicos normales, lo que podría facilitar el potencial oncogénico de VHC a largo plazo (Luna et al. 2015) así como la inducción de enfermedades hepáticas como la esteatosis o la cirrosis (Hsu et al. 2012; Bandiera et al. 2015). La unión a los sitios S1 y S2 también genera un incremento de la traducción viral (Henke et al. 2008; Jangra et al. 2010; Fehr et al. 2012; Conrad et al. 2013; Nieder-Röhrmann et al. 2017), pero hasta el 2018, se desconocían los mecanismos moleculares que explicarían dicho aumento. A mediados del año pasado, investigadores alemanes reportaron que la unión asistiría al plegamiento de un IRES funcional mediante la supresión de estructuras secundarias alternativas energéticamente favorables (Schult et al. 2018), finalmente explicando lo observado.

Previo a estos hallazgos, otros autores trataron de explicar el efecto sobre la traducción y propusieron la existencia de un nuevo sitio de unión de miR-122, de secuencia no canónica (sin complementariedad exacta entre VHC y la región "semilla" del miRNA) localizado directamente en el IRES, en el dominio IV (Figura 30C) (Pang et al. 2012). Mediante la técnica selectiva de 2'-hidroxiacilación analizada por extensión de cebador (SHAPE, del inglés: *Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*), los autores cuantificaron la flexibilidad de los nucleótidos del extremo 5'NCR en presencia o ausencia de miR-122, y de este modo determinaron que además de cambios en reactividad en la región correspondiente a S2, también se detectaban en el dominio IV. Además, por medio de ensayos de *UV cross-linking in vitro*, pudieron confirmar la unión solapante con el codón inicio AUG; no obstante, no lograron determinar el efecto de esta unión sobre la traducción o la replicación.

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN PUTATIVA ENTRE miR-122 Y EL DOMINIO IV DEL IRES

Posteriormente, ensayos de inmunoprecipitación y *cross-linking* de AGO con el ARN viral (AGO-clip) sugirieron también la unión de esta proteína al IRES de VHC (Luna et al. 2015), lo cual podría ser un apoyo a la propuesta de Pang *et al.*, (2012). A pesar de que la técnica empleada (AGO-clip estándar) no implicaba la unión covalente entre un miRNA determinado y el ARN viral, se emplearon células *knock-out* para Droscha, una enzima clave en la biogénesis de los micro ARNs, suplementadas únicamente con miR-122, por lo cual cabría suponer que la unión de AGO al IRES representa la unión de miR-122 a esta región.

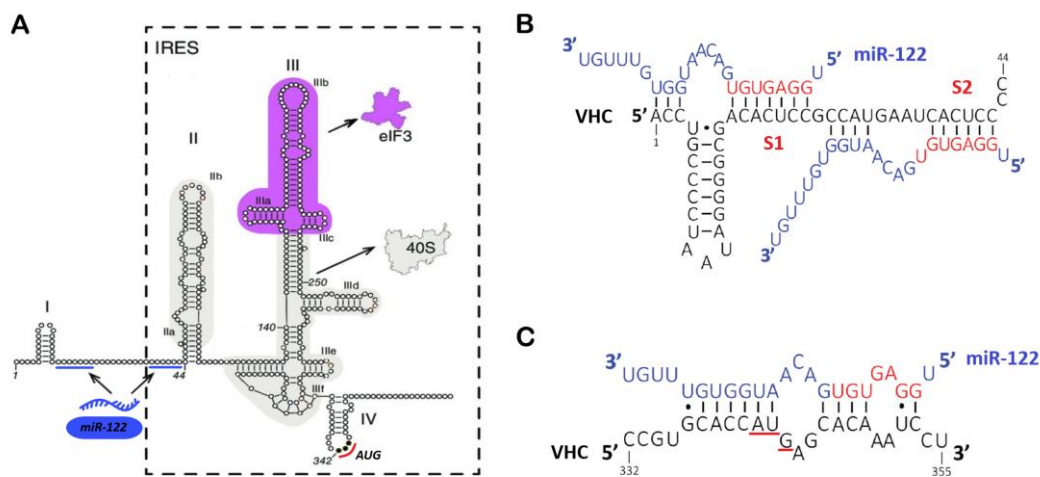


Figura 30. Unión canónica de miR-122 al extremo 5'NCR del genoma de VHC versus unión no canónica en el dominio IV del IRES. **A)** Estructura secundaria del IRES de VHC donde se indican los sitios de unión canónicos de miR-122 en azul y en rojo el codón de inicio AUG (modificado de Mailliot y Martin (2018). **B y C)** En negro se muestra el genoma de VHC y en azul miR-122, a excepción de la secuencia semilla que está en rojo. Líneas negras verticales indican apareamientos de bases del tipo Watson-Crick; puntos negros indican apareamientos tipo *wobble* G-U. **B)** Unión canónica a los sitios S1 y S2 ubicados entre el *stem-loop* I y el *stem-loop* II (no mostrado) del 5'NCR (figura modificada de Bernier y Sagan (2019). **C)** Unión no canónica putativa propuesta por Pang *et al.*, (2012). Se subraya en rojo el codón de inicio AUG.

Aunque la interacción entre miR-122 y los sitios S1 y S2 del extremo 5'NCR ha sido estudiada en profundidad, aún hay roles de este miRNA en el ciclo viral de VHC que no se comprenden en su totalidad, como por ejemplo la unión putativa no canónica al dominio IV del IRES y su efecto en la traducción de la poliproteína.

7.2. Hipótesis

Visto que se ha propuesto la unión no canónica de miR-122 al dominio IV del IRES de VHC, y que ésta solapa con el codón de inicio de la poliproteína, se plantea que esta unión no canónica podría modular negativamente la traducción de la poliproteína viral, posiblemente por interferir con la interacción con el ribosoma.

7.3. Objetivo Específico Capítulo 5

Caracterizar funcionalmente la interacción entre miR-122 y el sitio de unión putativo no canónico propuesto en el dominio IV del IRES de VHC analizando su efecto sobre la eficiencia traduccional mediante la utilización de replicones reporteros de genoma completo de VHC.

7.4. Materiales y Métodos

Estas actividades fueron realizadas en el marco de una pasantía de capacitación de 6 meses en el Laboratory of Virology and Infectious Disease, The Rockefeller University (Nueva York, Estados Unidos), laboratorio que dirige el Dr. Charles M. Rice. El Dr. Yingpu Yu me orientó a nivel experimental, mientras que la idea de investigación fue propuesta por el Dr. Joseph Luna.

7.4.1. Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares Huh7.5 (Blight et al. 2002) y Δ miR-122 Huh7.5 (Luna et al. 2015), las cuales fueron mantenidas en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Paisley, UK) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Hyclone, Thermo Scientific, Utah, USA) y 0,1mM de AA no esenciales (NEAA, del inglés: *Non-essential amino acids*, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La línea Huh7.5 es un clon de alta permisividad a VHC, derivado de una línea celular de hepatoma humano (Huh7) (Nakabayashi et al. 1982). La línea Δ miR-122 Huh7.5 es defectiva para la producción de miR-122 (Luna et al. 2015).

7.4.2. Mutaciones seleccionadas para ser evaluadas

En primer lugar se alinearon las regiones correspondientes al *stem-loop* (SL) IV del IRES de los diferentes genotipos para analizar su conservación y seleccionar así de forma más racional las posiciones a mutar. Para ello se incluyeron 12 secuencias de las utilizadas en el capítulo 1 (Tabla Suplementaria 4), correspondientes a los genotipos 1a (AF009606), 1b (AJ238799), 1c (AY051292), 2a (AB047639, cepa JFH1), 2b (AB559564), 3a (NC 009824), 3b (JQ065709), 4a (GU814265), 5a (KC844046), 6a (EU246930), 7a (EF108306) y 8 (MH590701). Se alinearon con el programa Clustal W (Thompson et al. 1994) y se tomó como secuencia de referencia la cepa 2a JFH1 (el vector a utilizar corresponde a este genotipo viral).

Como puede observarse en la Figura 31, algunos genotipos (3a, 3b, 6a y 8) varían en posiciones que se localizan en el bucle del SL (tienen menos restricciones de estructura secundaria por ser simple hebra), y además esos sitios solapan con las

posiciones de unión putativa con miR-122. Al considerar ambas observaciones, se decidió generar diferentes mutantes con el objetivo de desestabilizar o estabilizar la interacción, principalmente mutando las posiciones en las que ya existen cambios naturalmente, ya que es probable que no sean perjudiciales para el virus, al menos en la combinación en la que se encuentran en la naturaleza.

Genotipo	N° de Acceso	Cepa	A	C	C	G	U	G	C	A	C	C	A	U	G	A	G	C	A	C	A	A	A	U	C	C	U	A	A	
2a	AB047639	JFH1	A	C	C	G	U	G	C	A	C	C	A	U	G	A	G	C	A	C	A	A	A	U	C	C	U	A	A	
1a	AF009606	H77	G	
1b	AJ238799	Con1	G	
1c	AY051292	NA	G	
2b	AB559564	NA	U	
3a	NC 009824	NZL1	A	C	U	
3b	JQ065709	SH37	U	C	U
4a	GU814265	ED43	G
5a	KC844046	ZS631	G
6a	EU246930	D9	U	C	U	.	.	.	A	.	.	
7a	EF108306	QC69	G
8	MH590701	GT8-4	U	C	U

Figura 31. Conservación de secuencia del SL IV del IRES de VHC en los diferentes genotipos. Se subraya en línea negra continua el sitio putativo de unión no canónica de miR-122 al IRES, según propuesta de Pang et al. (2012). Se indica con línea azul cortada las posiciones simple hebra, y en rojo el codón inicio. Iluminado en anaranjado se muestran las posiciones simple hebra variables y que serán blanco de las mutaciones a evaluar (posiciones 339, 350 y 351 en referencia a la cepa JFH1). Met: metionina, Ser: serina, Thr: treonina, Asn: asparagina, Pro: prolina. La Asn cambia a leucina en los genotipos 3a, 3b, 6a y 8.

Por tanto, los mutantes diseñados fueron los siguientes (Figura 32):

Mutante A – Se introdujeron mutaciones para que la unión de miR-122 fuera más estable río abajo del codón AUG, y menos estable río arriba, asemejándose así la secuencia de GT2a a la de GT3a. Estos cambios (C339A, A350C, A351U) deberían reflejar lo que sucede en la naturaleza.

Mutante B – Solamente se introdujeron las mutaciones A350C y A351U para lograr la máxima unión posible entre miR-122 y el IRES de VHC. Esto permitiría una unión canónica de la región semilla.

Mutante C – Se le introdujo la mutación C339A para desestabilizar la unión 3' de miR-122, y evitar así, regiones con interacciones mayores a 3 – 4nt seguidos.

Mutante D – Honda, Brown y Lemon (1996) reportaron una duplicación de los primeros dos codones del core, que exhibía una eficiencia traduccional comparable a la secuencia referencia de GT1b (mutante p351_6). Al analizar la secuencia con los 6nt insertados respecto a la posible unión de miR-122, solamente remueve uno de los apareamientos de tipo *wobble*, por lo cual, de confirmarse estos resultados, este mutante permitiría constatar la poca relevancia de ese apareamiento débil. No obstante, dado que el genotipo del vector a utilizar de base es 2a, la duplicación se realizó de acuerdo a la secuencia de este genotipo. A nivel de AA la inserción es igual (Ser: serina y Thr: treonina), pero la secuencia nucleotídica difiere en 1nt.

Mutante E – Mutante al azar donde se mutaron simultáneamente todas las posiciones simple hebra del bucle del SL IV (337-339 y 343) con el objetivo de modificar todo lo que fuera posible dentro del bucle, y desestabilizar ambos sitios de unión con miR-122. No se cambió ni el marco de lectura ni el codón de inicio.

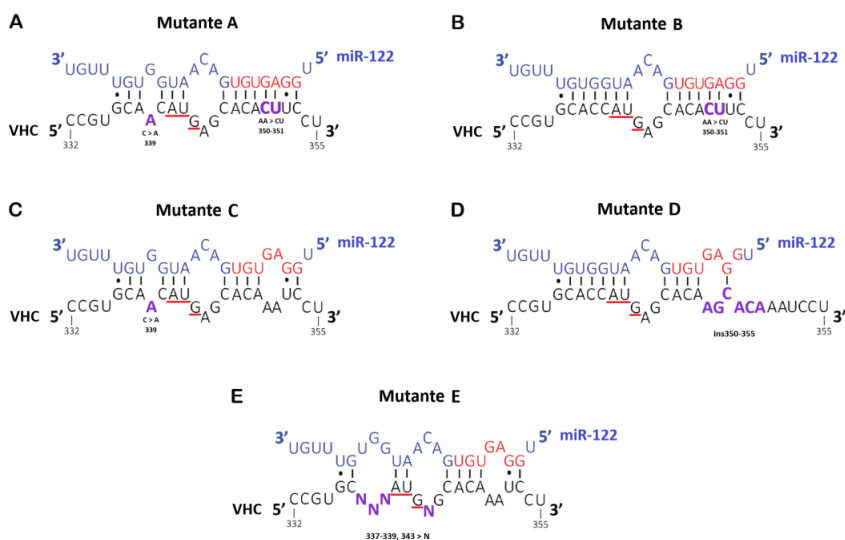


Figura 32. Estructura y secuencia de los mutantes generados en el SL IV del IRES de VHC, y su apareamiento presuntivo con miR-122. En negro se muestra el SL IV de VHC y en azul miR-122, a excepción de la secuencia semilla que está en rojo. Líneas negras verticales indican apareamientos de bases del tipo Watson-Crick; puntos negros indican apareamientos tipo *wobble* G-U. En negrita y violeta se muestran las posiciones mutadas, y debajo de ellas los tipos de cambios efectuados. Se generaron 3 mutantes puntuales (**A**, **B** y **C**), un mutante por inserción (**D**) y un mutante al azar (**E**). Referirse al texto por la *rational*e detrás del diseño.

7.4.3. Características de los vectores utilizados

Con el fin de analizar la eficiencia traduccional viral en un contexto que recapitule de buena manera lo que sucede *in vivo*, se optó por utilizar vectores reporteros de genoma completo de VHC:

1. **pGNN:** El vector que se utilizó como esqueleto para generar los mutantes de interés fue el pJc1FLAG(p7-nsGluc2A)/GNN (denominado pGNN). Éste es un plásmido reportero que codifica para la luciferasa de *Gaussia* – GLuc, que incluye el genoma completo de un recombinante intragenotípico 2a de VHC (cepas J6 y JFH1). Además, ya que el interés se enfocaba en analizar únicamente el efecto de las mutaciones sobre la eficiencia traduccional, se utilizó una variante plasmídica que contiene dos sustituciones en la polimerasa NS5B que lo tornan replicación deficiente (variante denominada GNN) (Marukian et al. 2008). De esta forma se pueden desacoplar ambos procesos y estudiar específicamente la traducción.
2. **m15:** Por otra parte, visto que la unión de miR-122 en los sitios S1 y S2 del extremo 5'NCR afecta la traducción (Henke et al. 2008; Jangra et al. 2010; Fehr et al. 2012; Nieder-Röhrmann et al. 2017; Schult et al. 2018), y sólo se quiere evaluar la posible interacción con el sitio en el dominio IV del IRES, para la generación de los mutantes se recurrió al uso de un vector que tiene mutados los sitios de manera tal de que sea dependiente de miR-15 en vez de miR-122 – pJc1FLAG(p7-nsGluc2A)-m15 (denominado m15) (Luna et al. 2015).

Tanto m15 como pGNN fueron utilizados para generar los mutantes en el dominio IV del IRES utilizando la estrategia de mutagénesis por *Overlap-extension* PCR. Como resultado se obtuvieron vectores con la estructura general que se indica en la Figura 33, y que se denominaron GNN-m15-MutA al MutE.

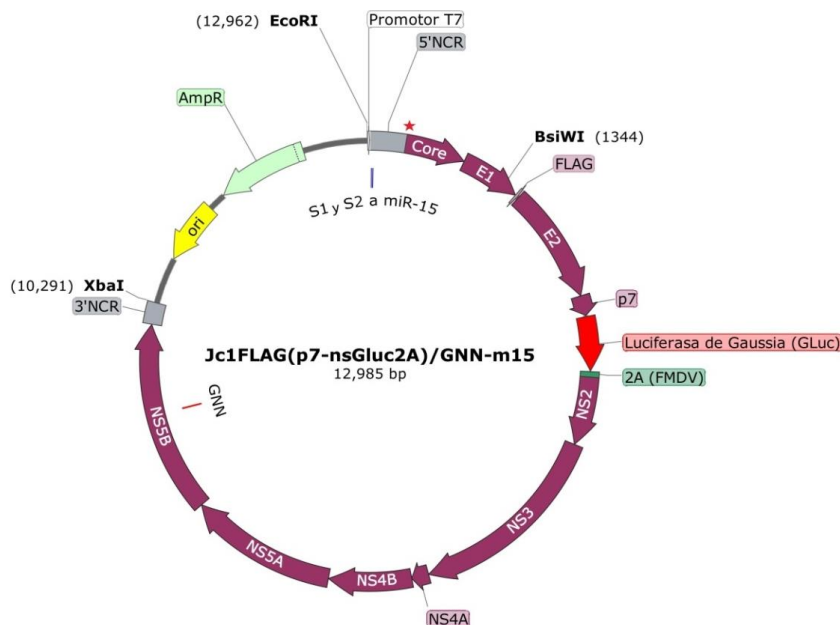


Figura 33. Representación esquemática del vector de VHC de genoma completo pJc1FLAG(p7-nsGluc2A)/GNN-m15 utilizado para generar los mutantes. Construcción generada en el marco de esta tesis a partir de otras dos construcciones previamente disponibles y generadas por otros: pGNN (Marukian et al. 2008) y m15 (Luna et al. 2015). El gen reportero (GLuc, flecha roja), se encuentra en tándem con la secuencia del péptido autoproteolítico 2A del virus de la aftosa - FMDV (recuadro verde). En el extremo 5'NCR se señalan los sitios de unión a miRNAs, S1 y S2 mutados para unir a miR-15. Con una estrella roja se indica el sitio aproximado de las mutaciones evaluadas. Los diferentes genes que forman el ORF de VHC se indican con flechas moradas, el gen de resistencia a ampicilina (*ampR*) en verde claro, y en amarillo el origen de replicación. También se indican los sitios de corte de enzimas de restricción que se utilizaron en esta tesis. Creado con SnapGeneViewer v4.2.6 (GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

7.4.4. Obtención del *Backbone* GNN

En primer lugar se generó el *backbone* a utilizar tanto para la obtención de mutantes como para la generación de un vector control. El vector pGNN se digirió con *EcoRI* y *BsiWI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) (Figura 33) según indicaciones del fabricante, y posteriormente se trató con fosfatasa alcalina a fin de minimizar los eventos de recircularización. El volumen total de la digestión fue sembrado en un gel de agarosa al 1%, con *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Madison, USA) como intercalante de ADN. Se cortó la banda correspondiente al *backbone* pGNN (~11,6Kb) y se purificó utilizando el QIAQuick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), según protocolo del fabricante. Una vez purificado, se midió la concentración de ADN en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

7.4.5. Generación de vector control pGNN-m15

Digestión:

El vector m15 fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *BsiWI* para extraer la región con los sitios m15, y poder posteriormente ligarla con el *backbone* GNN generado en la sección anterior (7.4.4). La digestión fue idéntica a la realizada para generar el *backbone*, con la salvedad de que el templado de ADN cambió y el producto a purificar de gel correspondió a la banda de 1367pb (inserto).

Ligación y transformación:

A continuación, el inserto (proveniente del vector m15) fue ligado al *backbone* GNN, utilizando 30ng de *backbone* y ~10,6ng de inserto (*ratio* 3:1 entre inserto y vector). Se empleó la enzima T4 ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) según indicaciones del fabricante. También se agregó un control negativo de ligación en el cual sólo se incluyó el *backbone*, pero no el inserto. Estas mezclas se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (T_{amb}) antes de proseguir con la transformación.

Posteriormente se realizó la transformación por *shock* térmico en bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes (50 μ l) y se sembraron por rastrillado en placas de LB con carbenicilina (CB, a una concentración final de 100 μ g/mL). Como control negativo se transformó además un vial de bacterias competentes con 3 μ l del control negativo de ligación (*backbone* sin inserto). Las placas se incubaron a 37°C *overnight* (16-18h). Las colonias que incorporaron el vector construido crecieron en presencia de CB. Con el fin de amplificar los vectores se seleccionaron 3 colonias y se las creció en 4mL de LB-AMP (a una concentración final de 100 μ g/mL) por 12h a 37°C y 220rpm. Posteriormente se realizó la extracción de plásmidos utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) según indicaciones del fabricante. Finalmente se midió la concentración del ADN extraído, se verificó la presencia de inserto digiriendo 1000ng de cada plásmido con *EcoRI* y *BsiWI*, y se visualizó el resultado en un gel de agarosa al 1%. Los plásmidos con inserto del tamaño esperado fueron enviados a secuenciar a MacroGen USA con 4 cebadores que abarcan toda la región del inserto (Tabla Suplementaria 19).

Extracción plasmídica por Maxiprep:

Para obtener buena cantidad de vector para los análisis siguientes, las colonias que contenían el inserto de secuencia correcta fueron amplificadas en un cultivo *starter* de 2mL de LB-AMP (100µg/mL), el cual fue incubado por 8h a 37°C y 220rpm. Transcurrido este tiempo, se adicionaron los 2mL de cultivo a 100mL de LB-AMP (100µg/mL), y se incubó por 12h más (ídem condiciones). Los plásmidos fueron extraídos utilizando el High Speed Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA), según protocolo del fabricante.

7.4.6. Generación de plásmidos mutantes en el dominio IV del IRES

Overlap-extension PCR:

El vector control pGNN-m15 se utilizó como templado para obtener los productos de PCR necesarios para llevar adelante la *Overlap-extension PCR* y poder así incorporar las mutaciones de interés (Figura 34). El producto de la PCR1 (P1) abarcó 404pb, desde el promotor T7 hasta el dominio IV del IRES (con cebadores con las mutaciones de interés), y el producto de la PCR2 (P2) incluyó desde el dominio IV (con cebadores complementarios a los anteriores) hasta E1 (1021pb). Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla Suplementaria 19.

Las mezclas de reacción para estas PCRs incluyeron: 5µl de Phusion HF Buffer 5X, 0,75µl de MgCl₂ 50mM, 0,5µl de dNTPs 10mM, 1µl de cada cebador, 0,3µl de polimerasa Phusion HF 2U/µl (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 10ng de vector parental (pGNN-m15) y agua DEPC hasta completar el volumen final (25µl cada reacción). El ciclado de amplificación fue idéntico para ambas PCRs 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 58°C y 1min de extensión a 72°C, y finalmente 2min de extensión final a 72°C. Previo a extender estos productos en una *Overlap-PCR*, se purificaron a partir de gel y se midieron sus concentraciones de ADN.

Para generar el producto final (PF = 1399pb) que posteriormente dio lugar al inserto que se ligó con el *backbone*, se realizó una *Overlap-extension* PCR a partir de cantidades equimolares de P1 y P2.

La mezcla de reacción incluyó: 10µl de Phusion HF Buffer 5X, 1,5µl de MgCl₂ 50mM, 1µl de dNTPs 10mM, 0,6µl de polimerasa Phusion HF 2U/µl (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), P1 y P2 en cantidades equimolares y agua DEPC hasta completar un volumen final de 50µl. El ciclado de amplificación fue el siguiente: 1min a 98°C, seguido de 10 ciclos de: 30seg a 98°C, 30seg a 58°C y 1,5min a 72°C, y finalmente 3min de extensión final a 72°C. Luego de que el ciclo finalizara, se le agregó 0,5µl de enzima, 2µl del cebador *forward* de la PCR1 (JL-P-0280-F) y 2µl del cebador reverso de la PCR2 (RU-O-16514), y se repitió el ciclado por 30 ciclos más.

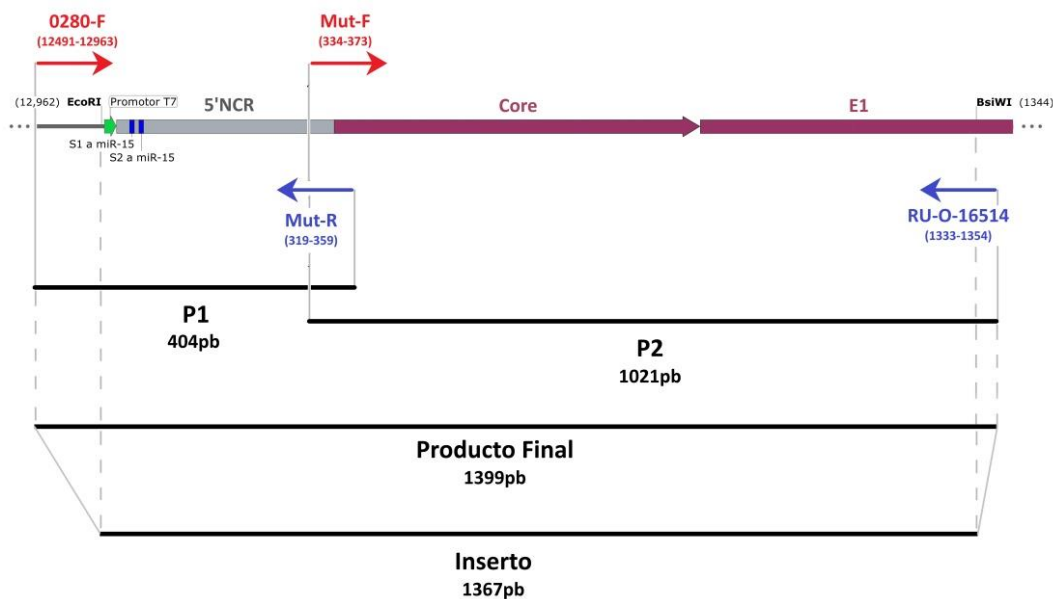


Figura 34. Esquema de la localización de los cebadores utilizados en la estrategia de *Overlap-extension* PCR para generar los mutantes en el SL IV del IRES de VHC. Se representa la región del vector utilizado como templado para la mutagénesis (GNN-m15), indicando diferentes regiones y características en distintos colores. Arriba del esquema se indican tanto los sitios de corte de las enzimas *EcoRI* y *BsiWI*, como los cebadores *forward* (en rojo), y por debajo los reversos (azul). Como Mut-F y R se representan genéricamente todos los cebadores usados para la mutagénesis (Tabla Suplementaria 19). 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 *EcoRI* y *BsiWI*).

Estos productos finales se purificaron a partir de gel, se midieron sus concentraciones y luego fueron digeridos con *EcoRI* y *BsiWI*. Posterior a la digestión, se purificaron utilizando el MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) y se midieron sus concentraciones de ADN. A partir de ahora se denominarán como insertos (1367pb).

Ligación de *backbone* con inserto mutado, transformación y maxipreps:

A continuación los insertos (mutantes diferentes) fueron ligados al *backbone*, se transformaron en bacterias competentes, se verificó la presencia de inserto por digestión, se chequearon las secuencias y finalmente se amplificaron para extraer los plásmidos por maxiprep. Todos los protocolos fueron iguales a los ya descritos para el vector control con la excepción del protocolo seguido para el Mutante E (bucle mutado al azar). Para este caso, la mutagénesis incluía 4 posiciones que podrían generar 4⁴ combinaciones diferentes (4nt posibles en cada una de las posiciones): 256 posibles vectores diferentes. Para maximizar las posibilidades de al menos tener una colonia con cada una de las variantes, sería necesario obtener al menos 10 veces más colonias que el número de combinaciones, es decir 2560 colonias. Por tanto, hasta el paso de la ligación, todo el protocolo fue igual, pero la transformación se realizó en duplicados. A cada vial transformado, se le agregó 1mL de LB, y los 2mL fueron sembrados por rastrillado en placas cuadradas de cultivo celular (245mm x 245mm) con LB-CB, las que fueron incubadas a 37°C por 16-18h. Transcurrido ese tiempo, todas las colonias fueron raspadas con una espátula, resuspendidas en 2mL de LB y centrifugadas previo a realizar la extracción plasmídica.

7.4.7. Vector de expresión monocistrónico de luciferasa de *Firefly* (FLuc)

Como se mencionó en el capítulo anterior, la mejor manera de caracterizar y analizar la funcionalidad de un IRES determinado es mediante el uso de vectores bicistrónicos y dado que el vector pGNN-m15 no lo es, para todos los ensayos de eficiencia traduccional se utilizó además el vector monocistrónico pFLuc:DEST40

que expresa FLuc (generado en el RiceLab a partir del vector de expresión Gateway pcDNA-DEST40, Invitrogen).

7.4.8. Transcripción *in vitro*

Vectores pGNN-m15 (control y mutantes):

Los ADNs plasmídicos fueron linearizados con la enzima *XbaI* (New England Biolabs) siguiendo las indicaciones del fabricante y una alícuota se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar la linearización, previo a la purificación de las digestiones con el MinElute PCR purification Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA). A partir de 1µg de ADN lineal y purificado, se realizó la transcripción *in vitro* utilizando el T7 RiboMAX Express Large Scale RNA production system (Promega), según indicaciones del fabricante. Una vez generados los ARNs (aproximadamente 10,3Kb), fueron purificados siguiendo el protocolo de limpieza de ARN (RNA clean-up) del RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA).

Vector pFLuc:DEST40:

Este vector fue linearizado con la enzima *SacII*. Las condiciones de digestión, las cantidades de los reactivos y el protocolo de purificación del vector lineal fueron similares a los casos ya descritos de los vectores de VHC. Posteriormente, se realizó la transcripción *in vitro* con el mMessage mMachine T7 transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania), que produce ARNs capeados. La incubación fue por 90min a 37°C. Luego se agregó la DNAsa y se la dejó actuar por otros 15min a igual temperatura. El ARN fue purificado y cuantificado al igual que los ARNs de VHC. 10µg de cada ARN capeado fueron poliadenilados utilizando 5U de poliA polimerasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) según protocolo del fabricante. A continuación se purificó el ARN (~2,7kb) con igual protocolo anterior.

Finalmente todos los ARNs fueron cuantificados por nanodrop previo a ser mantenidos a -80°C hasta su utilización. Su integridad fue verificada por electroforesis en geles de agarosa no desnaturizantes, teñidos con *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Madison, USA). Previo a cargar los geles, las muestras de

ARN (1µg) se mezclaron con 1X de *ARN loading dye* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), fueron pre-calentadas por 1min a 70°C, y enfriadas en hielo, para desnaturalizar estructuras secundarias.

7.4.9. Puesta a punto de la detección de GLuc intracelular

Dado que FLuc no se secreta al medio, y sería utilizada para normalizar la expresión de GLuc (IRES dependiente) que sí es capaz de ser secretada, la estrategia para las mediciones de luminiscencia tenía que involucrar necesariamente lisar las células y medir la producción de ambas luciferasas en el medio intracelular. Si bien la detección de GLuc es máxima en el medio extracelular, buenos niveles se detectan también intracelularmente, según estudios de proveedores de luciferasas (New England Biolabs 2019; Thermo Scientific 2019). Por tanto era necesario poner a punto qué momento post-transfección (p.t.) de los ARNs, la producción/detección de GLuc era la más alta.

Se ensayó el vector control pGNN-m15 (por triplicado) además de un control sin ARN (Mock, por triplicado) a cuatro tiempos diferentes: 4h, 6h, 8h y 10h p.t. de los ARNs. Como control de transfección se utilizó el ARNm de una proteína roja fluorescente (RFP) de 3Kb. Para ello se sembraron 30.000 células Huh7.5 en pocillos de placas de 48-wells (una placa por cada tiempo a evaluar). A las 24h, cuando la confluencia se encontraba entre 70%-90%, se transfectaron 100ng del ARN mediante el uso de medio bajo en suero OptiMEM (Gibco, Nueva York, USA) y Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA), según indicaciones del fabricante. Posterior a la transfección se realizó un paso de “*spinoculation*” (centrifugación de placas por 30min a 1000g y 37°C) para ayudar a decantar los compuestos ARN-lipofectamina a la superficie celular y finalmente se transfirieron las placas a una incubadora a 37°C con 5% de CO₂.

Transcurridos los tiempos p.t. a evaluar (4h, 6h, 8h y 10h), primeramente se verificó la expresión de RFP (emisión de fluorescencia) con un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE300. Luego se colectaron los sobrenadantes, se lavaron las células con PBS y se les aplicó 100µl de buffer de lisis pasivo 1X del *Renilla*

Luciferase Assay (Promega, Madison, USA) el cual se dejó actuar por 15min en un agitador de placas a T_{amb} . Luego las células fueron sometidas a un ciclo de congelamiento y descongelamiento en hielo seco, para finalmente coleccionar los lisados que fueron preservados a -80°C hasta su uso.

Es importante mencionar que las luciferasas de *Renilla* y de *Gaussia* son evolutivamente similares y por tanto pueden reaccionar con el mismo tipo de sustrato (Thorne et al. 2010). Por este motivo se utilizó el *Renilla* Luciferase Assay para hacer las mediciones de luminiscencia. Se empleó un lector de placas multimodo FLUOstar Omega (BMG Labtech) con inyectores, dentro del cual se colocó una placa de 96-wells de superficie opaca, con $10\mu\text{l}$ de lisado celular o $20\mu\text{l}$ de sobrenadante. El protocolo de medición fue: a tiempo cero se inyectó el reactivo de *Renilla* ($50\mu\text{l}$ o $100\mu\text{l}$, para lisado o sobrenadante), se agitó por 2seg y 2,3seg después se midió la luminiscencia por 5seg.

7.4.10. Inhibidores y *mimic* de miRNAs

Con el objetivo de analizar la dependencia traduccional de miR-122, los ensayos en las células Huh7.5 incluyeron un inhibidor de este miRNA. Adicionalmente, como control negativo se incluyó un inhibidor de un miRNA no relacionado (miR-124), miRNA que ha sido frecuentemente utilizado a tales fines (Jangra et al. 2010; Shimakami et al. 2012b; Gerresheim et al. 2017). Por otra parte, en los ensayos en las células $\Delta\text{miR-122}$ Huh7.5, se incluyó un análogo o *mimic* de miR-122 que fue suplementado exógenamente.

Como inhibidores de miRNAs se utilizaron ácidos nucleicos bloqueados (LNAs, Exiqon, Woburn, MA, USA):

- hsa-miR-122-5p miRCURY LNA™ *microRNA inhibitor*
- hsa-miR-124-3p miRCURY LNA™; *Power microRNA inhibitor*

Por otra parte se empleó el *mimic* de miR-122: hsa-miR-122-5p mirVana® *miRNA mimic* (Ambion, Thermo Fisher, Austin, TX, USA), el cual es un ARN de doble hebra modificado químicamente que imita el miR-122 endógeno.

7.4.11. Titulación: inhibidores de miRNAs y *mimic* de miR-122

Para determinar la concentración óptima de inhibidores y *mimic* a utilizar, se tituló cada uno de ellos. Se evaluaron 5 concentraciones diferentes que abarcan un rango amplio dentro del cual se encuentran concentraciones utilizadas por otros investigadores (Jangra et al. 2010; Shimakami et al. 2012b; Luna et al. 2015): 0,4nM, 1,2nM, 3nM, 30nM y 50nM, en células Huh7.5 (para testear inhibidores) o en células Δ miR-122 Huh7.5 (para testear el *mimic*) co-transfectadas con el vector pFLuc:DEST40 y con pGNN. Fue necesario que los sitios S1 y S2 de unión a miR-122 no estuvieran mutados, con el fin de poder discriminar concentraciones que efectivamente evidenciaran diferencias notorias en la traducción, derivadas de la unión de miR-122 a estos sitios. Los ARNs de los vectores se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA) y los LNAs con RNAi/Max (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), en ambos casos según indicaciones de los fabricantes. El protocolo experimental implicó la siembra de 30.000 células/pocillo (placa de 48-wells) (día -1), a las 24h la transfección de los LNAs o el *mimic* (día 0), y 48h post-siembra de células (día 1), la transfección de los ARNs virales. 4h p.t. del ARN se lisaron las células según protocolo ya descrito y se midió la luminiscencia con el ensayo Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, USA):

- una placa de 96-wells con 10 μ l de cada lisado se introdujo en un lector de placas multimodo FLUOstar Omega (BMG Labtech) con inyectores que contenían los reactivos para cada una de las luciferasas;
- a tiempo cero se inyectó LARII (50 μ l), se agitó por 2seg, 2,3seg después comenzó la medición de luminiscencia, la cual se extendió por 5seg;
- al finalizar se inyectó *Stop&Glo* (50 μ l) y se agitó por 2seg, 2,3seg más tarde comenzó la segunda medición de luminiscencia, extendiéndose por 5seg.

7.4.12. Diseños experimentales

Ensayos en línea celular Huh7.5 con y sin inhibidor de miR-122:

Se siguió un protocolo similar al empleado para titular la cantidad de inhibidores, pero con concentraciones fijas de éstos. Y se evaluaron cada uno de los 5 mutantes

pGNN-m15-MutA-E, utilizando como controles tanto la construcción dependiente de miR-15 sin mutar el IRES (pGNN-m15), así como el vector dependiente de miR-122 (pGNN). Brevemente, en placas de 48-wells:

- Día -1: se sembraron 30.000 células Huh7.5 por pocillo
- Día 0: se transfectaron 30nM de inhibidor de miR-122, 3nM de inhibidor de miR-124 o bien ninguno, en diferentes pocillos (protocolo de sección 7.4.11)
- Día 1: se co-transfectaron 100ng de ARN viral junto con 26ng de ARN monocistrónico de FLuc (cantidad equimolar)
- Día 1, 4h p.t. de ARNs reporteros: se lisaron las células siguiendo el protocolo mencionado en 7.4.9 y se realizó el ensayo Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, USA) según protocolo ya especificado.

Se incluyeron pocillos controles sin transfectar (pocillos *mock*). Sus valores de luminiscencia fueron utilizados para corregir los valores de los restantes pocillos.

Ensayos en línea celular Δ miR-122 Huh7.5 con y sin *mimic* de miR-122:

En esta línea celular, también se evaluaron los 5 mutantes pGNN-m15-MutA-E y se utilizaron los mismos controles que en los ensayos anteriormente descritos. El protocolo, varió en algunos de los pasos ya que también se debía suplementar con miR-122 de forma exógena:

- Día -1: se sembraron 30.000 células Δ miR-122 Huh7.5 por pocillo
- Día 0: se transfectaron 3nM de *mimic* de miR-122 sólo o bien conjuntamente con 3nM de inhibidor de miR-124 en diferentes pocillos, así como pocillos transfectados únicamente con RNAi/Max (protocolo de sección 7.4.11)
- El día 1 (a tiempo 0 y 4h p.t. de ARNs reporteros) los protocolos fueron iguales que para los ensayos en la línea celular Huh7.5. De igual manera, también se agregaron pocillos *mock* en estos ensayos.

Para cada línea celular se realizaron 2 o 3 réplicas biológicas de las diferentes condiciones ensayadas, cada una con dos réplicas técnicas.

7.4.13. Análisis de eficiencia traduccional de los mutantes

Para evaluar los niveles de producción de luciferasas se siguió el protocolo descrito en la sección 7.4.11, considerando como 100% al control sin mutar el IRES (pGNN-m15), en cada una de las condiciones evaluadas.

7.4.14. Análisis estadísticos

Con el fin de determinar si las diferencias en las eficiencias traduccionales promedio entre diferentes condiciones eran estadísticamente significativas, se emplearon tests de ANOVA de dos vías seguidos por un test de comparación múltiple, el test de Bonferroni. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Análisis y gráficas se realizaron con el *software* GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

7.4.15. Estudio de la estructura secundaria de los mutantes generados

Para determinar si los diferentes mutantes podrían afectar la estructura secundaria del dominio IV del IRES, se realizaron predicciones *in silico* utilizando el RNAfold WebServer (disponible en <http://rna.tbi.univie.ac.at/>) (Gruber et al. 2008), y se visualizaron con el Forna Package (Gendron et al. 2001). Se compararon las estructuras secundarias y las mínimas energías libres (ΔG), tomando como referencia la estructura sin mutar. Dado que el SL IV es muy pequeño (posición 330 a 353 según numeración de cepa JFH1), se hicieron las predicciones de este dominio, pero también considerándolo conjuntamente con el subdominio IIIf del IRES (posiciones 302 a 371).

7.5. Resultados y Discusión

Las interacciones entre miR-122 y el genoma de VHC han revelado múltiples roles en el ciclo viral, muchos de los cuales se encuentran estudiados en profundidad. Sin embargo, su influencia sobre la traducción, aunque ha sido reportada en numerosas ocasiones, solamente se ha podido explicar a nivel funcional recientemente (Schult et al. 2018).

Pang et al. (2012) propusieron, la existencia de un sitio de unión de miR-122 en el dominio IV del IRES, cuya interacción sería del tipo no canónica, ya que no habría unión completa de la semilla de miR-122. El objetivo de este capítulo fue caracterizar funcionalmente esta interacción analizando su efecto sobre la eficiencia traduccional mediante la utilización de replicones de genoma completo de VHC.

7.5.1. Obtención de vectores mutantes en el SL IV del IRES de VHC

Tanto las *Overlap-extension* PCRs así como las digestiones funcionaron correctamente (Figura suplementaria 7A a 7C). Los resultados de las ligaciones y transformaciones rindieron lo esperado y para cada mutante se obtuvo al menos dos colonias con la secuencia deseada (Figura suplementaria 8), por lo cual se eligió una de ellas para amplificar y extraer los plásmidos por maxiprep.

7.5.2. Obtención de ARNs mediante transcripciones *in vitro*

Posterior a la linearización de los vectores (Figura suplementaria 7C y 7D), tanto los de genoma completo de VHC como el vector de FLuc, se emplearon kits comerciales para generar los ARNs de forma *in vitro*.

La integridad de los ARNs transcritos fue visualizada en un gel de agarosa nativo (no desnaturalizante). Estos tipos de geles no son óptimos para determinar el tamaño con precisión ya que el ARN no permanece en su estado extendido a lo largo de toda la corrida (Rio et al. 2010), sin embargo son alternativas más económicas, que emplean una menor cantidad de reactivos tóxicos y que proveen de buenos resultados cualitativos (Lodhi et al. 2010). Como se observa en la Figura 35, todas las transcripciones fueron exitosas (banda intensa correspondiente a cada

ARN). Sin embargo, para los ARNs virales, se detectó una banda tenue de mayor tamaño aparente, igual en todas las muestras. Es probable que se deba a una estructura secundaria plegada que no pudo ser desnaturalizada con el tratamiento de 1min a 70°C, aún en presencia del buffer de carga de ARN que contiene formamida (agente desnaturalizante). Otros protocolos sugieren tiempos o temperaturas diferentes para desnaturalizar el ARN, como precalentarlo junto al buffer de carga por 10min (Gregg et al. 2004; Lonza Knowledge Center 2010) o aumentar la temperatura a 95°C (Lodhi et al. 2010), modificaciones que pueden considerarse para ensayos futuros.

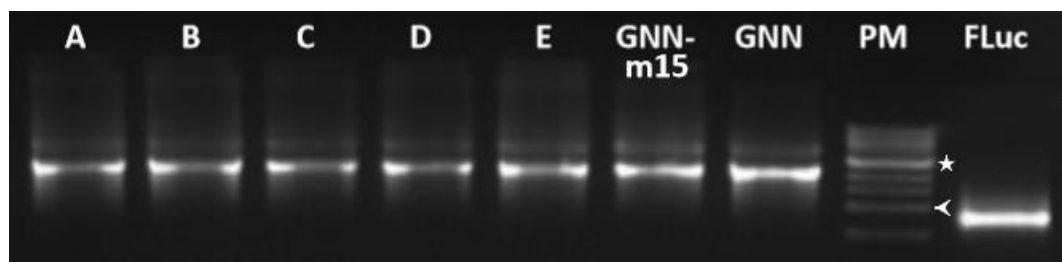


Figura 35. Gel nativo de agarosa al 1% para visualizar la integridad de los ARNs generados *in vitro*. Gel con SYBR Safe incorporado como intercalante. Previo a cargar los ARNs en el gel, 1µg de cada uno fue mezclado con 1X de buffer de carga de ARN, precalentado por 1min a 70°C y enfriado en hielo. Carriles A, B, C, D y E: mutantes del IRES. GNN-m15 corresponde al ARN control dependiente de miR-15, mientras que GNN corresponde al dependiente de miR-122. FLuc refiere al ARN del vector pFLuc:DEST40 utilizado como normalizador. PM: Peso molecular de ADN doble hebra, 1Kb (New England Biolabs). Con una estrella y con una cabeza de flecha se indican las bandas correspondientes a 3Kb y 1Kb, respectivamente.

7.5.3. Puesta a punto de la detección de GLuc a nivel intracelular

Se evaluaron 4 tiempos p.t. diferentes (4h, 6h, 8h y 10h), rango acorde a otros ensayos de traducción de VHC y miR-122 (Henke et al. 2008; Jangra et al. 2010). Como se observa en la Figura 36, la detección de luminiscencia intracelular es máxima a las 4h p.t., y va decayendo gradualmente conforme aumentan las horas.

Es importante mencionar que el control de eficiencia de transfección demostró que ya a las 4h p.t las células se encontraban fluorescentes, indicando que las transfecciones funcionaron correctamente (datos no mostrados).

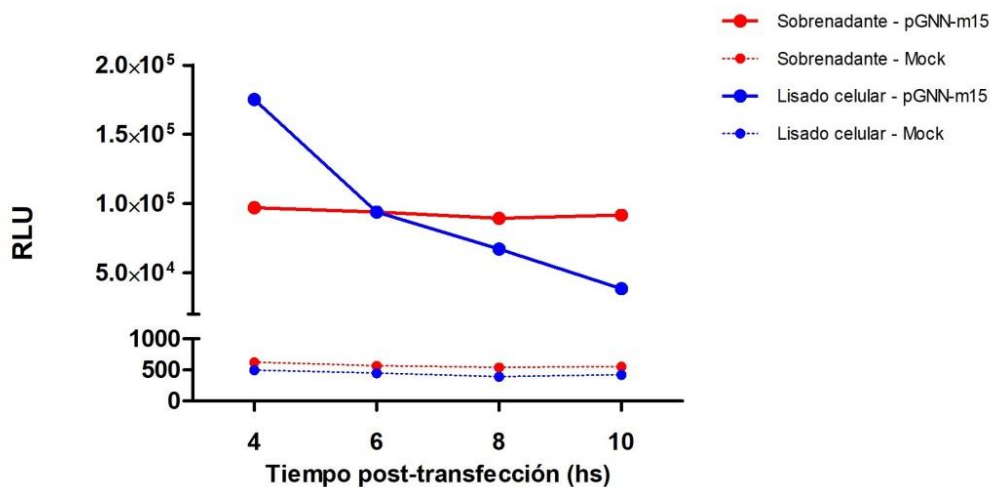


Figura 36. Detección de luminiscencia de GLuc intra y extracelularmente a diferentes tiempos post-transfección del ARN viral reportero. Células Huh7.5 fueron transfectadas con 100ng de ARN viral reportero (pGNN-m15, que codifica para GLuc). A los tiempos indicados, se colectaron los sobrenadantes y se lisaron las células. Se utilizó el sustrato del Renilla Luciferase Assay para detectar la actividad de GLuc en cada una de las muestras, y se cuantificaron las unidades de luz relativas (RLU) con un lector de placas multimodo FLUOstar Omega (BMG Labtech). Resultado de un experimento con tres réplicas técnicas. Gráfica generada con el software GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

7.5.4. Titulación de inhibidores de miRNAs

Una vez determinado el mejor tiempo para la detección de las luciferasas, se prosiguió con la titulación de diferentes cantidades de inhibidores de miR-122 (condición de interés) y de miR-124 (condición control) en las células Huh7.5.

Como era esperable, a bajas concentraciones (≤ 3 nM) de inhibidor de miR-122 (LNA miR-122), los cambios en la eficiencia traduccional de pGNN (evidenciados por la relación GLuc/FLuc, y relativos a la condición sin LNA), son prácticamente imperceptibles (Figura 37). Sin embargo, a 30nM la eficiencia traduccional disminuye un 42%, llegando a 50% con 50nM del LNA; en ambos casos la diferencia respecto a la condición sin LNA es muy notoria. Estos resultados sugerían que la mejor concentración a utilizar sería esta última; no obstante, se notó que no brindaba resultados reproducibles en diferentes réplicas biológicas, y al observar los cultivos cuidadosamente, demostraban condiciones de stress (si bien no se

realizaron ensayos de toxicidad celular, se veían células muertas y con muchos gránulos intracitoplasmáticos).

Por lo antes expuesto, se decidió que la mejor concentración para los ensayos sería 30nM de inhibidor de miR-122, lo cual permitiría observar cambios de eficiencia (si fueran de similar magnitud que los provocados por la unión a los sitios S1 y S2) así como preservar el estado fisiológico de las células.

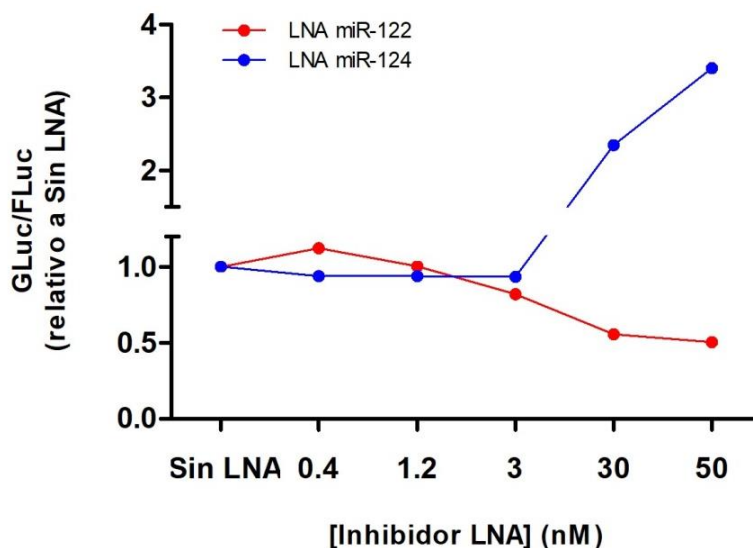


Figura 37. Titulación de diferentes concentraciones de inhibidores de miR-122 y miR-124 en células Huh7.5. Valores de GLuc/FLuc (eficiencia traduccional) a diferentes concentraciones de inhibidores, relativos a la condición sin inhibidor (LNA). En azul se indican las muestras sometidas al LNA de miR-124 (control), mientras que en rojo se indican las sometidas al LNA de miR-122 (de interés). Resultado de un experimento con dos réplicas técnicas. Gráfica generada con el software GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA USA, www.graphpad.com).

Por otra parte, los resultados obtenidos para el inhibidor de miR-124 no fueron los esperados (Figura 37). Este miRNA ha sido frecuentemente utilizado como control porque no parece unirse al genoma de VHC (Scheel et al. 2016), y su secuestro por parte del inhibidor no debería de afectar la eficiencia traduccional viral. Sin embargo, a partir de concentraciones de 30nM o superiores, la eficiencia traduccional aumenta considerablemente (Figura 37). Esto significaría que, o bien la producción de FLuc se ve disminuida a altas concentraciones de LNA, o bien la producción de

GLuc aumenta, y es esta última opción lo que se observó al graficar los datos crudos de unidades relativas de luz (RLU) (Figura suplementaria 9). Aunque no hay reportes similares en la literatura, los trabajos que optaron por miR-124 como control, lo utilizaron suplementándolo ectópicamente (Jangra et al. 2010; Shimakami et al. 2012b; Shimakami et al. 2012a; Conrad et al. 2013; Gerresheim et al. 2017), y no inhibiéndolo, como es el caso de esta tesis, por lo cual las diferencias halladas podrían provenir del empleo de metodologías diferentes para cumplir con objetivos distintos. Sin embargo, Conrad et al. (2013) reportaron que el suplemento ectópico de *mimic* de miR-124 acelera la degradación de un ARN viral reportero, lo cual fue evidenciado por menor bioluminiscencia al transcurrir el tiempo .p.t. Un fenómeno opuesto podría ser el que se refleja con el aumento en la concentración del inhibidor (aunque en este caso no se realizaron ensayos a diferentes tiempos): si el LNA secuestra a miR-124, entonces habría menos degradación del ARN viral reportero, y en consecuencia mayor expresión de GLuc. Desafortunadamente, en esta tesis no se incluyeron ensayos de estabilidad de los ARNs transfectados. Por tanto, en vista de los resultados, se determinó que la concentración del inhibidor de miR-124 a utilizar para los ensayos posteriores fuera 3nM, de manera de evitar cambios no deseados en la expresión de GLuc.

7.5.5. Titulación de *mimic* de miR-122

A continuación se realizó la titulación del *mimic* de miR-122 (condición de interés) en las células Δ miR-122 Huh7.5 transfectadas con el ARN viral reportero pGNN y el ARN de FLuc.

El aporte ectópico del *mimic* de miR-122 notoriamente aumentó la eficiencia traduccional viral (GLuc/FLuc), incluso a bajas concentraciones (Figura 38A). Estos cambios parecen ir en aumento de acuerdo al incremento de la cantidad de miR-122, hasta la concentración de 30nM, donde la eficiencia traduccional parece ser máxima. Considerando que este ensayo se realizó una única vez, era importante analizar los datos crudos de luminiscencia (Figura 38B), para dilucidar el motivo de este comportamiento y seleccionar racionalmente la concentración apropiada para los subsiguientes ensayos. Así se pudo observar que si bien la detección de GLuc

fue consistentemente en aumento, la detección de RLuc pareció poco constante. Dado que los extremos de concentraciones mostraron valores de luminiscencia de FLuc similares, y la eficiencia traduccional era máxima, se decidió en primera instancia utilizar 50nM de análogo de miR-122 para los ensayos posteriores. No obstante, similar a lo sucedido con los inhibidores, a concentraciones elevadas se observaron señales de stress celular, lo cual concuerda con un estudio que ha reportado que concentraciones muy altas de este miRNA suplementado exógenamente, inducen apoptosis celular (Xu et al. 2012). Por tanto, se decidió utilizar la siguiente concentración más baja que resultara confiable, es decir 3nM, ya que 30nM parecía influir negativamente en la expresión de FLuc (si bien es cierto que no se pueden sacar conclusiones con fuerte apoyo, se prefirió trabajar con una concentración más baja para preservar el mejor estadio fisiológico celular posible).

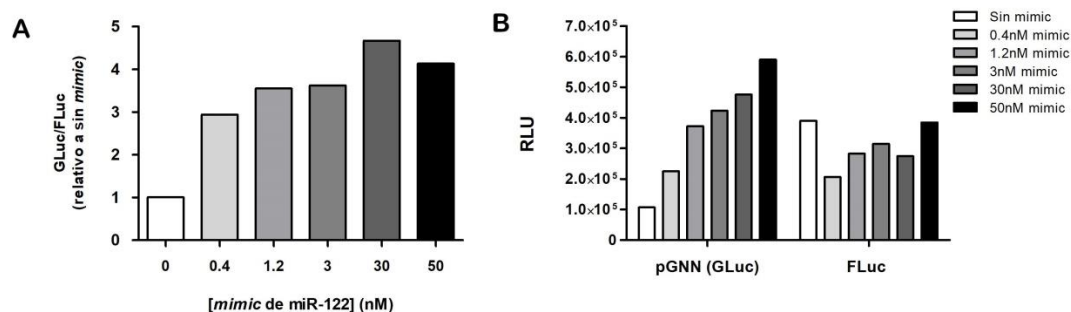


Figura 38. Titulación del análogo de miR-122 (*mimic*) en células Δ miR-122. A) Valores de GLuc/FLuc (eficiencia traduccional) a diferentes concentraciones de *mimic* de miR-122, relativos a la condición sin *mimic*. **B)** Valores crudos de luminiscencia (RLU) emitidos por el ARN viral reportero pGNN (que expresa GLuc) y por el ARN de FLuc. Resultado de un experimento con dos réplicas técnicas. Gráfica generada con el *software* GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

7.5.6. Eficiencia traduccional de los mutantes en el SL IV del IRES

Se utilizó como control el ARN viral pGNN-m15, el cual se tomó como referencia de eficiencia traduccional arbitraria 100% (en la condición sin inhibidor y sin *mimic*). Asimismo, se utilizó el ARN viral reportero dependiente de miR-122 (pGNN) para controlar la actividad de los inhibidores y *mimic* utilizados.

En referencia al uso del control pGNN, como era esperado, se evidenciaron notorias diferencias en la eficiencia traduccional entre las diferentes condiciones ensayadas (sin LNA, con LNA, sin *mimic* y con *mimic*) (Figura 39). No obstante, estas diferencias resultaron estadísticamente significativas únicamente en la línea Δ miR-122 Huh7.5 (Figura 39B), donde, en presencia del *mimic* de miR-122 la eficiencia es casi 5 veces más alta que en las células sin suplementar (2-way ANOVA con corrección de Bonferroni, $p < 0,001$). Esto confirma que miR-122 unido a los sitios S1 y S2 efectivamente estimula la traducción, tal y como fuera reportado anteriormente por varios autores, si bien la mayoría de dichos estudios se realizaron en células que expresan este miRNA, suplementadas además exógenamente (Henke et al. 2008; Jangra et al. 2010; Fehr et al. 2012; Conrad et al. 2013; Nieder-Röhrmann et al. 2017). El hecho de que los ensayos en células Huh7.5 hayan demostrado una disminución en la eficiencia traduccional de este control, pero sin significancia estadística (Figura 39A), refleja que la cantidad de inhibidor de miR-122 utilizado (30nM) no fue suficiente para secuestrar en su totalidad el miR-122 endógeno (similar a lo evidenciado en el ensayo de titulación, ver Figura 37).

Si comparamos los resultados obtenidos en ambos controles (pGNN y pGNN-m15), se pueden apreciar diferencias de eficiencia, donde el control dependiente de miR-15 es menos eficiente que pGNN en células Huh7.5 en ausencia de inhibidor (Figura 39A). Además, es casi tan ineficiente como este último en células *knock-out* para miR-122 en ausencia de *mimic* (Figura 39B). Luna et al. (2015) reportaron previamente que, si bien estas mismas construcciones pero con la polimerasa WT son capaces de replicar eficientemente, los virus m15 demostraron ser levemente atenuados exhibiendo una cinética de replicación retrasada respecto al WT (Luna et al. 2015). Tal vez, la menor eficiencia traduccional demostrada en esta tesis podría dar cuenta de esta atenuación.

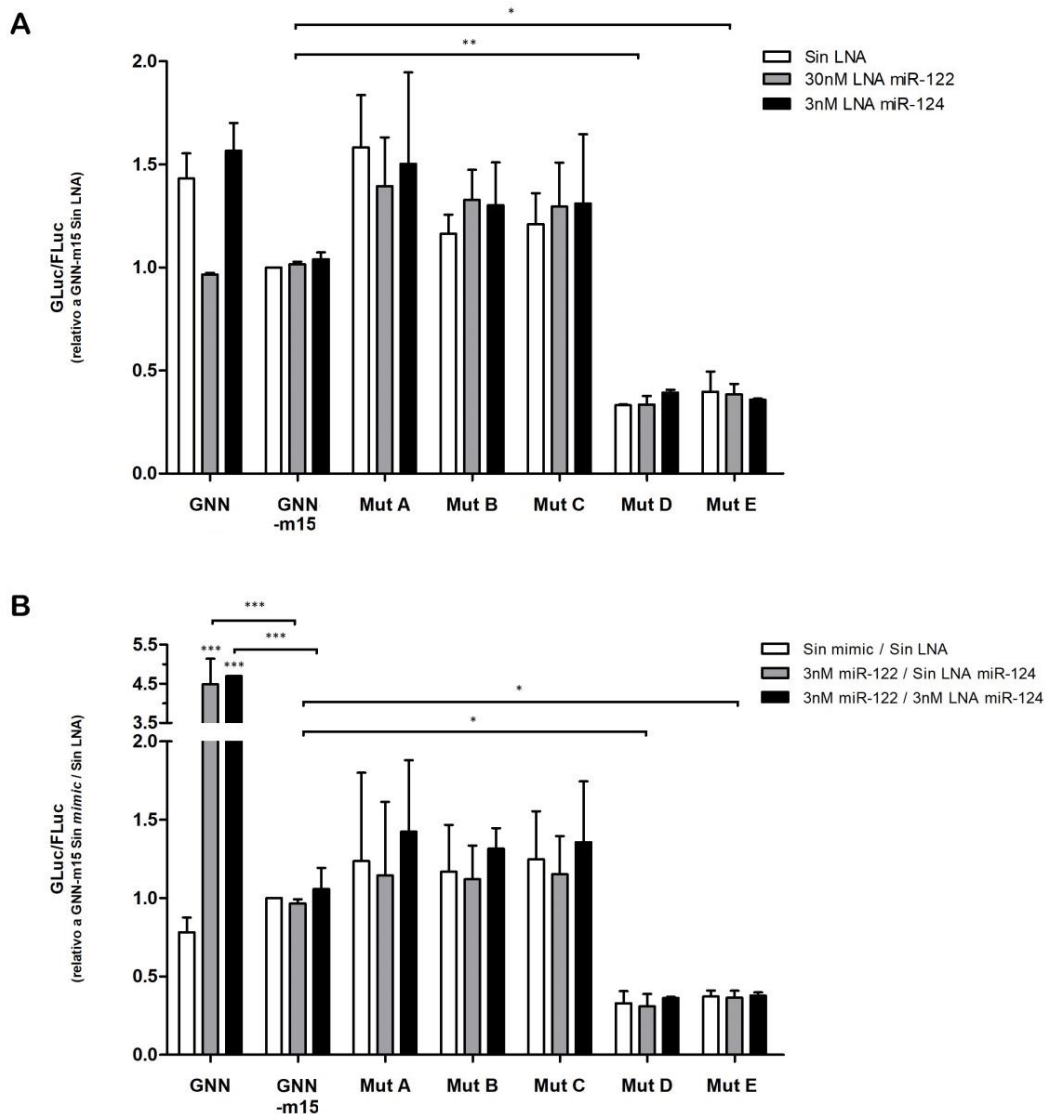


Figura 39. Eficiencias traduccionales de los diferentes mutantes del SL IV del IRES en diferentes condiciones. ARNs reporteros de VHC fueron transfectados en células derivadas de hepatoma humano 24h post-transfección de inhibidores o *mimic* de miR-122 ó miR-124, y a las 4h se midió la luminiscencia en lisados celulares. La eficiencia traduccional se calculó como la relación entre GLuc/FLuc relativo a GNN-m15 en ausencia de LNA y/o mimic. Con asteriscos se indican aquellas condiciones con diferencias significativas (2-way ANOVA, con corrección de Bonferroni: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). **A)** Ensayos en células Huh7.5. Condiciones: sin ningún inhibidor (sin LNA), con 30nM de inhibidor de miR-122 o con 3nM de inhibidor de miR-124 (control). **B)** Ensayos en células Δ miR-122 Huh7.5. Condiciones: sin *mimic* ni LNA, con 3nM de *mimic* de miR-122 (sin inhibidor de miR-124), con 3nM de *mimic* de miR-122 y 3nM de inhibidor de miR-124. Se muestran los promedios \pm los errores estándar de 2-3 experimentos independientes, con dos réplicas técnicas cada uno. Gráficos y análisis estadísticos realizados con el *software* GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

En referencia a los mutantes generados, se esperaba que cada uno exhibiera menor eficiencia traduccional en presencia de miR-122, en comparación con la condición sin este miRNA. Aunque se observó que la capacidad de producir proteínas era diferente entre ellos, desafortunadamente, en ninguno de los experimentos se evidenció diferencias significativas en la eficiencia traduccional de cada mutante entre las diferentes condiciones ensayadas en ninguna de las líneas celulares. Estas observaciones podrían sugerir que, de existir efectivamente este sitio de unión de miR-122 al SL IV del IRES, no estaría modulando negativamente la producción de proteínas. Esta unión putativa, propuesta por Pang et al. (2012) como resultado de experimentos de SHAPE y UV *cross-linking in vitro*, parecía estar apoyada por observaciones de ensayos estándar de AGO-clip en células *knock-out* para Drosha y suplementadas únicamente con miR-122 (Luna et al. 2015). Sin embargo, en este último trabajo, no se verificaba la unión de ese miRNA específico al IRES de VHC. Un año más tarde, Scheel et al. (2016) utilizan la técnica AGO-clip modificada para determinar qué miRNAs específicamente se unen a lo largo del genoma de VHC, y utilizar así los resultados como control en sus experimentos con otros miembros de la familia *Flaviviridae*. Aunque el objetivo del trabajo no se centraba en VHC, los resultados sugerían que efectivamente existe unión entre miR-122 y el IRES, aunque la magnitud de dicha unión parece ser menor al 1% con respecto a la unión a los sitios S1 y S2. Es posible entonces, que la unión no sea óptima debido que no existe una interacción canónica de la semilla y bases auxiliares, y que eso sea lo que haya influido en los resultados obtenidos en los ensayos aquí presentados. Otra posibilidad es que, como no se realizó una titulación de la cantidad óptima de ARN viral a emplear en los ensayos, tal vez 100ng por pocillo (en placa de 48-wells) sea una cantidad no óptima para poder discriminar diferencias sutiles en traducción debidas a la interacción de miR-122 con el SL IV. Esto sería concordante con la magnitud de unión evidenciada por AGO-clip modificado (1% respecto a la unión a los sitios S1 y S2) y con el hecho de que la construcción control pGNN evidenció cambios de eficiencia significativos en el contexto deficiente de miR-122, pero menos notorios en el contexto de las células productoras de este miRNA.

Muy recientemente, Bernier y Sagan (2019), predijeron también, pero por métodos *in silico*, la existencia de un sitio de unión a miR-122 en el IRES, el cual solapa casi en su totalidad con el sitio sugerido anteriormente (Pang et al. 2012). En este trabajo, las autoras muestran que, a diferencia de lo evidenciado en esta tesis, una mutación a nivel del IRES, que presuntamente desestabiliza la unión de miR-122 al SL IV, lleva a reducciones en la expresión de la proteína del core de VHC. Sin embargo, los abordajes experimentales para analizar la contribución de este sitio a la traducción viral fueron diferentes a los empleados en esta tesis. Por una parte, se ensaya únicamente un mutante (diferente a los 5 ensayados en esta tesis). En segundo lugar, la medida de la eficiencia traduccional se realizó mediante el análisis de la producción de la proteína del core 3 días post-electroporación de ARNs virales replicativos no reporteros. Adicionalmente, el mutante del IRES era además miR-122 dependiente en sitios S1 y S2. Finalmente, en sus estudios, en vez de trabajar con inhibidores de miRNAs, lo hicieron suplementando las células Huh7.5 con miR-124 o con un miRNA complementario a la mutación testeada. Sin embargo, ya que las moléculas con mutaciones compensatorias no fueron capaces de restaurar los defectos de traducción a niveles WT, concluyen que estas mutaciones probablemente interrumpen estructuras de ARN o interacciones ARN-proteínas que son importantes para el ciclo viral de VHC, más allá de la interacción directa con miR-122.

Si bien se esperaría que ambos trabajos arribaran a resultados similares, no se puede descartar que los hallazgos contradictorios tengan base en las diferencias experimentales y en los diferentes mutantes estudiados. Principalmente porque los experimentos con vectores replicación competentes mutados en el IRES también demostraron una disminución en la producción de ARN viral (Bernier and Sagan 2019), lo cual directamente estaría afectando la producción proteica debido a una menor disponibilidad de templado para ser traducido, y las investigadoras no normalizan la cantidad de proteína relativa a la cantidad de ARN presente. En esta tesis no fue necesaria dicha normalización ya que se trabajó a tiempos cortos post-transfección y con vectores no replicativos. Por tanto, es posible que la menor

producción del core esté relacionada a la menor capacidad replicativa del virus y no a una menor eficiencia traduccional, y de ser esto así, los resultados no serían contradictorios. Igualmente, para poder realizar comparaciones más acertadas entre ambos trabajos, se deberían continuar los estudios de este capítulo, generando los mutantes A–E en un contexto genómico reportero replicación competente, de manera de tener además de los datos de eficiencia traduccional, también los de replicación.

Por último, analizando la eficiencia traduccional relativa de cada mutante respecto al control pGNN-m15, se puede observar que los mutantes A, B y C no difieren significativamente en su eficiencia. Sin embargo, los mutantes D y E son estadísticamente menos eficientes (muestran una reducción de alrededor de 60% en la capacidad de producir proteínas) (2-way ANOVA con corrección de Bonferroni, $p < 0,001$ y $p < 0,01$) (Figura 39). Lo observado para el mutante E cae dentro de lo esperado ya que éste comprendía todas las combinaciones posibles de cambios en cuatro posiciones simultáneas. Si esas posiciones no presentaran limitaciones evolutivas, no serían tan conservadas en los diferentes genotipos (donde solamente la posición 339 varía) (Figura 31). Por tanto era de suponer que cambios en esos sitios afectarían negativamente la traducción viral, a pesar de no verse afectado el marco de lectura. Sería interesante, sin embargo, analizar en un contexto de genoma completo replicación competente, si alguna de las combinaciones es viable y capaz de producir progenie infecciosa. Esto estaría llevando a que se seleccionen únicamente aquellos mutantes no detrimentales, y luego a partir de ellos se podría volver a realizar los ensayos de eficiencia traduccional en un contexto no replicativo.

Los resultados obtenidos para el mutante D, contrario a lo sucedido con el mutante E, fueron totalmente opuestos a lo esperado, ya que la inserción de 6nt emulaba al mutante p351_6 analizado por Honda, Brown, et al. (1996), y que había revelado ser tan eficiente como el control positivo en producir proteínas, tanto *in vitro* (RRL) como *in vivo* (células Huh-T71). Por tanto cabía preguntarse si la diferencia no estaba determinada por los cambios que distinguen al GT1b del GT2a, cambios que determinaron la identidad de los nucleótidos insertados, y que pudieron derivar en

estructuras secundarias diferentes, que afectasen la unión del ribosoma, y consecuentemente, la eficiencia traduccional.

Es importante resaltar, aunque ya fue oportunamente mencionado, que este capítulo tiene algunas limitaciones experimentales que deberán ser abordadas en el futuro para poder brindarle robustez a los resultados obtenidos. En primer lugar, se deberán realizar ensayos de citotoxicidad de los compuestos empleados (inhibidores y *mimic* de miRNAs) para evaluar que las concentraciones elegidas no sean tóxicas para las células. Diferentes motivos llevaron a que estos ensayos no fueran incluidos durante el desarrollo de estos experimentos (se debe tener presente que se realizaron en el marco de una pasantía de capacitación de tiempo acotado, tanto propio como de quienes fueron mis referentes). Sin embargo, en lo que refiere a las concentraciones empleadas de LNA y *mimic* de miR-122, en el laboratorio de recepción ya se había determinado que no eran tóxicas para las células utilizadas (Luna et al. 2015). Por otra parte, es claro que el control que se empleó (LNA de miR-124) no se comportó de la manera esperable para un control y que lo óptimo hubiera sido inhibir otro miRNA que no modificara la expresión relativa de las construcciones empleadas. Esto hubiese implicado un considerable tiempo de búsqueda bibliográfica y ensayos de titulación de diversos LNAs, tiempo con el cual lamentablemente no se contaba. Sin embargo, se realizaron ensayos con otros dos inhibidores (LNA para miR-193a y miR-320) disponibles en el laboratorio de recepción previo a solicitar el utilizado, pero no sólo rindieron resultados aún menos confiables, sino que la bibliografía disponible indicaba que no habían sido utilizados por otros investigadores para similares fines. De todos modos, para minimizar cualquier efecto que pudiera invalidar los resultados obtenidos, se empleó una concentración de inhibidor de miR-124 que no modificara la expresión de ninguna de las construcciones.

7.5.7. Estudio de la estructura secundaria de los mutantes generados

Los resultados de eficiencia traduccional obtenidos impulsaron la realización de predicciones de estructuras secundarias de ARN, tanto del SL IV del IRES (posiciones 330-353), como del dominio IV conjuntamente con el subdominio IIIf

(posiciones 302-371), con el fin de determinar si la deficiencia en traducción del mutante D podría explicarse por una estructura 2D del ARN más desfavorable.

Al estudiar solamente el SL IV (Figura 40A y B, imágenes superiores), no se observan diferencias importantes entre las estructuras del control (WT) y el mutante D, si bien las regiones simple hebra de los extremos 5' y 3' de este último son más extensas y la probabilidad de apareamiento de bases es menor en algunas posiciones (sobre todo en el tallo). De todos modos, los valores de mínima energía libre (ΔG) son similares, lo cual indica que, al menos *in silico*, las estructuras tendrían termodinámicamente la misma estabilidad.

Como la predicción de este pequeño SL no ayudaba a explicar las diferencias en eficiencia, se analizó una región más extensa, estrategia que claramente demuestra que la estructura cambia considerablemente (Figura 40A y B, imágenes inferiores). Si bien el ΔG parece ser mayor, lo que indica más estabilidad, sorprende la estructura completamente diferente al WT o los mutantes A, B y C. El mutante D parece no mantener el SL IV donde se encuentra el codón AUG en simple hebra, sino que queda en una estructura de horquilla con la G formando parte de un tallo. Este cambio radical podría ser la causa de la menor eficiencia traduccional ya que esta estructura no sería la óptima para reclutar correctamente al ribosoma. Si bien en la predicción estructural no se incluyeron todas las posiciones que conforman el *pseudoknot* central del IRES (base de los subdominios IIIe-f), es esperable que los cambios introducidos por los 6nt insertados, generen también una reestructuración de este arreglo, el cual es fundamental para presentar el dominio IV a la hendidura de unión del ARNm en la subunidad ribosomal 40S (Berry et al. 2011).

Igualmente, luego de que las predicciones ayudaran a hipotetizar la causa de la deficiencia traduccional, persistía la interrogante respecto a la diferencia exhibida con el mutante p351_6 (Honda et al. 1996a), ya que si la inserción era la causante de una estructura no óptima, dicho mutante debería de haber sido ineficiente también. Sin embargo, como ya se mencionó, un nucleótido de los insertados era diferente, y así también lo era la sexta posición del ORF, haciendo que existieran dos sitios diferentes entre el mutante D (GT2a) y p351_6 (GT1b). Por tanto, se

decidió modelar la estructura de este último, y sorprendentemente, se ajusta mucho más a la del WT que a la del mutante D (Figura 40C). Si bien los ΔG varían respecto al WT, en la estructura que contiene al subdominio IIIf se puede observar el mantenimiento del SL IV donde se encuentra el codón inicio, y también la conservación del otro *stem-loop*. Por tanto, este arreglo 2D, parece ser más consistente con los resultados de producción proteica reportados (Honda et al. 1996a) y podría ser la causa de la diferencia encontrada con el mutante D en esta tesis. No obstante, no pueden descartarse que las diferencias metodológicas no hayan influido también.

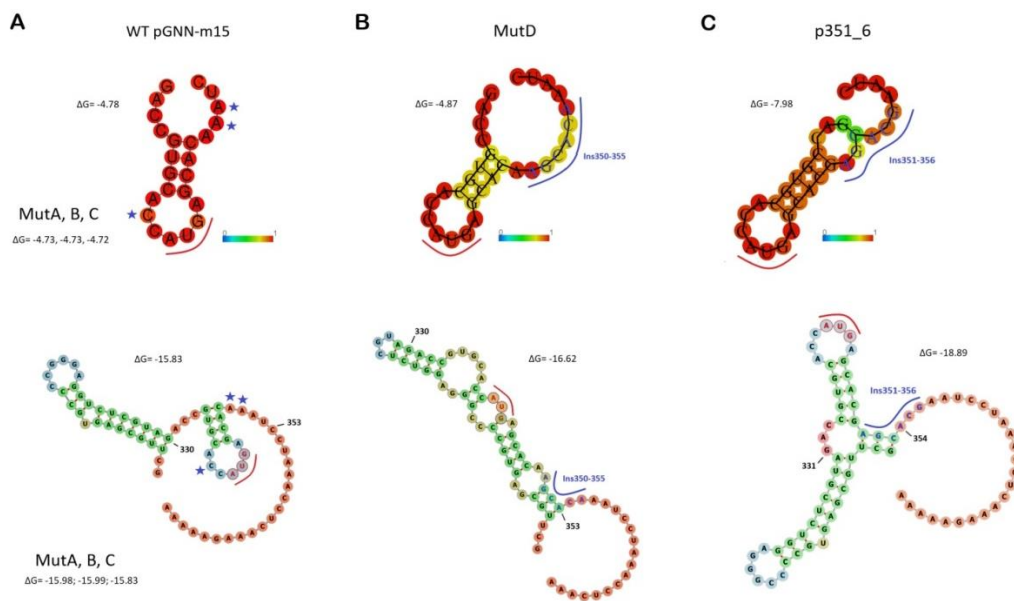


Figura 40. Predicción de estructuras secundarias de diferentes regiones del IRES de los mutantes de VHC. Estructuras secundarias generadas con el RNAfold WebServer (disponible en <http://rna.tbi.univie.ac.at/>) (Gruber et al. 2008). Se muestran las estructuras secundarias de la secuencia control pGNN-m15 (A), del Mutante D (B) y del mutante p351_6 de Honda, Brown y Lemon (1996) (C). En las imágenes superiores se esquematizan los SL IV (posiciones 330-353) (con diferentes colores se indican las probabilidades de apareamiento de bases); mientras que en las imágenes inferiores se esquematizan las estructuras correspondientes al subdominio IIIf y al SL IV conjuntamente (posiciones 302-371). Estas últimas estructuras fueron visualizadas con el Forna Package (Gendron et al. 2001), y los nucleótidos se encuentran coloreados de acuerdo al tipo de estructura en la que se encuentren (verde - tallos; mostaza - bucles internos; azul – bucles de horquillas; anaranjado – regiones 5' y 3' no pareadas). Las estructuras correspondientes a pGNN-m15 son ejemplo también de los mutantes A, B y C que rindieron predicciones similares. Pero se indican con estrellas azules las posiciones que cambian en dichos mutantes. En B y C se señalan en azul los 6 nucleótidos insertados. En todas las imágenes se indica con una línea roja el codón inicio AUG. También se muestran los valores de mínima energía libre de cada estructura (ΔG).

7.6. Conclusiones

- Se construyeron 5 mutantes diferentes para intentar desestabilizar o hacer más fuerte la unión putativa entre miR-122 y el IRES de VHC, y se ensayaron en células derivadas de hepatoma humano con o sin la capacidad de producir miR-122 endógeno.
- No fue posible confirmar la hipótesis de que dicha interacción estaría afectando negativamente la eficiencia traduccional viral, ya que sin importar cuáles fueron las condiciones empleadas (con o sin inhibidor de miRNA, con o son *mimic* de miR-122), no se detectaron diferencias significativas en la producción de luciferasa.
- Sin embargo, los mutantes generados exhibieron diferencias en la eficiencia traduccional, y particularmente dos de ellos (mutantes D y E) fueron significativamente menos eficientes que el control.
- El mutante D probablemente deba su fenotipo a una estructura secundaria subóptima que podría interferir con el posicionamiento del ribosoma.
- El mutante E, al contener 4 sitios mutados al azar, estaba conformado por un gran número de combinaciones de secuencia, la mayoría de las cuales posiblemente fueran perjudiciales.
- En suma, con los mutantes que se diseñaron y con las condiciones ensayadas, no pudo evidenciarse funcionalmente la interacción entre miR-122 y el SL IV del IRES de VHC.

8. CONCLUSIONES FINALES

Genotipificación de cepas de VHC a estudiar:

- Por métodos filogenéticos se logró determinar el genotipo de 55 aislamientos uruguayos de VHC provenientes de pacientes con infección crónica. La mayoría pertenece al GT1 (89,1%), siendo el subtipo 1a más frecuente que el 1b.
- Se detectó un alto porcentaje de muestras erróneamente subtipificadas mediante kits comerciales o la técnica de PCR-RFLP de la región 5'NCR (21,8%).

Polimorfismos del gen *IFN-λ-4* en población uruguaya:

- Los genotipos desfavorables de rs12979860 (CT/TT) se encontraron en mayor prevalencia dentro de la población infectada con VHC (70,5%) en comparación con la población no infectada (54,4%).
- La distribución genotípica y alélica se asemeja a la descrita para poblaciones mixtas, más que a poblaciones descendientes de europeos.
- No se encontró asociación entre estos SNPs y la respuesta a la biterapia en la cohorte de pacientes uruguayos incluida en esta tesis.

Análisis de la región NS3 y búsqueda de RASs a IPs y otras sustituciones:

- La frecuencia de RASs a IPs en pacientes *naïve* a DAAs infectados con el GT1 fue de 34,4%. La distribución de RASs, difiere a la reportada en países vecinos: la frecuencia de la RAS Q80K dentro del GT1a es de 15,0% en Uruguay mientras que es poco frecuente en Brasil y Argentina.
- A nivel de secuencias consensos se hallaron variadas RAPs y sustituciones emergentes al tratamiento con PTV, así como cambios en sitios de unión con el co-factor NS4A y con la enzima celular A3G. Sin embargo se constató una gran conservación de la tríada catalítica y de AA de unión al Zn^{2+} .
- A nivel de datos de secuenciación masiva se encontró un bajo número de RASs como variantes minoritarias, aunque los AA de la tríada catalítica y de unión al

Zn²⁺ así como las regiones de interacción con NS4A y A3G mostraron ser más variables.

Estudio de variantes naturales del IRES y su eficiencia traduccional:

- La mayoría de las mutaciones identificadas se localizan en los dominios II y III del IRES y no parecen afectar la estructura secundaria.
- Se evidenció la existencia de variantes ineficientes traduccionalmente tanto en secuencias mayoritarias como en subpoblaciones de la cuasiespecie. Algunas mutaciones puntuales serían responsables de estos fenotipos; en otros casos se observa compensación de mutaciones, evidenciando posibles efectos epistáticos.
- Los estudios de secuenciación masiva revelaron la existencia de posibles infecciones mixtas con genotipos de baja frecuencia.

Caracterización de la unión entre miR-122 y el IRES de VHC:

- Con los mutantes que se diseñaron y con las condiciones ensayadas, no se evidenció funcionalmente la interacción entre miR-122 y el SL IV del IRES de VHC.
- Se identificaron dos mutantes a nivel de esta región que resultaron ser significativamente ineficientes, independientemente de la presencia de este miRNA.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en revistas de arbitraje internacional:

Echeverría et al. (2016). Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: Their relevance for developing countries. Virus Research, 223, 140–146. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.07.008

Echeverría et al. (2018). IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients. Virology Journal, 15(1), 40. DOI: 10.1186/s12985-018-0946-2

Finalmente, esta tesis permitió profundizar sobre aspectos poco explorados sobre VHC en Uruguay, tales como el análisis de diferentes factores del hospedero y del virus, asociados a la respuesta a la terapia. Asimismo, esta tesis fundó una nueva línea de investigación sobre la biología traduccional de VHC y dió el puntapié para comenzar con estudios funcionales con clones infecciosos de este virus, los cuales se han comenzado a transferir a nuestro laboratorio de forma exitosa.

9. PERSPECTIVAS

El desarrollo de esta tesis ha impulsado la planificación de experimentos adicionales que ayudarán a explicar mejor algunos de los resultados aquí expuestos:

- Ensayos de eficiencia traduccional *ex vivo* a partir de los ARNs bicistrónicos de los IRES ineficientes para corroborar si las deficiencias evidenciadas *in vitro*, se constatan en cultivo de células derivadas de hepatoma humano, o si hay diferencias que apoyen la propuesta de que diferentes ITAFs podrían influenciar el proceso de iniciación.
- Ensayos de eficiencia de estas variantes en clones de genoma completo de VHC para evaluar estas variantes en un contexto viral que recapitule de mejor manera una infección natural. Por una parte se diseñarán vectores reporteros (que permitan el análisis de la eficiencia traduccional) y por otra parte vectores no reporteros que al transcribirse y transfectarse en células Huh7.5 producen viriones que se asemejan a los que se generan en infecciones clínicas. Estos últimos permitirán el análisis de la capacidad replicativa. Para abordar estos experimentos, se debió comenzar con la generación de clones quimeras que incluyeran el IRES de los genotipos de interés (1a y 3a) en el *backbone* de GT2a, que es el clon infeccioso por excelencia. Algunos de estas construcciones quimeras ya han sido generadas por overlap-PCR y se ha verificado su capacidad replicativa por FACS (del inglés: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) e inmunofluorescencia (datos no mostrados).
- Estudios de interacción IRES-subunidad ribosomal 40S utilizando los IRES ineficientes, como una primera aproximación a identificar el mecanismo molecular que pueda explicar la causa de los fenotipos observados. Estos estudios se abordarán mediante ensayos biofísicos de calorimetría de titulación isotérmica.
- PCRs genotipo-específicas para confirmar la presencia de infecciones mixtas en las muestras sospechosas por NGS.

Por último, esta tesis condujo a la reciente obtención de un proyecto CSIC I+D del cual soy responsable. A través de éste serán llevados a cabo gran parte de los estudios propuestos.

10. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS

- AASLD-IDSA (2018) HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. <https://www.hcvguidelines.org/evaluate/monitoring>. Accessed 20 Jan 2019
- AbbVie Inc (2014) Viekira Pak - Prescribing Information. 1–18.
- About F, Oudot-Mellakh T, Niay J, et al (2015) Impact of IL28B, APOH and ITPA polymorphisms on efficacy and safety of TVRor BOC-based triple therapy in treatment-experienced HCV-1 patients with compensated cirrhosis from the ANRS CO20-CUPIC study. *PLoS One* 10:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0145105
- Afgan E, Baker D, Batut B, et al (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gky379
- Ahmed A, Felmlee DJ (2015) Mechanisms of hepatitis C viral resistance to direct acting antivirals. *Viruses* 7:6716–6729. doi: 10.3390/v7122968
- Akaberli D, Bergfors A, Kjellin M, et al (2018) Baseline dasabuvir resistance in Hepatitis C virus from the genotypes 1, 2 and 3 and modeling of the NS5B-dasabuvir complex by the in silico approach. *Infect Ecol Epidemiol*. doi: 10.1080/20008686.2018.1528117
- Akuta N, Sezaki H, Suzuki F, et al (2017) Retreatment efficacy and predictors of ledipasvir plus sofosbuvir to HCV genotype 1 in Japan. *J Med Virol* 89:284–290. doi: 10.1002/jmv.24617
- Aldunate F, Echeverría N, Chiodi D, et al (2018) Pretreatment Hepatitis C virus NS5A/NS5B resistance associated substitutions in genotype 1 Uruguayan infected patients. *Dis Markers* 2018:1–9. doi: 10.1155/2018/2514901
- Alves R, Queiroz ATL, Pessoa MG, et al (2013) The presence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in Hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. *J Viral Hepat* 20:414–421. doi: 10.1111/jvh.12051
- André P, Komurian-pradel F, Deforges S, et al (2002) Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J Virol* 76:6919–6928. doi: 10.1128/JVI.76.14.6919
- Andrews S (2010) FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. In: Available at <http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc/>.
- Angulo J, Pino K, Pavez C, et al (2013) Genetic variations in host IL28B links to the detection of peripheral blood mononuclear cells-associated hepatitis C virus RNA in chronically infected patients. *J Viral Hepat* 20:263–272. doi: 10.1111/jvh.12076
- Angulo J, Ulryck N, Deforges J, et al (2016) LOOP IIIId of the HCV IRES is essential for the structural rearrangement of the 40S-HCV IRES complex. *Nucleic Acids Res* 44:1309–25. doi: 10.1093/nar/gkv1325
- Appel N, Zayas M, Miller S, et al (2008) Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathog* 4:e1000035. doi: 10.1371/journal.ppat.1000035
- Arias A, Aguilera A, Soriano V, et al (2017) Rate and predictors of treatment failure to all-oral HCV regimens outside clinical trials. *Antivir Ther* 22:307–312. doi: 10.3851/IMP3061
- Arocena F (2009) How immigrants have shaped Uruguay. *Culturales* 5:105–140.
- Ashraf A, Chakravarti A, Roy P, et al (2016) Frequency of nucleotide sequence variations in the internal ribosome entry site region of hepatitis C virus RNA isolated from responding and non-responding patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. *VirusDisease* 27:251–259. doi: 10.1007/s13337-016-0335-7
- Asselah T (2013) ABT-450 combined with ritonavir, in addition to ABT-333 and ribavirin: A race for an interferon-free regimen to cure HCV infection. *J Hepatol* 59:885–888. doi: 10.1016/j.jhep.2013.05.020
- Azzari C, Resti M, Moriondo M, et al (2000) Vertical transmission of HCV is related to maternal peripheral blood mononuclear cell infection. *Blood* 96:2045–2048.
- Bae A, Sun SC, Qi X, et al (2010) Susceptibility of treatment-naive hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. doi: 10.1128/AAC.00777-10
- Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB (2015) MiR-122 - A key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol* 62:448–457. doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.004
- Baré P (2009) Hepatitis C virus and peripheral blood mononuclear cell reservoirs. *World J Hepatol* 1:67. doi: 10.4254/wjh.v1.i1.67

- Barnard RJO, McHale CM, Newhard W, et al (2013) Emergence of resistance-associated variants after failed triple therapy with vaniprevir in treatment-experienced non-cirrhotic patients with hepatitis C-genotype 1 infection: A population and clonal analysis. *Virology* 443:278–284. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.013
- Barreiro P, Vispo E, Poveda E, et al (2013) Hepatitis C therapy: highlights from the 2012 annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. *Clin Infect Dis* 56:560–6. doi: 10.1093/cid/cis915
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457
- Barría MI, González A, Vera-Otarola J, et al (2009) Analysis of natural variants of the hepatitis C virus internal ribosome entry site reveals that primary sequence plays a key role in cap-independent translation. *Nucleic Acids Res* 37:957–71. doi: 10.1093/nar/gkn1022
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215–33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002
- Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J, et al (2018) Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: Considerations for scientists and funding agencies. *Virus Res* 248:53–62. doi: 10.1016/j.virusres.2018.02.016
- Bartenschlager R, Lohmann V (2000) Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81:1631–48. doi: 10.1099/0022-1317-81-7-1631
- Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F (2013) The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* 11:482–96. doi: 10.1038/nrmicro3046
- Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P (2011) Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19:95–103. doi: 10.1016/j.tim.2010.11.005
- Baumert TF, Fauvelle C, Chen DY, Lauer GM (2014) A prophylactic hepatitis C virus vaccine: A distant peak still worth climbing. *J Hepatol* 61:S34–S44. doi: 10.1016/j.jhep.2014.09.009
- Behrens S-E, Tomei L, De Francesco R (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15:12–22. doi: 10.1177/0093854815604178
- Benhammou JN, Dong TS, May FP, et al (2018) Race affects SVR12 in a large and ethnically diverse hepatitis C-infected patient population following treatment with direct-acting antivirals: Analysis of a single-center Department of Veterans Affairs cohort. *Pharmacol Res Perspect* 6:1–7. doi: 10.1002/prp2.379
- Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ (2014) Vertical transmission of hepatitis C virus: Systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 59:765–773. doi: 10.1093/cid/ciu447
- Bentham MJ, Foster TL, 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. *J Gen Virol* 94:2236–48. doi: 10.1099/vir.0.054338-0
- Berger C, Romero-Brey I, Radujkovic D, et al (2014) Daclatasvir-Like Inhibitors of NS5A Block Early Biogenesis of Hepatitis C Virus-Induced Membranous Replication Factories, Independent of RNA Replication. *Gastroenterology* 147:1094–1105.e25. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.019
- Bernier A, Sagan SM (2019) Beyond sites 1 and 2, miR-122 target sites in the HCV genome have negligible contributions to HCV RNA accumulation in cell culture. *J Gen Virol* 1–10. doi: 10.1099/jgv.0.001217
- Berry KE, Waghray S, Doudna J a (2010) The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit. *RNA* 16:1559–1569. doi: 10.1261/rna.2197210
- Berry KE, Waghray S, Mortimer SA, et al (2011) Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning. *Structure* 19:1456–1466. doi: 10.1016/j.str.2011.08.002
- Bertol BC, Moreira S, Garcia RFL, et al (2015) IL28B gene polymorphisms in mono- and HIV-coinfected chronic hepatitis C patients. *Front Microbiol* 6:1–8. doi: 10.3389/fmicb.2015.00153
- Bertoli A, Sorbo MC, Aragri M, et al (2018) Prevalence of Single and Multiple Natural NS3, NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus Genotypes 1–4 in Italy. *Sci Rep* 8:8988. doi: 10.1038/s41598-018-26862-y
- Besse B, Coste-Burel M, Bourgeois N, et al (2012) Genotyping and resistance profile of hepatitis C (HCV) genotypes 1-6 by sequencing the NS3 protease region using a single optimized sensitive method. *J Virol Methods*. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.06.011
- Biebricher CK, Eigen M (2005) The error threshold. *Virus Res* 107:117–127. doi: 10.1016/j.virusres.2004.11.002
- Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE (2006) Extrahepatic replication of HCV: Insights into clinical

- manifestations and biological consequences. *Hepatology* 44:15–22. doi: 10.1002/hep.21283
- Blackard JT, Kong L, Lombardi A, et al (2017) A preliminary analysis of hepatitis C virus in pancreatic islet cells. *Virology* 14:1–10. doi: 10.1186/s12985-017-0905-3
- Blight KJ, McKeating JA, Rice CM (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76:13001–14. doi: 10.1128/JVI.76.24.13001–13014.2002
- Boesecke C, Wasmuth J-C (2012) Epidemiology, Transmission and Natural History. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, et al. (eds) *Short Guide to Hepatitis C*. Flying Publisher, Germany, pp 15–18
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, et al (2018) Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis* 218:1722–1729. doi: 10.1093/infdis/jiy401
- Brass V, Berke JM, Montserret R, et al (2008) Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14545–50. doi: 10.1073/pnas.0807298105
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol* 3:e85. doi: 10.1371/journal.pbio.0030085
- Bristol-Myers Squibb (2016) Sunvepra (Asunaprevir) - Prescribing information. 1–14.
- Bukh J (2016) The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol* 65:S2–S21. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.035
- Bukh J, Purcell RH, Miller RH (1992) Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4942–6. doi: 10.1073/pnas.89.11.4942
- Bukowska-Oško I, Perlejewski K, Caraballo Cortés K, et al (2018) Next-generation sequencing analysis of new genotypes appearing during antiviral treatment of chronic hepatitis C reveals that these are selected from pre-existing minor strains. *J Gen Virol* 99:1633–1642. doi: 10.1099/jgv.0.001160
- Buratti E, Gerotto M, Pontisso P, et al (1997) In vivo translational efficiency of different hepatitis C virus 5'-UTRs. *FEBS Lett* 411:275–280. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00715-1
- Burra P, Burroughs A, Graziadei I, et al (2016) EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation. *J Hepatol*. doi: 10.1016/j.jhep.2015.10.006
- Cáceres CJ, Angulo J, Lowy F, et al (2018) Non-canonical translation initiation of the spliced mRNA encoding the human T-cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper protein. *Nucleic Acids Res* 46:11030–11047. doi: 10.1093/nar/gky802
- Calisti G, Tavares A, Macartney MJ, et al (2015) IL28B genotype predicts response to chronic hepatitis C triple therapy with telaprevir or boceprevir in treatment naïve and treatment-experienced patients other than prior partial- and null-responders. *Springerplus* 4:357. doi: 10.1186/s40064-015-1137-x
- Cantaloube J-F, Gallian P, Attoui H, et al (2005) Genotype distribution and molecular epidemiology of hepatitis C virus in blood donors from southeast France. *J Clin Microbiol* 43:3624–9. doi: 10.1128/JCM.43.8.3624-3629.2005
- Cantaloube J-F, Laperche S, Gallian P, et al (2006) Analysis of the 5' noncoding region versus the NS5b region in genotyping hepatitis C virus isolates from blood donors in France. *J Clin Microbiol* 44:2051–2056. doi: 10.1128/JCM.02463-05
- Carvajal F, Vallejos M, Walters B, et al (2016) Structural domains within the HIV-1 mRNA and the ribosomal protein S25 influence cap-independent translation initiation. *FEBS J* 283:2508–2527. doi: 10.1111/febs.13756
- Castells M, Bello G, Ifrán S, et al (2015) Epidemic history of major genotypes of hepatitis C virus in Uruguay. *Infect Genet Evol* 32:231–238. doi: 10.1016/j.meegid.2015.03.021
- Catanese MT, Uryu K, Kopp M, et al (2013) Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci* 110:9505–9510. doi: 10.1073/pnas.1307527110
- Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo ALD, et al (2012) IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver Int* 32:476–486. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02653.x
- Ceccherini-Silberstein F, Cento V, Di Maio VC, et al (2018) Viral resistance in HCV infection. *Curr Opin Virol* 32:115–127. doi: 10.1016/j.coviro.2018.10.005
- Chen Z, Li H, Ren H, Hu P (2016) Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Sci Rep* 6:20310. doi: 10.1038/srep20310

- Chen Z, Weck KE (2002) Hepatitis C virus genotyping: Interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol* 40:3127–3134. doi: 10.1128/JCM.40.9.3127-3134.2002
- Chevaliez S, Bouvier-alias M, Brillet R, Pawlotsky J (2009) Hepatitis C Virus (HCV) Genotype 1 Subtype Identification in New HCV Drug Development and Future Clinical Practice. *PLoS One* 4:e8209. doi: 10.1371/journal.pone.0008209
- Childs-Kean LM, Hong J (2017) Detectable Viremia at the End of Treatment With Direct-Acting Antivirals Can Be Associated With Subsequent Clinical Cure in Patients With Chronic Hepatitis C: A Case Series. *Gastroenterology* 153:1165–1166. doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.062
- Cholankeril G, Ahmed A (2018) Alcoholic Liver Disease Replaces Hepatitis C Virus Infection as the Leading Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 16:1356–1358. doi: 10.1016/j.cgh.2017.11.045
- Chueca N, Rivadulla I, Lovatti R, et al (2016) Using NS5B sequencing for hepatitis C virus genotyping reveals discordances with commercial platforms. *PLoS One* 11:6–13. doi: 10.1371/journal.pone.0153754
- Chusri P, Kumthip K, Pantip C, et al (2015) Influence of amino acid variations in the NS3, NS4A and NS4B of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b and 6f on the response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy. *Virus Res* 196:37–43. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.003
- Cieśla A, Bociaga-Jasik M, Sobczyk-Krupiarz I, et al (2012) IL28B polymorphism as a predictor of antiviral response in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. doi: 10.3748/wjg.v18.i35.4892
- Clarke GM, Anderson C a, Pettersson FH, et al (2011) Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc* 6:121–33. doi: 10.1038/nprot.2010.182
- Colina R, Azambuja C, Uriarte R, et al (1999) Evidence of increasing diversification of hepatitis C viruses. *J Gen Virol* 80:1377–1382.
- Colina R, Mogdasy MC, Cristina J, Uriarte M del R (2002) Caracterización molecular del virus de la hepatitis C en Montevideo-Uruguay. *Rev Médica del Uruguay* 18:76–82.
- Collier AJ, Tang S, Elliott RM (1998) Translation efficiencies of the 5' untranslated region from representatives of the six major genotypes of hepatitis C virus using a novel bicistronic reporter assay system. *J Gen Virol* 79:2359–2366. doi: 10.1099/0022-1317-79-10-2359
- Conrad KD, Giering F, Erfurth C, et al (2013) microRNA-122 Dependent Binding of Ago2 Protein to Hepatitis C Virus RNA Is Associated with Enhanced RNA Stability and Translation Stimulation. *PLoS One* 8:e56272. doi: 10.1371/journal.pone.0056272
- Contreras AM, Hiasa Y, He W, et al (2002) Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol* 76:8505–17. doi: 10.1128/JVI.76.17.8505
- Coppola N, De Pascalis S, Onorato L, et al (2016) Hepatitis B virus and hepatitis C virus infection in healthcare workers. *World J Hepatol* 8:273–281. doi: 10.4254/wjh.v8.i5.273
- Cornberg M, Hardtke S, Port K, et al (2012) Hepatitis C Standard of Care. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, et al. (eds) *Short Guide to Hepatitis C*. Flying Publisher, pp 34–57
- Crouchet E, Wrensch F, Schuster C, et al (2018) Host-targeting therapies for hepatitis C virus infection: current developments and future applications. *Therap Adv Gastroenterol* 11:175628481875948. doi: 10.1177/1756284818759483
- Cullen BR (2006) Role and Mechanism of Action of the APOBEC3 Family of Antiretroviral Resistance Factors. *J Virol* 80:1067–1076. doi: 10.1128/JVI.80.3.1067-1076.2006
- D'Offizi G, Cammà C, Taibi C, et al (2017) Clinical and virological predictors of sustained response with an interferon-based simeprevir regimen for patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *New Microbiol* 40:19–26.
- Daniel HDJ, David J, Raghuraman S, et al (2017) Comparison of Three Different Hepatitis C Virus Genotyping Methods: 5'NCR PCR-RFLP, Core Type-Specific PCR, and NS5b Sequencing in a Tertiary Care Hospital in South India. *J Clin Lab Anal*. doi: 10.1002/jcla.22045
- de Carvalho IMVG, Alves R, de Souza PAVM, et al (2014) Protease inhibitor resistance mutations in untreated Brazilian patients infected with HCV: novel insights about targeted genotyping approaches. *J Med Virol* 86:1714–1721. doi: 10.1002/jmv.24015
- De Luca A, Di Giambenedetto S, Lo Presti A, et al (2015) Two Distinct Hepatitis C Virus Genotype 1a Clades Have Different Geographical Distribution and Association With Natural Resistance to NS3 Protease Inhibitors. *Open Forum Infect Dis* 2:ofv043-ofv043. doi: 10.1093/ofid/ofv043
- de Seixas Santos Natri AC, de Mello Malta F, Diniz MAMA, et al (2016) Association of IFNL3 and

- IFNL4 polymorphisms with hepatitis C virus infection in a population from southeastern Brazil. *Arch Virol* 161:1477–1484. doi: 10.1007/s00705-016-2809-8
- Debes JD, Chan AJ, Balderramo D, et al (2018) Hepatocellular carcinoma in South America: Evaluation of risk factors, demographics and therapy. *Liver Int* 38:136–143. doi: 10.1111/liv.13502
- Degasperi E, Viganò M, Aghemo A, et al (2013) PegIFN- α 2a for the treatment of chronic hepatitis B and C: a 10-year history. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11:459–474. doi: 10.1586/eri.13.37
- del Campo JA, Parra-Sánchez M, Figueruela B, et al (2018) Hepatitis C virus deep sequencing for sub-genotype identification in mixed infections: A real-life experience. *Int J Infect Dis* 67:114–117. doi: 10.1016/j.ijid.2017.12.016
- Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, et al (1989) Recombinant Interferon Alfa Therapy for Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med* 321:1506–1510. doi: 10.1056/NEJM198911303212204
- di Filippo D, Cortes-Mancera F, Beltran M, et al (2012) Molecular characterization of hepatitis c virus in multi-transfused Colombian patients. *Virology* 9:242. doi: 10.1186/1743-422X-9-242
- Di Maio VC, Cento V, Di Paolo D, et al (2016) HCV NS3 sequencing as a reliable and clinically useful tool for the assessment of genotype and resistance mutations for clinical samples with different HCV-RNA levels. *J Antimicrob Chemother* 71:739–750. doi: 10.1093/jac/dkv403
- División Epidemiología - DGS - MSP (2016) Boletín Epidemiológico. Montevideo
- Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, et al (1998) Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 4:521–527.
- Domingo E, Sheldon J, Perales C (2012) Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:159–216. doi: 10.1128/MMBR.05023-11
- Dong ZX, Zhou HJ, Xiang XG, et al (2015) IL28B genetic variations are associated with treatment response of patients with chronic hepatitis C in a Chinese Han population. *J Dig Dis* 16:90–7. doi: 10.1111/1751-2980.12202
- Du T, Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132:4645–4652. doi: 10.1242/dev.02070
- Dubuisson J (2007) Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13:2406–2415. doi: 10.3748/wjg.v13.i17.2406
- Durand T, Di Liberto G, Colman H, et al (2010) Occult infection of peripheral B cells by hepatitis C variants which have low translational efficiency in cultured hepatocytes. *Gut* 59:934–42. doi: 10.1136/gut.2009.192088
- Dusheiko G (1997) Side effects of alpha interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 26:112S–121S. doi: 10.1002/hep.510260720
- Dvory-Sobol H, Han B, Lu J, et al (2017) Susceptibility to Voxilaprevir of NS3 Resistance-Associated Substitutions and Clinical Isolates From Direct-Acting Antiviral-Experienced and -Naïve Patients.
- Echeverría N, Betancour G, Gámbaro F, et al (2016) Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: Their relevance for developing countries. *Virus Res* 223:140–146. doi: 10.1016/j.virusres.2016.07.008
- Echeverría N, Chiodi D, López P, et al (2018) IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients. *Virology* 15:40. doi: 10.1186/s12985-018-0946-2
- Echeverría N, Moratorio G, Cristina J, Moreno P (2015) Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J Hepatol* 7:831–845. doi: 10.4254/wjh.v7.i6.831
- Eigen M (2002) Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc Natl Acad Sci.* doi: 10.1073/pnas.212514799
- Einav S, Gerber D, Bryson PD, et al (2008) Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat Biotechnol* 26:1019–1027. doi: 10.1038/nbt.1490
- Erard-Poinsot D, Scholtès C, Billoud C, et al (2018) Very late relapse of hepatitis C virus infection immediately after liver transplant. *Am J Transplant* 18:2587–2590. doi: 10.1111/ajt.14965
- Esposito I, Marciano S, Haddad L, et al (2018) Prevalence and Factors Related to Natural Resistance-Associated Substitutions to Direct-Acting Antivirals in Patients with Genotype 1 Hepatitis C Virus Infection. *Viruses* 11:3. doi: 10.3390/v11010003
- Failla C, Tomei L, De Francesco R (1994) Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 68:3753–3760.
- Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A (2007) G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39:175–191. doi: 10.3758/BF03193146

- Fehr C, Conrad KD, Niepmann M (2012) Differential stimulation of hepatitis C virus RNA translation by microRNA-122 in different cell cycle phases. *Cell Cycle* 11:277–285. doi: 10.4161/cc.11.2.18699
- Feld JJ, Hoofnagle JH (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436:967–972. doi: 10.1038/nature04082
- Feld JJ, Lutchman GA, Heller T, et al (2010) Ribavirin improves early responses to peginterferon through improved interferon signaling. *Gastroenterology* 139:154–62.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.037
- Fernández-Caballero JA, Alvarez M, Chueca N, et al (2017) The cobas® HCV GT is a new tool that accurately identifies Hepatitis C virus genotypes for clinical practice. *PLoS One* 12:3–7. doi: 10.1371/journal.pone.0175564
- Fernández-Miragall O, Martínez-Salas E (2003) Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA* 9:1333–1344. doi: 10.1261/rna.5950603
- Fletcher NF, Wilson GK, Murray J, et al (2012) Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology* 142:634–643. doi: 10.1053/j.gastro.2011.11.028
- Floden EW, Khawaja A, Vopálenský V, Pospíšek M (2016) HCVIVdb: The hepatitis-C IRES variation database. *BMC Microbiol* 16:187. doi: 10.1186/s12866-016-0804-6
- Fondo Nacional de Recursos (2018) Tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis c. Normativa de cobertura del Fondo Nacional de Recursos. Montevideo (Uruguay)
- Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, et al (2004) Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 78:5170–83. doi: 10.1128/JVI.78.10.5170
- Foy E, Li K, Wang C, et al (2003) Regulation of Interferon Regulatory Factor-3 by the Hepatitis C Virus Serine Protease. *Science* (80-) 300:1145–1148. doi: 10.1126/science.1082604
- Fried MW, Hadziyannis SJ (2004) Treatment of chronic hepatitis C infection with peginterferons plus ribavirin. *Semin Liver Dis* 24:47–54. doi: 10.1055/s-2004-832928
- Gale M, Tan S-L, Katze MG (2000) Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:239–80.
- Galli A, Bukh J (2014) Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 22:354–364. doi: 10.1016/j.tim.2014.02.005
- García-Closas M, Jacobs K, Kraft P, Chatterjee N (2011) Analysis of epidemiologic studies of genetic effects and gene-environment interactions. In: Rothman N, Hainaut P, Schulte P, et al. (eds) *Molecular Epidemiology: Principles and Practices* IARC scientific publication. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp 281–301
- Gaspareto K V., Ribeiro RM, de M Malta F, et al (2016) Resistance-associated variants in HCV subtypes 1a and 1b detected by Ion Torrent sequencing platform. *Antivir Ther* 21:653–660. doi: 10.3851/IMP3057
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399–401. doi: 10.1038/nature08309
- Geller R, Estada Ú, Peris JB, et al (2016) Highly heterogeneous mutation rates in the hepatitis C virus genome. *Nat Microbiol* 1:1–7. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.45
- Gendron P, Lemieux S, Major F (2001) Quantitative analysis of nucleic acid three-dimensional structures. *J Mol Biol* 308:919–936. doi: 10.1006/jmbi.2001.4626
- Gerresheim GK, Dünnes N, Nieder-Röhrmann A, et al (2017) microRNA-122 target sites in the hepatitis C virus RNA NS5B coding region and 3' untranslated region: function in replication and influence of RNA secondary structure. *Cell Mol Life Sci* 74:747–760. doi: 10.1007/s00018-016-2377-9
- Gismondi MI, Becker PD, Valva P, et al (2006) Phylogenetic analysis of previously nontypeable hepatitis C virus isolates from Argentina. *J Clin Microbiol* 44:2229–2232. doi: 10.1128/JCM.02569-05
- Gismondi MI, Staendner LH, Grinstein S, et al (2004) Hepatitis C Virus Isolates from Argentina Disclose a Novel Genotype 1-Associated Restriction Pattern. *J Clin Microbiol* 42:1298–1301. doi: 10.1128/JCM.42.3.1298-1301.2004
- Götte M, Feld JJ (2016) Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13:338–351. doi: 10.1038/nrgastro.2016.60
- Goutagny N, Fatmi A, Ledinghen V De, et al (2003) Evidence of Viral Replication in Circulating Dendritic Cells during Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis* 187:1951–1958. doi: 10.1086/375350
- Graziadei I, Zoller H, Fickert P, et al (2016) Indications for liver transplantation in adults: Recommendations of the Austrian Society for Gastroenterology and Hepatology (ÖGGH) in

- cooperation with the Austrian Society for Transplantation, Transfusion and Genetics (ATX). *Wien Klin Wochenschr*. doi: 10.1007/s00508-016-1046-1
- Gregg K, Zhou W, Ji W, Davis S (2004) Enhanced sensitivity RNA gel loading buffer that enables efficient RNA separation on native gels. *Biotechniques* 36:334–6. doi: 10.2144/04362PF01
- Grimson A, Farh KK-HH, Johnston WK, et al (2007) MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol Cell* 27:91–105. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.017
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, et al (2008) The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* 36:W70–4. doi: 10.1093/nar/gkn188
- Guelfo JR, Macias J, Neukam K, et al (2014) Reassessment of genotype 1 hepatitis C virus subtype misclassification by LiPA 2.0: Implications for direct-acting antiviral treatment. *J Clin Microbiol* 52:4027–4029. doi: 10.1128/JCM.02209-14
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron* 4:art4: 9pp.
- Hanno AFF, Mohiedeen KM, Alshayeb AF, Deghedy A (2014) HCV RNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as a predictor of the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Alexandria J Med* 50:317–322. doi: 10.1016/j.ajme.2013.05.004
- Hara K, Rivera MM, Koh C, et al (2013) Important factors in reliable determination of hepatitis C virus genotype by use of the 5' untranslated region. *J Clin Microbiol* 51:1485–1489. doi: 10.1128/JCM.03344-12
- Hayashi K, Ishigami M, Ishizu Y, et al (2018) Late relapse of hepatitis C virus in patients with sustained virological response after daclatasvir and asunaprevir therapy. *J Viral Hepat*. doi: 10.1111/jvh.12967
- Heim MH (2013) 25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: An epoch coming to an end. *Nat Rev Immunol* 13:535–542. doi: 10.1038/nri3463
- Henke JI, Goergen D, Zheng J, et al (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27:3300–3310. doi: 10.1038/emboj.2008.244
- Heo N-Y, Lim Y-S, Lee W, et al (2014) No association between the IL28B SNP and response to peginterferon plus ribavirin combination treatment in Korean chronic hepatitis C patients. *Clin Mol Hepatol* 20:177. doi: 10.3350/cmh.2014.20.2.177
- Hernandez N, Mescia G, Pollio C, et al (2010) [Effectiveness of pegylated interferon alfa 2a and ribavirin for chronic hepatitis C in clinical practice]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 40:117–121.
- Hnatyszyn HJ (2005) Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther* 10:1–11. doi: 10.1603/EC11189
- Hodoğlugil U, Mahley RW (2012) Turkish Population Structure and Genetic Ancestry Reveal Relatedness among Eurasian Populations. *Ann Hum Genet* 76:128–141. doi: 10.1111/j.1469-1809.2011.00701.x
- Holmes JA, Desmond P V., Thompson AJ (2012) Does IL28B genotyping still have a role in the era of direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C infection? *J Viral Hepat* 19:677–684. doi: 10.1111/jvh.12003
- Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM (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. *J Virol* 73:1165–74.
- Honda M, Brown E a, Lemon SM (1996a) Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2:955–968.
- Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, et al (1996b) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222:31–42. doi: 10.1006/viro.1996.0395
- Hoofnagle JH (2002) Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36:s21–s29. doi: 10.1053/jhep.2002.36227
- Howe AYM, Black S, Curry S, et al (2014) Virologic Resistance Analysis From a Phase 2 Study of MK-5172 Combined With Pegylated Interferon/Ribavirin in Treatment-Naive Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection. *Clin Infect Dis* 59:1657–1665. doi: 10.1093/cid/ciu696
- Hrabner PT, Fischer W, Bruno WJ, et al (2006) Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: The 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology* 347:103–113. doi: 10.1186/1743-422X-3-103
- Hsu SH, Wang B, Kota J, et al (2012) Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* 122:2871–2883. doi: 10.1172/JCI63539
- Huang L, Hwang J, Sharma SD, et al (2005) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an

- RNA-binding protein. *J Biol Chem* 280:36417–36428. doi: 10.1074/jbc.M508175200
- ICTV (2017) ICTV Report: Flaviviridae. www.ictv.global/report/%0Aflaviviridae. Accessed 6 Jan 2019
- Ikezaki H, Furusyo N, Hiramane S, et al (2016) Association of IL28B rs8099917 genotype and female sex with spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a Japanese cross-sectional study. *Arch Virol* 161:641–648. doi: 10.1007/s00705-015-2703-9
- Imran M, Manzoor S, Ashraf J, et al (2013) Role of viral and host factors in interferon based therapy of hepatitis C virus infection. *Virol J* 10:1. doi: 10.1186/1743-422X-10-299
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V (2005) Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 19:333–341. doi: 10.1157/13078029
- Jacobson A (1996) Poly(A) Metabolism and Translation: The Closed-loop Model. In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N (eds) *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 451–480
- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al (2011) Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 364:2405–16. doi: 10.1056/NEJMoa1012912
- Jangra RK, Yi M, Lemon SM (2010) Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 84:6615–25. doi: 10.1128/JVI.00417-10
- Janssen Products (2013) Olysio (simeprevir) - Prescribing information. 1–44.
- Jensen D, Sherman KE, Hézode C, et al (2015) Daclatasvir and asunaprevir plus peginterferon alfa and ribavirin in HCV genotype 1 or 4 non-responders. *J Hepatol* 63:30–37. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.018
- Ji H, Fraser CS, Yu Y, et al (2004) Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci* 101:16990–5. doi: 10.1073/pnas.0407402101
- Jopling CL, Schütz S, Sarnow P (2008) Position-Dependent Function for a Tandem MicroRNA miR-122-Binding Site Located in the Hepatitis C Virus RNA Genome. *Cell Host Microbe*. doi: 10.1016/j.chom.2008.05.013
- Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al (2005) Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* (80-) 1:1577–1581. doi: 10.1126/science.1113329
- Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, et al (2000) Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIc contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J Virol* 74:10430–10437. doi: 10.1128/JVI.74.22.10430-10437.2000
- Juras A, Dabert M, Kushniarevich A, et al (2014) Ancient DNA reveals matrilineal continuity in present-day Poland over the last two millennia. *PLoS One* 9:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0110839
- Kaczor MP, Seczyńska M, Szczeklik W, Sanak M (2015) IL28B polymorphism (rs12979860) associated with clearance of HCV infection in Poland: Systematic review of its prevalence in chronic hepatitis C patients and general population frequency. *Pharmacol Reports* 67:260–266. doi: 10.1016/j.pharep.2014.10.006
- Kalaghatgi P, Maria Sikorski A, Knops E, et al (2016) Geno2pheno[HCV]- A web-based interpretation system to support hepatitis c treatment decisions in the era of direct-acting antiviral agents. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0155869
- Kalliampakou KI, Psaridi-Linardaki L, Mavromara P (2002) Mutational analysis of the apical region of domain II of the HCV IRES. *FEBS Lett* 511:79–84. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03300-2
- Kamoshita N, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Nomoto A (1997) Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: Implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *Virology* 233:9–18. doi: 10.1006/viro.1997.8600
- Kao CC, Yi G, Huang HC (2016) The core of hepatitis C virus pathogenesis. *Curr Opin Virol* 17:66–73. doi: 10.1016/j.coviro.2016.01.009
- Khan RU, Tong CYW, Bloom S, et al (1997) Evaluation of two simplified methods for genotyping hepatitis C virus. *J Med Virol* 52:35–41.
- Khawaja A, Vopalensky V, Pospisek M (2015) Understanding the potential of hepatitis C virus internal ribosome entry site domains to modulate translation initiation via their structure and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6:211–24. doi: 10.1002/wrna.1268
- Khudayberganova D, Sugiyama M, Masaki N, et al (2014) IL28B Polymorphisms and Clinical Implications for Hepatitis C Virus Infection in Uzbekistan. *PLoS One* 9:e93011. doi: 10.1371/journal.pone.0093011
- Kieffer TL, De Meyer S, Bartels DJ, et al (2012) Hepatitis C Viral Evolution in Genotype 1 Treatment-Naïve and Treatment-Experienced Patients Receiving Telaprevir-Based Therapy in Clinical Trials.

- PLoS One 7:e34372. doi: 10.1371/journal.pone.0034372
- Knapp S, Zakaria Z, Hashem M, et al (2015) Influence of IFNL3.rs12979860 and IFNL4.ss469415590 polymorphism on clearance of hepatitis C virus infection among Egyptians. *Hepatol Int* 9:251–257. doi: 10.1007/s12072-015-9619-z
- Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, et al (2012) Association of two polymorphisms of the IL28B gene with viral factors and treatment response in 1,518 patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol*. doi: 10.1007/s00535-012-0531-1
- Kohlway A, Pirakitikulr N, Ding SC, et al (2014) The Linker Region of NS3 Plays a Critical Role in the Replication and Infectivity of Hepatitis C Virus. *J Virol* 88:10970–10974. doi: 10.1128/JVI.00745-14
- Komohara Y, Yano H, Shichijo S, et al (2006) High expression of APOBEC3G in patients infected with hepatitis C virus. *J Mol Histol* 37:327–332. doi: 10.1007/s10735-006-9059-0
- Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R (2005) The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 21:379–84. doi: 10.1093/bioinformatics/bth485
- Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238. doi: 10.1038/339237a0
- Lagacé L, White PW, Bousquet C, et al (2012) In Vitro Resistance Profile of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor BI 201335. *Antimicrob Agents Chemother* 56:569–572. doi: 10.1128/AAC.05166-11
- Laporte J, Bain C, Maurel P, et al (2003) Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 101:52–57. doi: 10.1182/blood-2002-03-0818
- Laporte J, Malet I, Andrieu T, et al (2000) Comparative analysis of translation efficiencies of hepatitis C virus 5' untranslated regions among intraindividual quasispecies present in chronic infection: opposite behaviors depending on cell type. *J Virol* 74:10827–10833. doi: 10.1128/JVI.74.22.10827-10833.2000
- Laskus T, Operskalski EA, Radkowski M, et al (2007) Negative-Strand Hepatitis C Virus (HCV) RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Anti-HCV–Positive/HIV-Infected Women. *J Infect* 195:124–133. doi: 10.1086/509897
- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, et al (2000) Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* 74:1014–7.
- Laskus T, Radkowski M, Wilkinson J, et al (2002) The Origin of Hepatitis C Virus Reinfected Transplanted Livers: Serum-Derived versus Peripheral Blood Mononuclear Cell-Derived Virus. *J Infect Dis* 185:417–421. doi: JID010964 [pii] 10.1086/338635
- Lawitz E, Mangia A, Wyles D, et al (2013) Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection. *N Engl J Med* 368:1878–1887. doi: 10.1056/NEJMoa1214853
- Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, et al (2007) Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13:2416–26. doi: 10.3748/wjg.v13.i17.2416
- Le Pogam S, Dubois F, Christen R, et al (1998) Comparison of DNA enzyme immunoassay and line probe assays (Inno-LiPA HCV I and II) for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 36:1461–3.
- Lenz O, Verbinnen T, Lin TI, et al (2010) In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1878–1887. doi: 10.1128/AAC.01452-09
- Lenz O, Vijgen L, Berke JM, et al (2013) Virologic response and characterisation of HCV genotype 2–6 in patients receiving TMC435 monotherapy (study TMC435-C202). *J Hepatol* 58:445–451. doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.028
- Lerat H, Berby F, Trabaud M-A, et al (1996) Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 97:845–851. doi: 10.1172/JCI118485
- Lerat H, Shimizu YK, Lemon SM (2000) Cell Type-Specific Enhancement of Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site-Directed Translation due to 5' Nontranslated Region Substitutions Selected during Passage of Virus in Lymphoblastoid Cells. *J Virol* 74:7024–7031. doi: 10.1128/JVI.74.15.7024-7031.2000
- Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Li HC, Ma HC, Yang CH, Lo SY (2014) Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene

- products. *World J Gastroenterol* 20:7104–7122. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7104
- Li K, Foy E, Ferreon JC, et al (2005a) Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.0408824102
- Li R, Wang M, Jin L, He Y (2013) A Monte Carlo Permutation Test for Random Mating Using Genome Sequences. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0071496
- Li X-D, Sun L, Seth RB, et al (2005b) Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.0508531102
- Lin C (2006) HCV NS3-4A Serine Protease. In: Tan SL (ed) *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Horizon Bioscience, pp 163–206
- Lindenbach BD, Rice CM (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436:933–938. doi: 10.1038/nature04077
- Lisboa-Neto G, Noble CF, Rebello Pinho JR, et al (2015) Resistance mutations are rare among protease inhibitor treatment-naive hepatitis C genotype-1 patients with or without HIV coinfection. *Antivir Ther* 20:281–287. doi: 10.3851/IMP2873
- Lisboa Neto G, Malta FM, Gomes-Gouvêa MS, et al (2017) Characterization of clinical predictors of naturally occurring NS3/NS4A protease polymorphism in genotype 1 hepatitis C virus mono and HIV co-infected patients. *J Med Virol* 89:2249–2254. doi: 10.1002/jmv.24900
- Locker N, Easton LE, Lukavsky PJ (2007) HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J* 26:795–805. doi: 10.1038/sj.emboj.7601549
- Lodhi KM, Lodhi MA, Burgado S, et al (2010) Comparison of denaturing and non-denaturing gel electrophoresis methods for RNA analysis. *Pakistan J Biochem Mol Biol* 43:159–161.
- Lohmann V (2018) Hepatitis C virus cell culture models: an encomium on basic research paving the road to therapy development. *Med Microbiol Immunol* 0:0. doi: 10.1007/s00430-018-0566-x
- Loman NJ, Misra R V., Dallman TJ, et al (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. doi: 10.1038/nbt.2198
- Lonza Knowledge Center (2010) Section VIII : Separation of RNA in Agarose Gels. In: *Lonza Bench Guid. Source Book, Sect. VIII*. <https://knowledge.lonza.com>. Accessed 5 Feb 2019
- Lorenz IC (2010) The hepatitis C virus nonstructural protein 2 (NS2): An up-and-coming antiviral drug target. *Viruses* 2:1635–1646. doi: 10.3390/v2081635
- Love RA, Parge HE, Wickersham JA, et al (1996) The Crystal Structure of Hepatitis C Virus NS3 Proteinase Reveals a Trypsin-like Fold and a Structural Zinc Binding Site. *Cell* 87:331–342. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81350-1
- Love RA, Parge HE, Wickersham JA, et al (1998) The conformation of hepatitis C virus NS3 proteinase with and without NS4A: A structural basis for the activation of the enzyme by its cofactor. In: *Clinical and Diagnostic Virology*.
- Luna JM, Scheel TKHH, Danino T, et al (2015) Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell* 160:1099–1110. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.025
- Maasoumy B, Buggisch P, Mauss S, et al (2018) Clinical significance of detectable and quantifiable HCV RNA at the end of treatment with ledipasvir/sofosbuvir in GT1 patients. *Liver Int* 38:1906–1910. doi: 10.1111/liv.13932
- Macadam AJ, Pollard SR, Ferguson G, et al (1991) The 5' noncoding region of the type 2 poliovirus vaccine strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity. *Virology* 181:451–458.
- Macdonald A, Harris M (2004) Hepatitis C virus NS5A: Tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol* 85:2485–2502. doi: 10.1099/vir.0.80204-0
- Mach TH, Cieśla A, Warunek W, et al (2011) Efficacy of pegylated interferon alfa-2a or alfa-2b in combination with ribavirin in the treatment of chronic hepatitis caused by hepatitis C virus genotype 1b. *Pol Arch Med Wewn* 121:434–9.
- Mah Y-H, Liu C-HC-JC-H, Chen C-L, et al (2016) Prevalence and clinical implications of IL28B genotypes in Taiwanese patients with chronic hepatitis C. *J Formos Med Assoc* 115:953–960. doi: 10.1016/j.jfma.2016.07.013
- Mailliot J, Martin F (2018) Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. doi: 10.1002/wrna.1458
- Malespin M, Benyashvili T, Uprichard SL, et al (2017) Prevalence of end of treatment RNA-positive/sustained viral response in HCV patients treated with sofosbuvir combination therapies.

- Therap Adv Gastroenterol 10:68–73. doi: 10.1177/1756283X16672392
- Mangia A, De Ledinghen V, Bailly F, et al (2016) IL28B genotype is associated with cirrhosis or transition to cirrhosis in treatment-naïve patients with chronic HCV genotype 1 infection: the international observational Gen-C study. *Springerplus* 5:1990. doi: 10.1186/s40064-016-3663-6
- Mangia A, Mottola L, Santoro R (2013) Interleukin 28B polymorphisms as predictor of response in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *World J Gastroenterol* 19:8924–8928. doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8924
- Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, et al (2010) An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology* 139:827.e1-827. doi: 10.1053/j.gastro.2010.05.079
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet (London, England)* 358:958–65. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06102-5
- Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M (2006) Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 55:1350–9. doi: 10.1136/gut.2005.076646
- Margeridon-Thermet S, Le Pogam S, Li L, et al (2014) Similar Prevalence of Low-Abundance Drug-Resistant Variants in Treatment-Naïve Patients with Genotype 1a and 1b Hepatitis C Virus Infections as Determined by Ultradeep Pyrosequencing. *PLoS One* 9:e105569. doi: 10.1371/journal.pone.0105569
- Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med*. doi: 10.1038/nm946
- Martell M, Esteban JI, Quer J, et al (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66:3225–9.
- Martínez-Gómez LE, Chávez-Tapia NC, Burguete-García AI, et al (2012) IL28B polymorphisms predict the response to chronic hepatitis C virus infection treatment in a Mexican population. *Ann Hepatol* 11:876–881.
- Martínez-Salas E, Piñeiro D, Fernández N (2012) Alternative mechanisms to initiate translation in eukaryotic mRNAs. *Comp. Funct. Genomics* 2012:
- Martínez AP, Culasso ACA, Pérez PS, et al (2017) Polymorphisms associated with resistance to protease inhibitors in naïve patients infected with hepatitis C virus genotype 1 in Argentina: Low prevalence of Q80K. *Virus Res* 240:140–146. doi: 10.1016/j.virusres.2017.08.006
- Marukian S, Jones CT, Andrus L, et al (2008) Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology* 48:1843–1850. doi: 10.1002/hep.22550
- McGivern DR, Masaki T, Williford S, et al (2014) Kinetic Analyses Reveal Potent and Early Blockade of Hepatitis C Virus Assembly by NS5A Inhibitors. *Gastroenterology* 147:453–462.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2014.04.021
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al (1998) Interferon Alfa-2b Alone or in Combination with Ribavirin as Initial Treatment for Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med* 339:1485–1492. doi: 10.1056/NEJM199811193392101
- McNaughton AL, Sreenu VB, Wilkie G, et al (2018) Prevalence of mixed genotype hepatitis C virus infections in the UK as determined by genotype-specific PCR and deep sequencing. *J Viral Hepat* 25:524–534. doi: 10.1111/jvh.12849
- McPhee F, Friberg J, Levine S, et al (2012) Resistance Analysis of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3670–3681. doi: 10.1128/AAC.00308-12
- Merck & Co. Inc (2016) Zepatier - Prescribing information. 1–36.
- Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al (2015) Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 61:77–87. doi: 10.1002/hep.27259
- Milara J, Outeda-Macias M, Aumente-Rubio MD, et al (2015) PEG-Interferon- α ribavirin-induced HCV viral clearance: a pharmacogenetic multicenter Spanish study TT - Aclaramiento del Virus de la Hepatitis C Inducido por PEG-Interferón- α y Ribavirina: estudio Farmacogenético Multicéntrico en Hospitales Españoles. *Farm Hosp* 39:29–43. doi: 10.7399/fh.2015.39.1.8547
- Minakari M, Golshani M, Yaran M, Ataei B (2016) Prevalence of interleukin-28B single nucleotide polymorphism genotypes in patients with hepatitis C infection in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res* 5:90. doi: 10.4103/2277-9175.183138
- Miri SM, Sharafi H, Salimi S, et al (2017) Assessment of Hepatitis C Virus RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Predictor of Response to Pegylated-Interferon and Ribavirin: A Cohort Study. *Iran Red Crescent Med J* 19:10–16. doi: 10.5812/ircmj.46578

- Moghaddam A, Melum E, Reinton N, et al (2011) IL28B genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. *Hepatology* 53:746–54. doi: 10.1002/hep.24154
- Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, et al (2010) Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 52:33–37. doi: 10.1002/hep.23624
- Moradpour D, Penin F (2013) Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. In: Bartenschlager R (ed) *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*, Current Topics in Microbiology and Immunology 369. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin/Heidelberg, pp 113–142
- Moratorio G, Martínez M, Gutiérrez MF, et al (2007) Evolution of naturally occurring 5' non-coding region variants of Hepatitis C virus in human populations of the South American region. *Virol J* 4:79. doi: 10.1186/1743-422X-4-79
- Moreira RC, de Torres Santos AP, Lisboa-Neto G, et al (2018) Prevalence of naturally occurring amino acid substitutions associated with resistance to hepatitis C virus NS3/NS4A protease inhibitors in São Paulo state. *Arch Virol* 163:2757–2764. doi: 10.1007/s00705-018-3920-9
- Moreno P, Alvarez M, López L, et al (2009) Evidence of recombination in Hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virol J* 6:203. doi: 10.1186/1743-422X-6-203
- Motazakker M, Preikschat P, Elliott J, et al (2007) Translation efficiencies of the 5'-untranslated region of genotypes 1a and 3a in hepatitis C infected patients. *J Med Virol* 79:259–269. doi: 10.1002/jmv.20794
- Mottola L, Cenderello G, Piazzolla VA, et al (2015) Interleukin-28B genetic variants in untreated Italian HCV-infected patients: a multicentre study. *Liver Int* 35:482–488. doi: 10.1111/liv.12630
- Muir AJ, Hu K-Q, Gordon SC, et al (2011) Hepatitis C treatment among racial and ethnic groups in the IDEAL trial. *J Viral Hepat* 18:e134-43. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01402.x
- Murphy DG, Willems B, Deschênes M, et al (2007) Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol* 45:1102–1112. doi: 10.1128/JCM.02366-06
- Naggie S, Marks KM, Hughes M, et al (2017) Sofosbuvir plus ribavirin without interferon for treatment of acute hepatitis c virus infection in HIV-1-infected individuals: SWIFT-C. *Clin Infect Dis* 64:1035–1042. doi: 10.1093/cid/cix025
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, et al (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42:3858–63.
- Nasheri N, Singaravelu R, Goodmurphy M, et al (2011) Competing roles of microRNA-122 recognition elements in hepatitis C virus RNA. *Virology* 410:336–344. doi: 10.1016/j.virol.2010.11.015
- Némoz B, Roger L, Leroy V, et al (2018) Evaluation of the cobas®GT hepatitis C virus genotyping assay in G1-6 viruses including low viral loads and LiPA failures. *PLoS One* 13:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0194396
- Neukam K, Martínez AP, Culasso ACA, et al (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* 12:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0182193
- New England Biolabs (2019) *Gaussia Luciferase*. <https://www.neb.com/applications/cellular-analysis/reporter-systems/gaussia-luciferase>. Accessed 5 Feb 2019
- Nguyen DH, Gummuluru S, Hu J (2007) Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G. *J Virol*. doi: 10.1128/jvi.02510-06
- Nguyen MH, Keeffe EB (2005) Prevalence and Treatment of Hepatitis C Virus Genotypes 4, 5, and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:S97–S101. doi: 10.1053/S1542-3565(05)00711-1
- Nieder-Röhrmann A, Dünnes N, Gerresheim GK, et al (2017) Cooperative enhancement of translation by two adjacent microRNA-122/argonaute 2 complexes binding to the 5' untranslated region of hepatitis C virus RNA. *J Gen Virol* 98:212–224. doi: 10.1099/jgv.0.000697
- Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Ferreira SC, et al (2014) HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 9:e86413. doi: 10.1371/journal.pone.0086413
- Nosotti L, Petrelli L, Genovese D, et al (2017) Distribution of IL28B Polymorphism in a Cohort of Italians and Immigrants with HCV Infection: Association with Viraemia, Stage of Fibrosis and Response to Treatment. *J Immigr Minor Heal* 19:876–882. doi: 10.1007/s10903-016-0444-9
- O'Brien TR, Lang Kuhs KA, Pfeiffer RM (2014) Subgroup Differences in Response to 8 Weeks of Ledipasvir/Sofosbuvir for Chronic Hepatitis C. *Open Forum Infect Dis* 1:ofu110-ofu110. doi: 10.1093/ofid/ofu110

- O'Brien TR, Yang H-I, Groover S, Jeng W-J (2018) Genetic Factors That Affect Spontaneous Clearance of Hepatitis C or B Virus, Response to Treatment, and Disease Progression. *Gastroenterology* 1–18. doi: 10.1053/j.gastro.2018.09.052
- Ogert RA, Howe JA, Vierling JM, et al (2013) Resistance-associated amino acid variants associated with boceprevir plus pegylated interferon- α 2b and ribavirin in patients with chronic hepatitis C in the SPRINT-1 Trial F. *Antivir Chem Chemother* 18:387–397. doi: 10.3851/IMP2549
- Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F (2015) Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* btv566. doi: 10.1093/bioinformatics/btv566
- OPS (2017) Suministro de sangre para transfusiones en los países de Latinoamérica y del Caribe 2014 y 2015. Washington, DC
- Palanisamy N, Danielsson A, Kokkula C, et al (2013) Implications of baseline polymorphisms for potential resistance to NS3 protease inhibitors in Hepatitis C virus genotypes 1a, 2b and 3a. *Antiviral Res* 99:12–17. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.04.018
- Palanisamy N, Kalaghatgi P, Akaberi D, et al (2018) Worldwide prevalence of baseline resistance-associated polymorphisms and resistance mutations in HCV against current direct-acting antivirals. *Antivir Ther* 23:485–493. doi: 10.3851/IMP3237
- Pang PS, Pham EA, Elazar M, et al (2012) Structural map of a microRNA-122: hepatitis C virus complex. *J Virol* 86:1250–4. doi: 10.1128/JVI.06367-11
- Pár A, Pár G, Tornai I, et al (2014) IL28B and IL10R –1087 polymorphisms are protective for chronic genotype 1 HCV infection and predictors of response to interferon-based therapy in an East-Central European cohort. *BMC Res Notes* 7:12. doi: 10.1186/1756-0500-7-12
- Patiño-Galindo JÁ, Salvatierra K, González-Candelas F, López-Labrador FX (2016) Comprehensive Screening for Naturally Occurring Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antivirals in the NS3, NS5A, and NS5B Genes in Worldwide Isolates of Viral Genotypes 1 to 6. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2402–2416. doi: 10.1128/AAC.02776-15
- Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, et al (2011) NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *J Virol* 85:6963–6976. doi: 10.1128/JVI.00502-11
- Pawlotsky J-M (2016) Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* 151:70–86. doi: 10.1053/j.gastro.2016.04.003
- Pawlotsky J-M (2003) The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis* 16:587–92. doi: 10.1097/01.qco.0000104300.87920.03
- Pawlotsky J-M (2011) Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* 53:1742–51. doi: 10.1002/hep.24262
- Pedersen MS, Fahnøe U, Hansen TA, et al (2018) A near full-length open reading frame next generation sequencing assay for genotyping and identification of resistance-associated variants in hepatitis C virus. *J Clin Virol* 105:49–56. doi: 10.1016/j.jcv.2018.05.012
- Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320–325. doi: 10.1038/334320a0
- Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0017063
- Peng Z-G, Zhao Z-Y, Li Y-P, et al (2011) Host apolipoprotein b messenger RNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G is an innate defensive factor and drug target against hepatitis C virus. *Hepatology* 53:1080–1089. doi: 10.1002/hep.24160
- Pépin J, Chakra CNA, Pépin E, et al (2014) Evolution of the global burden of viral infections from unsafe medical injections, 2000-2010. *PLoS One* 9:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0099677
- Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E (2012) Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:254–261.
- Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E (2010) Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. *Arch Virol*. doi: 10.1007/s00705-010-0642-z
- Pérez-Losada M, Arenas M, Galán JC, et al (2015) Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect Genet Evol* 30:296–307. doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.022

- Pestova T V, Shatsky IN, Fletcher SP, et al (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12:67–83. doi: 10.1101/gad.12.1.67
- Pham TNQ, King D, MacParland SA, et al (2008) Hepatitis C Virus Replicates in the Same Immune Cell Subsets in Chronic Hepatitis C and Occult Infection. *Gastroenterology* 134:812–822. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.11.028
- Pham TNQ, Michalak TI (2011) Occult Hepatitis C Virus Infection and Its Relevance in Clinical Practice. *J Clin Exp Hepatol* 1:185–189. doi: 10.1016/S0973-6883(11)60130-8
- Pilot-Matias T, Tripathi R, Cohen D, et al (2015) In Vitro and In Vivo Antiviral Activity and Resistance Profile of the Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitor ABT-450. *Antimicrob Agents Chemother* 59:988–997. doi: 10.1128/AAC.04227-14
- Piñero F, Costa P, Boteon YL, et al (2018) A changing etiologic scenario in liver transplantation for hepatocellular carcinoma in a multicenter cohort study from Latin America. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 42:443–452. doi: 10.1016/j.clinre.2018.03.014
- Piñero F, Mendizabal M, Ridruejo E, et al (2019) Treatment with direct-acting antivirals for HCV decreases but does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* doi: 10.1111/liv.14041
- Piron M, Beguiristain N, Nadal A, et al (2005) Characterizing the function and structural organization of the 5' tRNA-like motif within the hepatitis C virus quasispecies. *Nucleic Acids Res* 33:1487–502. doi: 10.1093/nar/gki290
- Pisaturo M, Minichini C, Starace M, et al (2019) Hepatitis C late relapse in patients with directly acting antiviral-related sustained virological response at week 12. *Liver Int.* doi: 10.1111/liv.14025
- Polo ML, Laufer N (2017) Extrahepatic manifestations of HCV: the role of direct acting antivirals. *Expert Rev Anti Infect Ther* 15:737–746. doi: 10.1080/14787210.2017.1354697
- Poordad F, McCone J, Bacon BR, et al (2011) Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 364:1195–206. doi: 10.1056/NEJMoa1010494
- Prati D (2006) Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: A global review. *J Hepatol* 45:607–616. doi: 10.1016/j.jhep.2006.07.003
- Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, et al (2013) A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 45:164–171. doi: 10.1038/ng.2521
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al (2007) PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am J Hum Genet* 81:559–575. doi: 10.1086/519795
- Qiu P, Stevens R, Wei B, et al (2015) HCV Genotyping from NGS Short Reads and Its Application in Genotype Detection from HCV Mixed Infected Plasma. *PLoS One* 10:e0122082. doi: 10.1371/journal.pone.0122082
- Radkowski M, Wilkinson J, Nowicki M, et al (2002) Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. *J Virol* 76:600–608. doi: 10.1128/JVI.76.2.600-608.2002
- Rajeevan H, Soundararajan U, Kidd JR, et al (2012) ALFRED: An allele frequency resource for research and teaching. *Nucleic Acids Res* 40:D1010-5. doi: 10.1093/nar/gkr924
- Ramos JA, Ramos AL de A, Hoffmann L, et al (2012) A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-rib. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:888–892. doi: 10.1590/S0074-02762012000700008
- Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE (2010) Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): A multifunctional antiviral target. *J Biol Chem* 285:22725–22731. doi: 10.1074/jbc.R110.125294
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al (2010) Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 138:1338–45, 1345 e1–7. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.056
- Reynolds JE, Kaminski A, Carroll AR, et al (1996) Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* 2:867–78.
- Ribeiro RM, Li H, Wang S, et al (2012) Quantifying the Diversification of Hepatitis C Virus (HCV) during Primary Infection: Estimates of the In Vivo Mutation Rate. *PLoS Pathog.* doi: 10.1371/journal.ppat.1002881
- Ridruejo E, Solano A, Marciano S, et al (2011) Genetic variation in interleukin-28B predicts SVR in

- hepatitis C genotype 1 argentine patients treated with PEG IFN and ribavirin. *Ann Hepatol* 10:452–457. doi: 10.1016/S0168-8278(11)61179-3
- Rijnbrand R, Bredenbeek PJ, Haasnoot PC, et al (2001) The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* 7:585–97. doi: 10.1017/S1355838201000589
- Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW (2010) Nondenaturing Agarose Gel Electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:1–3. doi: 10.1101/pdb.prot5445
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al (2011) Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.*
- Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, et al (2000) Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *J Clin Microbiol* 38:3581–3584. doi: 0095-1137/00
- Rosso C, Abate ML, Ciancio A, et al (2014) IL28B polymorphism genotyping as predictor of rapid virologic response during interferon plus ribavirin treatment in hepatitis C virus genotype 1 patients. *World J Gastroenterol*. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.13146
- Russelli G, Pizzillo P, Iannolo G, et al (2017) HCV replication in gastrointestinal mucosa: Potential extra-hepatic viral reservoir and possible role in HCV infection recurrence after liver transplantation. *PLoS One* 12:1–30. doi: 10.1371/journal.pone.0181683
- Sabin AB, Boulger LR (1973) History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J Biol Stand* 1:115–118. doi: 10.1016/0092-1157(73)90048-6
- Sáiz JC, López de Quinto S, Ibarrola N, et al (1999) Internal initiation of translation efficiency in different hepatitis C genotypes isolated from interferon treated patients. *Arch Virol* 144:215–229. doi: 10.1007/s007050050499
- Salemi M, Vandamme AM (2002) Hepatitis C virus evolutionary patterns studied through analysis of full-genome sequences. *J Mol Evol*. doi: 10.1007/s00239-001-0018-9
- Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, et al (2013) Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLoS One* 8:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0075145
- Salzano FM, Sans M (2014) Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol* 37:151–170. doi: 10.1590/S1415-47572014000200003
- Sandres-Sauné K, Dery P, Pasquier C, et al (2003) Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* 109:187–193. doi: 10.1016/S0166-0934(03)00070-3
- Sans M (2011) National Identity, Census Data, and Genetics in Uruguay. In: Gibbon S, Ventura Santos R, Sans M (eds) *Racial Identities, Genetic Ancestry, and Health in South America*. Palgrave Macmillan, New York, pp 195–211
- Sarrazin C, Lathouwers E, Peeters M, et al (2015) Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 patients in the European region. *Antiviral Res* 116:10–16. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.01.003
- Scheel TKH, Luna JM, Liniger M, et al (2016) A Broad RNA Virus Survey Reveals Both miRNA Dependence and Functional Sequestration. *Cell Host Microbe* 19:409–423. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.007
- Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, Von Haeseler A (2002) TREE-PUZZLE: Maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/18.3.502
- Schuenemann VJ, Peltzer A, Welte B, et al (2017) Ancient Egyptian mummy genomes suggest an increase of Sub-Saharan African ancestry in post-Roman periods. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms15694
- Schult P, Roth H, Adams RL, et al (2018) microRNA-122 amplifies hepatitis C virus translation by shaping the structure of the internal ribosomal entry site. *Nat Commun* 9:2613. doi: 10.1038/s41467-018-05053-3
- Sedano CD, Sarnow P (2014) Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2. *Cell Host Microbe* 16:257–264. doi: 10.1016/j.chom.2014.07.006
- Sede MM, Laufer NL, Quarleri J (2015) Previous failure of interferon-based therapy does not alter the frequency of HCV NS3 protease or NS5B polymerase inhibitor resistance-associated variants: longitudinal analysis in HCV/HIV co-infected patients. *Int J Antimicrob Agents* 46:219–224. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.04.011
- Seme K, Poljak M, Dovc P, Koren S (1997) Comparative evaluation of four genotyping methods for hepatitis C virus. *Folia Biol (Praha)* 43:219–24.
- Shanmugam S, Nichols AK, Saravanabalaji D, et al (2018) HCV NS5A dimer interface residues

- regulate HCV replication by controlling its self-interaction, hyperphosphorylation, subcellular localization and interaction with cyclophilin A.
- Sharafi H, Alavian SM, Behnava B, et al (2014) The Impact of IFNL4 rs12979860 Polymorphism on Spontaneous Clearance of Hepatitis C; A Case-Control Study. *Hepat Mon* 14:e22649. doi: 10.5812/hepatmon.22649
- Sharafi H, Pouryasyn A, Alavian SM, et al (2012a) Development and Validation of a Simple, Rapid and Inexpensive PCR-RFLP Method for Genotyping of Common IL28B Polymorphisms: A Useful Pharmacogenetic Tool for Prediction of Hepatitis C Treatment Response. *Hepat Mon* 12:190–5. doi: 10.5812/hepatmon.849
- Sharafi H, Pouryasyn A, Alavian SM, et al (2012b) Distribution of IL28B genotypes in Iranian patients with chronic hepatitis C and healthy individuals. *Hepat Mon* 12:e8387. doi: 10.5812/hepatmon.8387
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646–650. doi: 10.1038/nature00939
- Shi X, Pan Y, Wang M, et al (2012) IL28B Genetic Variation Is Associated with Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus, Treatment Response, Serum IL-28B Levels in Chinese Population. *PLoS One* 7:e37054. doi: 10.1371/journal.pone.0037054
- Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, et al (2012a) Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci* 109:941–946. doi: 10.1073/pnas.1112263109
- Shimakami T, Yamane D, Welsch C, et al (2012b) Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol* 86:7372–83. doi: 10.1128/JVI.00513-12
- Sikora B, Chen Y, Lichti CF, et al (2008) Hepatitis C virus NS3 helicase forms oligomeric structures that exhibit optimal DNA unwinding activity in vitro. *J Biol Chem* 283:11516–11525. doi: 10.1074/jbc.M708125200
- Simmonds P, Becher P, Bukh J, et al (2017) ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* 98:2–3. doi: 10.1099/jgv.0.000672
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962–73. doi: 10.1002/hep.20819
- Sizova D, Kolupaeva V, Pestova T, et al (1998) Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol* 72:4775–4782.
- Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al (2014) Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59:318–327. doi: 10.1002/hep.26744
- Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al (2017) HCV Classification: A web resource to manage the classification and genotype and subtype assignments of hepatitis C virus. In: ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification. Accessed 6 Jan 2019
- Sociedad de Gastroenterología del Uruguay (2017) Día mundial contra la Hepatitis C. <http://sgu.org.uy/article/dia-mundial-contra-la-hepatitis-c>. Accessed 9 Jan 2019
- Soler M, Pellerin M, Malnou CE, et al (2002) Quasispecies Heterogeneity and Constraints on the Evolution of the 5' Noncoding Region of Hepatitis C Virus (HCV): Relationship with HCV Resistance to Interferon- α Therapy. *Virology* 298:160–173. doi: 10.1006/viro.2002.1494
- Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC, et al (2018) Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist Updat* 37:17–39. doi: 10.1016/j.drug.2018.01.004
- Stempniak M, Hostomska Z, Nodes BR, Hostomsky Z (1997) The Ns3 Proteinase Domain of Hepatitis-C Virus Is a Zinc-Containing Enzyme. *J Virol* Vol 71:2881–2886.
- Strimmer K, von Haeseler A (1997) Likelihood-mapping: A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci* 94:6815–6819. doi: 10.1073/pnas.94.13.6815
- Stross C, Shimakami T, Haselow K, et al (2016) Natural HCV variants with increased replicative fitness due to NS3 helicase mutations in the C-terminal helix α 18. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep19526
- Suhail M, Sohrab SS, Qureshi A, et al (2018) Association of HCV mutated proteins and host SNPs in the development of hepatocellular carcinoma. *Infect Genet Evol* 60:160–172. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.034
- Sulkowski MS, Eron JJ, Wyles D, et al (2015) Ombitasvir, Paritaprevir Co-dosed With Ritonavir, Dasabuvir, and Ribavirin for Hepatitis C in Patients Co-infected With HIV-1. *JAMA* 313:1223. doi: 10.1001/jama.2015.1328

- Sullivan JC, De Meyer S, Bartels DJ, et al (2013) Evolution of Treatment-Emergent Resistant Variants in Telaprevir Phase 3 Clinical Trials. *Clin Infect Dis* 57:221–229. doi: 10.1093/cid/cit226
- Sung H, Chang M, Saab S (2011) Management of hepatitis C antiviral therapy adverse effects. *Curr Hepat Rep* 10:33–40. doi: 10.1007/s11901-010-0078-7
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41:1100–1104. doi: 10.1038/ng.447
- Susser S, Schelhorn S, Lange C, et al (2012) Ultratiefe Pyrosequenz-Analyse (UDPS) von neu beschriebenen seltenen Resistenzvarianten der Hepatitis C Virus NS3 Protease bei Patienten, die mit Telaprevir oder Boceprevir behandelt wurden. *Z Gastroenterol*. doi: 10.1055/s-0032-1323987
- Susser S, Welsch C, Wang Y, et al (2009) Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 50:1709–1718. doi: 10.1002/hep.23192
- Svarovskaia ES, Martin R, McHutchison JG, et al (2012) Abundant Drug-Resistant NS3 Mutants Detected by Deep Sequencing in Hepatitis C Virus-Infected Patients Undergoing NS3 Protease Inhibitor Monotherapy. *J Clin Microbiol* 50:3267–3274. doi: 10.1128/JCM.00838-12
- Svitkin Y V., Pause A, Lopez-Lastra M, et al (2005) Complete Translation of the Hepatitis C Virus Genome In Vitro: Membranes Play a Critical Role in the Maturation of All Virus Proteins except for NS3. *J Virol* 79:6868–6881. doi: 10.1128/JVI.79.11.6868-6881.2005
- Taheri S, Aygen B, Korkmaz K, et al (2015) Characterization of the interleukin-28B gene rs12979860 C/T polymorphism in Turkish chronic hepatitis C patients and healthy individuals. *Balkan Med J* 32:147–155. doi: 10.5152/balkanmedj.2015.15156
- Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH (1996) The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70:8477–84.
- Tampaki M, Koskinas J (2014) Extrahepatic immune related manifestations in chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 20:12372–12380. doi: 10.3748/wjg.v20.i35.12372
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–9. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al (2009) Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105–1109. doi: 10.1038/ng.449
- Terczyńska-Dyla E, Bibert S, Duong FH, et al (2014) Reduced IFN λ 4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes. *Nat Commun* 5:5699. doi: 10.1038/ncomms6699
- Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, et al (2013) Sexual Transmission of Hepatitis C Virus Among Monogamous Heterosexual Couples: The HCV Partners Study. *Hepatology* 57:881–889. doi: 10.1002/hep.26164
- Thelu M-A, Drouet E, Hilleret M-N, Zarski J-P (2004) Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol* 72:396–405. doi: 10.1002/jmv.20021
- Thermo Scientific (2019) Pierce™ Gaussia Luciferase Flash Assay Kit. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16158>. Accessed 5 Feb 2019
- Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, et al (2000) The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* 284:450–6. doi: 10.1001/jama.284.4.450 [pii]
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al (2009) Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798–801. doi: 10.1038/nature08463
- Thomas X V., de Bruijne J, Sullivan JC, et al (2012) Evaluation of persistence of resistant variants with ultra-deep pyrosequencing in chronic hepatitis C patients treated with Telaprevir. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0041191
- Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, et al (2010) Interleukin-28B Polymorphism Improves Viral Kinetics and Is the Strongest Pretreatment Predictor of Sustained Virologic Response in Genotype 1 Hepatitis C Virus. *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.013
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Thorne N, Inglese J, Auld DS (2010) Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chem Biol* 17:646–657. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.05.012
- Tohme RA, Holmberg SD (2012) Transmission of hepatitis C virus infection through tattooing and piercing: A critical review. *Clin Infect Dis* 54:1167–1178. doi: 10.1093/cid/cir991

- Tong X, Bogen S, Chase R, et al (2008) Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. *Antiviral Res* 77:177–185. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.11.010
- Trémeaux P, Caporossi A, Thélu MA, et al (2016) Hepatitis C virus whole genome sequencing: Current methods/issues and future challenges. *Crit Rev Clin Lab Sci* 53:341–351. doi: 10.3109/10408363.2016.1163663
- Trinks J, Flichman D, Hulaniuk ML, Redal MA (2014a) Clinical utility of pharmacogenomics in the management of hepatitis C. *Pharmgenomics Pers Med* 7:339. doi: 10.2147/PGPM.S52624
- Trinks J, Hulaniuk ML, Caputo M, et al (2014b) Distribution of genetic polymorphisms associated with hepatitis C virus (HCV) antiviral response in a multiethnic and admixed population. *Pharmacogenomics J* 14:549–554. doi: 10.1038/tpj.2014.20
- Urbanus AT, Van De Laar TJ, Stolte IG, et al (2009) Hepatitis C virus infections among HIV-infected men who have sex with men: An expanding epidemic. *Aids* 23:1–7. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832e5631
- Vasanthakumar A, Davis JW, Abunimeh M, et al (2018) Reduced ITPase activity and favorable IL28B genetic variant protect against ribavirin-induced anemia in interferon-free regimens. *PLoS One* 13:1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0198296
- Venegas M, Villanueva RA, González K, Brahm J (2011) IL28B polymorphisms associated with therapy response in Chilean chronic hepatitis C patients. *World J Gastroenterol* 17:3636–3639. doi: 10.3748/wjg.v17.i31.3636
- Vera-Otarola J, Barriá MI, León U, et al (2009) Hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cells of treatment naïve chronically infected patients. *J Viral Hepat* 16:633–643. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01112.x
- Verbinnen T, Fevery B, Vijgen L, et al (2015) In Vitro Activity of Simeprevir against Hepatitis C Virus Genotype 1 Clinical Isolates and Its Correlation with NS3 Sequence and Site-Directed Mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7548–7557. doi: 10.1128/AAC.01444-15
- Vicenti I, Rosi A, Saladini F, et al (2012) Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *J Antimicrob Chemother* 67:984–987. doi: 10.1093/jac/dkr581
- Vidal LL, Soares MA, Santos AF (2016) NS3 protease polymorphisms and genetic barrier to drug resistance of distinct hepatitis C virus genotypes from worldwide treatment-naïve subjects. *J Viral Hepat* n/a-n/a. doi: 10.1111/jvh.12503
- Vo N V., Young K-CC, Lai MMC (2003) Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* 42:10462–71. doi: 10.1021/bi0344681
- Vopálenký V, Khawaja A, Rožnovský L, et al (2018) Characterization of hepatitis C virus IRES quasispecies - From the individual to the pool. *Front Microbiol* 9:731. doi: 10.3389/fmicb.2018.00731
- Vuillermoz I, Khattab E, Sablon E, et al (2004) Genetic variability of hepatitis C virus in chronically infected patients with viral breakthrough during interferon-ribavirin therapy. *J Med Virol* 74:41–53. doi: 10.1002/jmv.20144
- Walker CM (2017) Designing an HCV vaccine: a unique convergence of prevention and therapy? *Curr Opin Virol* 23:113–119. doi: 10.1016/j.coviro.2017.03.014
- Wang C, Sarnow P, Siddiqui A (1994) A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 68:7301–7.
- Wang C, Sarnow P, Siddiqui A (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67:3338–44.
- WHO (2017) Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- WHO (2018a) Fact Sheet: Hepatitis C. In: World Heal. Organ. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Accessed 30 Dec 2018
- WHO (2018b) Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- WHO (2014) Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection.
- Wiegand SB, Heidrich B, Susser S, et al (2015) Performance and value of IFN-Lambda3 and IFN-Lambda4 genotyping in patients with chronic hepatitis c (CHC) Genotype 2/3 in a real world setting. *PLoS One* 10:1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0145622
- Wölk B, Sansonno D, Kräusslich H, et al (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 74:2293–304. doi: 10.1128/JVI.74.5.2293-2304.2000

- Worobey M, Holmes EC (1999) Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 80:2535–2543.
- Wrensch F, Crouchet E, Ligat G, et al (2018) Hepatitis C virus (HCV)-apolipoprotein interactions and immune evasion and their impact on HCV vaccine design. *Front Immunol* 9:1–9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01436
- Wyles DL (2017) Resistance to DAAs: When to Look and When It Matters. *Curr HIV/AIDS Rep* 14:229–237. doi: 10.1007/s11904-017-0369-5
- Xu D-Z, Xie Y, Li Z-QQ (2005) Clearance of HCV RNA in peripheral blood mononuclear cell as a predictor of response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4:550–553.
- Xu J, Zhu X, Wu L, et al (2012) MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt / b -catenin pathway. *Liver Int* 32:752–760. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02750.x
- Yamamoto C, Enomoto N, Kurosaki M, et al (1997) Nucleotide sequence variations in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus-1b: no association with efficacy of interferon therapy or serum HCV-RNA levels. *Hepatology* 26:1616–20. doi: 10.1002/hep.510260633
- Yamane D, McGivern DR, Masaki T, Lemon SM (2013) Liver Injury and Disease Pathogenesis in Chronic Hepatitis C. In: Bartenschlager R (ed) *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. Springer Berlin Heidelberg, pp 263–288
- Yao N, Reichert P, Taremi SS, et al (1999) Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease–helicase. *Structure* 7:1353–1363. doi: 10.1016/S0969-2126(00)80025-8
- Yasmeen A, Hamid S, Granath FN, et al (2006) Correlation between translation efficiency and outcome of combination therapy in chronic hepatitis C genotype 3. *J Viral Hepat* 13:87–95. doi: 10.1111/j.1365-2893.2005.00660.x
- Zeminian LB, Padovani JL, Corvino SM, et al (2013) Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:13–17.
- Zeuzem S (2004) Heterogeneous Virologic Response Rates to Interferon-Based Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C: Who Responds Less Well? *Ann Intern Med* 140:370–381. doi: 10.7326/0003-4819-140-5-200403020-00033
- Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S, et al (2017) NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *J Hepatol* 66:910–918. doi: 10.1016/j.jhep.2017.01.007
- Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, et al (2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*. doi: 10.1038/nature01707
- Zhou Y, Bartels DJ, Hanzelka BL, et al (2008) Phenotypic characterization of resistant Val36 variants of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob Agents Chemother*. doi: 10.1128/AAC.00863-07
- Zhu JW, Liu FL, Mu D, et al (2016) Increased expression and dysregulated association of restriction factors and type I interferon in HIV, HCV mono- and co-infected patients. *J Med Virol*. doi: 10.1002/jmv.24419
- Zhu Y-P, Peng Z-G, Wu Z-Y, et al (2015) Host APOBEC3G Protein Inhibits HCV Replication through Direct Binding at NS3. *PLoS One* 10:e0121608. doi: 10.1371/journal.pone.0121608
- Zoulim F, Liang TJ, Gerbes AL, et al (2015) Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies: Table 1. *Gut* 64:1824–1833. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310421

11. APÉNDICES

11.1. Tablas y figuras suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Características demográficas de los pacientes – Muestras provenientes de la Asociación Española.

Nº de Muestra	Toma de muestra	Sexo	Edad (años)	CV (\log_{10}) ^a	Genotipo ASEP ^b	Tratamiento ^c	Respuesta ^d
598	Junio 2012	M	53	5.78	1a	PR	NR
624	Agosto 2012	M	21	6.80	1b	ND	ND
955	Abril 2012	F	65	6.61	1a	PR	ND
982	Mayo 2012	M	45	5.08	3a	PR	NC ^e
983	Mayo 2012	M	36	4.92	1b	<i>Naïve</i>	NC
986	Mayo 2012	M	44	<1.40	1a	ND	ND
987	Mayo 2012	M	32	<1.40	ND	ND	ND
988	Mayo 2012	F	62	<1.40	ND	PR	RVS
989	Mayo 2012	F	60	5.15	1b	PR	ND
990	Mayo 2012	M	40	6.71	1b	PR	RVS
991	Mayo 2012	M	48	7.16	3a	ND	ND
996	Junio 2012	F	72	5.62	1b	ND	ND
1001	Junio 2012	F	54	<1.40	ND	PR	RVS
1003	Junio 2012	M	45	3.78	1b	PR	Falleció ^f
1010	Junio 2012	M	60	5.75	ND	PR	NR
1011	Junio 2012	M	31	6.48	1a	ND	ND
1012	Junio 2012	F	57	<1.40	ND	ND	ND
1013	Junio 2012	M	55	6.02	1a	ND	ND
1014	Junio 2012	M	40	<1.40	1b	ND	ND
1016	Junio 2012	M	46	6.09	3a	ND	ND
1017	Julio 2012	M	58	6.17	3a	<i>Naïve</i>	NC
1018	Julio 2012	M	35	6.31	1a	<i>Naïve</i>	NC
1019	Julio 2012	M	46	6.39	1b	<i>Naïve</i>	NC
1020	Julio 2012	M	40	6.08	1a	<i>Naïve</i>	NC
1021	Julio 2012	M	67	5.79	1b	ND	ND
2035	Junio 2012	F	29	<1.40	ND	ND	ND
2047	Julio 2012	M	21	<1.40	ND	ND	ND

^a Logaritmo en base 10 de la carga viral (CV) determinada en unidades internacionales por mililitro (UI/mL). CV al momento de toma de muestra. <1.40 indica valores detectables pero no cuantificables. Determinada con el kit comercial COBAS@TaqMan HCV Test, v2.0

^b Genotipo determinado en la Asociación Española (ASESP) por el método de RFLP de la región 5'NCR.

^c **PR**: IFN- α -peg/ribavirina; **Naïve**: No recibió tratamiento

^d **NR**: No respondedor; **RVS**: Respuesta Viroológica Sostenida

^e El tratamiento debió suspenderse por intolerancia

^f Fallecimiento durante el tratamiento

ND: no determinado o desconocido.

NC: No corresponde

Tabla Suplementaria 2. Características demográficas de los pacientes *naïve* al tratamiento (biterapia o terapia con DAAs) – Muestras provenientes del Hospital de Clínicas (1 muestra por paciente).

N° de Muestra	Sexo	Edad (años)	Años de evolución ^a	VIH	CV (log ₁₀) ^b	Genotipo HC ^c
02	F	53	15	(-)	3.75	1a
03	F	45	15	(+)	4.30	1a
04	F	71	20	(-)	ND	1b
05	F	52	28	(-)	8.09	3a
07	F	35	12	(-)	8.00	1b
08	F	51	10	(-)	ND	1a
12	M	45	25	(-)	6.65	1a
15	M	30	10	(-)	ND	1b
16	F	63	50	(-)	6.29	ND
17	M	39	ND	(-)	ND	ND
19	M	55	12	(-)	ND	ND
21	M	32	ND	(-)	6.01	1a
23	F	47	ND	(-)	ND	ND
24	M	36	28	(-)	ND	ND
30	M	37	ND	(-)	5.30	1a
32	M	ND	ND	(-)	5.10	ND

^a Refiere al tiempo de infección crónica hasta la toma de muestra.

^b Logaritmo en base 10 de la CV determinada en UI/mL. CV al momento de toma de muestra. Determinada con el kit comercial *Real Time HCV* (Abbot).

^c Genotipo informado por el Hospital de Clínicas (HC). Servicios tercerizados, se desconocen los métodos de genotipificación.

ND: no determinado o desconocido.

Referencias de Tabla Suplementaria 3 (página siguiente):

^a Las muestras intratratamiento se denominan como _7d ó _15d (7 o 15 días de empezada la terapia).

^b Refiere al tiempo de infección crónica hasta la toma de muestra.

^c Tratamientos – **IR:** IFN- α /ribavirina; **PR:** IFN- α -peg/ribavirina; **PRT:** IFN- α -peg/ribavirina/Telaprevir; **SOFLDV:** Sofosbuvir/Ledipasvir; **Viekira Pak** - Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir/Dasabuvir.

^d Refiere al tiempo de terminado el tratamiento hasta la toma de muestra.

^e **NR:** No respondedor; **RVS:** Respuesta Viroológica Sostenida

^f Logaritmo en base 10 de la CV determinada en UI/mL. CV al momento de toma de muestra. Determinada con el kit comercial *Real Time HCV* (Abbot).

^g Genotipo informado por el Hospital de Clínicas (HC). Servicios tercerizados, se desconocen los métodos de genotipificación.

ND: no determinado o desconocido.

NC: no corresponde.

APÉNDICES

Tabla Suplementaria 3. Características demográficas de los pacientes tratados con biterapia o DAAs – Muestras provenientes del Hospital de Clínicas (1 o más muestras por paciente).

Muestras por paciente	N° de Muestra ^a	Sexo	Edad (años)	Años de evolución ^b	VIH	Muestra post-tratamiento	Tratamiento Recibido ^c	Tiempo de terminado ^d	Respuesta ^e	CV (log ₁₀) ^f	Genotipo HC ^g
1 muestra post biterapia	06	M	45	ND	(-)	Si	PR	Junio 2014	NR	7.00	1a
	09	M	51	20	(-)	Si	PR-PR	ND	NR	6.00	3a
	10	F	34	4	(-)	Si	PR	Diciembre 2014	NR	4.85	1a
	13	M	64	14	(-)	Si	PR	Junio 2013	NR	4.70	1
	20	M	40	ND	(-)	Si	PR	Diciembre 2015	NR	6.00	1a
	22	M	49	30	(-)	Si	PR	3	NR	6.24	1b
	26	M	59	26	(-)	Si	IR	1995	NR	ND	ND
	28	M	42	ND	(-)	Si	PR	2014	NR	4.36	1a
	29	F	64	18	(-)	Si	PR	2014	NR	5.10	1a
	31	M	45	25	(-)	Si	PR	2012	NR	ND	1a
	33	M	51	28	(+)	Si	PR	2014	NR	ND	1a
34	F	58	58	(-)	Si	PR	2009	NR	5.60	1b	
1 muestra post terapia con DAAs	01	M	51	17	(-)	Si	PR-PRT	Enero 2014	NR	6.37	1b
	14	M	51	34	(-)	Si	PR-PRT	Junio 2014	NR	5.39	1b
	35	M	40	30	(+)	Si	Viekira Pak	2016	NR	6.00	1a
1 muestra pre terapia + 1 ó 2 muestra(s) intratratamiento ó post-tratamiento con DAAs	18	M	47	27	(-)	Si	PR	2006	NR	ND	1a
	42_18 _{Recaída}		Si			SOF/LDV	5 meses	Recaída	6.20		
	25	M	48	20	(-)	Si	PR	2012	NR	6.90	1b
	25_7d					Si	Viekira Pak	NC	RVS	ND	
	27					Si	PR	2013	NR	6.30	
	38_27 _{Recaída}	M	54	25	(-)	Si	SOF/LDV	3 meses	Recaída	7.10	1a
	36	F	54	30	(-)	No	NC	NC	NC	5.30	1b
	36_15d					Si	Viekira Pak	NC	RVS	ND	
	37	M	50	30	(-)	Si	PR	ND	NR	6.90	1a
	37_7d					Si	Viekira Pak	NC	RVS	ND	
39	Si					PR	2014	NR	6.49		
39_7d	M	43	27	ND	Si	Viekira Pak	NC	RVS	ND	1b	
39_post	Si	Viekira Pak	10 semanas	ND	ND						

Tabla Suplementaria 4. Números de acceso de secuencias genoma completo representativas de cada genotipo de VHC utilizadas para realizar los árboles filogenéticos

Genotipo	Subtipo	País	GenBank Accession Nr	Observaciones
1	1a	China	KC844049	Cepa H77, referencia subtipo 1a
		Estados Unidos	AF009606	
		Estados Unidos	EF621489	
		Reino Unido	AJ278830	
	1b	Alemania	AJ238799	Cepa Con1, referencia subtipo 1b
		Brasil	EF032892	
		Japón	D90208	
		Rusia	AF176573	
	1c	China	KC844047	
		India	AY051292	
2	2a	Indonesia	D14853	
		Japón	AB047639	
	2b	Dinamarca	JQ745651	
		Japón	AB559564	
	2c	Francia	KC197227	
	2i	Viet Nam	DQ155561	
2k	Rep. de Moldavia	AB031663		
3	3a	China	KC844041	Cepa NZL1, referencia subtipo 3a
		India	GQ275355	
		Nueva Zelanda	D17763	
	3b	China	JQ065709	
		China	KC844044	
3k	Canadá	JF735122		
4	4a	Egipto	GU814265	
		Japón	AB795432	
	4v	Uganda	MH742365	
5	5a	China	KC844046	5'NCR, core, E1 y E2. Utilizada para árbol IRES 5'NCR incompleto. Utilizada para árboles NS3 y NS5B
		Indonesia	D50466	
		Reino Unido	Y13184	
	6a	Viet Nam	EU246930	
	6b	Tailandia	D84262	
	6d	Viet Nam	D84263	
	6f	Tailandia	DQ835760	
	6h	Viet Nam	D84265	
	6k	China	DQ278891	
	6v	China	EU798760	
7	7a	Canadá	EF108306	
	ND	Rep. Democrática del Congo	MH940291	
8	ND	Canadá	MH590701	
		Canadá	MH590700	

ND: No determinado o No asignado

Tabla Suplementaria 5. Genotipos de las muestras según filogenia de NS5B

N° de Muestra ASEP ^a	Genotipo NS5B	N° de Muestra HC ^b	Genotipo NS5B
598	1a	01	1b
624	1a	02	1a
955	1a	03	1a
982	3a	04	1b
983	1a	05	3a
986	No amplificó	06	1a
987	No amplificó	07	1a
988	No amplificó	08	1a
989	1b	09	3a
990	1a	10	1b
991	3a	12	1a
996	1a	13	1b
1001	No amplificó	14	1b
1003	1b	15	1b
1010	1b	16	1b
1011	1a	17	1a
1012	No amplificó	18 y 42	1a
1013	1b	19	No amplificó
1014	No amplificó	20	1a
1016	3a	21	1a
1017	3a	22	1a
1018	1a	23	1a
1019	1a	24	1b
1020	1a	25	1a
1021	1a	26	1b
2035	No amplificó	27 y 38	1a
2047	No amplificó	28	1a
		29	1b
		30	1a
		31	1a
		32	1a
		33	1a
		34	1b
		35	1a
		36	1b
		37	1a
		39	1b

^a ASEP: Asociación Española^b HC: Hospital de Clínicas

Tabla Suplementaria 6. Muestras con asignación de genotipos discordantes al comparar métodos empleados en centros asistenciales y filogenia de NS5B.

N° de Muestra	Genotipo	
	Kit Comercial ^a	Filogenia NS5B
1013	1a	1b
10	1a	1b
29	1a	1b
624	1b	1a
983	1b	1a
990	1b	1a
996	1b	1a
1019	1b	1a
1021	1b	1a
07	1b	1a
22	1b	1a
25	1b	1a

^a Método de RT-PCR de la región 5'NCR seguido de RFLP para muestras 624, 983, 990, 996, 1013, 1019 y 1021. Desconocido para las muestras 07, 10, 22, 25 y 29.

En anaranjado se indican los cambios 1a > 1b y en amarillo los cambios 1b > 1a

Tabla Suplementaria 7. Información de pacientes infectados con VHC que conforman el grupo de 'casos' en el estudio de los SNPs en el gen *IFN-λ-4*

N° de muestra ^a	Sexo	Genotipo viral	Edad (años)	Estadio de fibrosis ^b	rs12979860	rs8099917
IL002	F	3a	58	4	CT	TT
IL003	F	3a	45	4	TT	TT
IL004	F	1b	41	2	CC	TT
IL005	M	1b	67	2	CT	TG
IL006	M	ND	18	ND	CT	TG
IL007 (24)	M	ND	35	ND	TT	GG
IL010	M	ND	40	ND	CT	TT
IL011	F	1b	24	1	CT	TT
IL012	F	1a	38	ND	CC	TT
IL014 (29)	F	1a	60	2	CT	GG
IL015	M	1a	44	ND	TT	GG
IL016	F	3	50	ND	CC	TT
IL017	F	1a	44	1	CT	TT
IL018	M	1a	38	3	CT	TT
IL019	F	3	38	1	TT	TG
IL020	M	1a	35	4	CT	TT
IL021	F	3a	51	ND	CT	TG
IL022	F	1b	63	4	CC	TT
IL023	M	1b	64	4	TT	TG
IL024	F	3a	35	ND	CT	TT
IL029	F	1b	69	4	CT	TG
IL030	M	1a	33	2	CT	TG
IL032	M	1	50	2	CT	TT
IL033	F	1	68	ND	CC	TT
IL034	M	ND	36	4	CC	TT
IL036	M	1	40	3	TT	TG
IL038	F	3	65	4	TT	TG
IL039	F	ND	ND	ND	CT	TT
IL040	F	1	63	2	TT	TG
IL042	M	1	48	1	CC	TT
IL044	M	ND	59	4	CT	TG
IL045	M	1a	57	4	CC	TT
IL046	F	3a	39	3	CT	TT
IL047	F	1a	54	2	CT	TT
IL048	M	3	56	4	CT	TT
IL049	M	1a	48	4	CT	TG
IL050	M	ND	ND	ND	CC	TT
IL052 (12)	M	1a	44	1	CT	TG
IL054	M	ND	26	ND	CT	TG
IL056	M	2	69	1	CT	TT
IL058	F	ND	54	4	CT	TG

IL059	M	ND	ND	ND	CC	TT
IL061 (39)	M	1b	41	ND	TT	TG
IL062 (06)	M	1	ND	ND	CC	TT
IL064	M	1b	ND	4	CC	TT
IL065	F	1a	30	1	CT	TG
IL066	F	1	41	ND	TT	GG
IL068	M	1	60	ND	TT	GG
IL069	M	ND	ND	ND	TT	GG
IL070	M	1a	45	3	CT	TT
IL071	M	2a	57	1	CC	TT
IL072 (19)	M	1b	55	4	CC	TT
IL074	M	ND	60	4	TT	GG
IL075	M	ND	ND	ND	CC	TT
IL076	M	2	53	ND	TT	TG
IL077	M	1a	36	3	CT	TG
IL078	M	1a	33	4	CT	TT
IL079	M	1a	35	4	CC	TT
IL080	M	1a	40	ND	TT	GG
IL082	M	1	48	ND	CT	TT
IL083	M	ND	52	ND	CT	TT
IL084	M	1b	45	ND	CC	TT
IL085	M	1a	50	4	CC	TT
IL086	F	1a	30	ND	CC	TT
IL089	M	1a	38	1	CT	TG
IL091	M	ND	ND	ND	CT	TT
IL092	F	3	49	ND	TT	GG
IL093	F	ND	ND	4	CC	TT
IL094	F	1b	63	1	CT	TG
IL095	M	ND	49	ND	CC	TT
IL096	M	1b	41	4	TT	GG
IL097	F	1b	35	2	CT	TT
IL098	M	ND	38	4	CC	TT
IL099	M	3	48	2	TT	GG
IL100	M	1a	39	4	CT	TG
IL102	F	1a	45	2	CC	TT
IL105	F	1b	70	ND	CT	TT
IL106	F	3a	52	4	CT	TT

^a Entre paréntesis se indica el número correspondiente a la muestra del Capítulo 1

^b 1 y 2 Fibrosis; 3 y 4 Cirrosis

ND: No determinado o desconocido

Tabla Suplementaria 8. Información de individuos no infectados con VHC que conforman el grupo de 'control' en el estudio de los SNPs en el gen IFN- λ -4

N° de muestra	Sexo	Edad (años)	rs12979860	rs8099917
0223	F	26	CC	TT
0557	M	26	CT	TG
1736	M	28	CT	TT
1740	M	44	TT	TG
1741	M	61	CT	TT
1745	F	45	CC	TT
1748	F	36	CC	TT
1749	M	49	ND	TG
1750	M	39	CC	TT
1764	M	54	CC	TT
2014	M	65	ND	TT
2016	M	29	ND	TG
2017	M	29	ND	TT
2018	M	37	ND	TT
2019	F	22	ND	TT
2021	M	46	ND	TT
2022	M	30	CC	TT
2023	M	35	CC	TT
2033	F	50	CC	TT
2054	F	52	CT	TG
2055	M	46	TT	GG
2056	M	39	TT	TG
2058	F	59	CC	TT
2060	M	35	CC	TT
2061	F	59	CC	TT
2062	M	40	CC	TT
2063	M	24	CC	TT
2064	F	42	CC	TT
2231	M	25	CC	TT
2232	M	54	CT	TT
2233	M	47	TT	GG
2235	M	22	ND	TG
2236	M	32	CC	TT
2237	M	45	CT	TG
2238	M	58	CT	TG
2239	F	31	CT	TT
2240	M	43	ND	TG
2241	M	39	CC	TT
2814	M	54	CT	TG
2815	F	51	CC	TT
2816	M	43	TT	GG
2817	M	42	CC	TT
2818	M	47	CT	TT
2819	M	58	ND	TG
2820	M	33	CC	TT
2821	F	30	CT	TG
2822	M	37	CC	TT
2824	F	48	CT	TG
3064	M	23	ND	TG
3067	M	25	CT	TG
3068	M	52	TT	GG
3070	M	36	CC	TT
3071	M	31	CC	TT
3075	F	35	CT	TT
3076	M	35	CC	TT

3077	M	41	CT	TT
3078	M	55	CC	TT
3081	M	32	CT	TG
3277	M	23	TT	TG
3278	M	36	CT	TG
3279	M	43	CC	TT
3280	M	26	CT	TG
3281	M	65	CT	TG
3283	M	29	CT	TG
3284	F	26	CC	TT
3285	F	60	CC	TT
3286	M	29	CC	TT
3287	M	39	CT	TG
3289	F	40	CT	TT
3290	M	32	TT	TG
3291	M	31	CT	TG
3292	M	29	CT	TT
3293	M	51	CT	TT
3294	M	20	TT	TG
3312	M	67	CC	TT
3320	F	33	CC	TT
3321	F	34	CC	TT
3331	F	27	CT	TG
3333	M	38	CT	TG
3336	M	44	CT	TG
3427	F	38	CC	TT
3428	M	47	CT	TG
3429	M	48	CT	TG
3430	M	56	CT	TT
3431	M	50	CC	TT
3432	M	27	CT	TT
3449	F	39	CT	TG
3450	M	40	TT	TG
3451	M	60	CT	TT
3452	M	58	CT	TT
3453	M	32	CT	TG
3739	F	34	CT	TG
3741	M	43	CC	TT
3742	F	40	TT	GG
3745	M	39	CC	TT
3747	F	62	CC	TT
3748	F	48	CC	TT
3749	M	24	CT	TG
3750	M	26	CC	TT
3753	M	42	CC	TT
3754	M	35	CC	TT
3755	M	21	CT	TG
3756	M	26	CC	TT

En anaranjado se indican los 11 individuos que no pudieron genotipificarse para rs12979860 y que se excluyeron de los análisis

Apéndice 1. Protocolo de lisis de eritrocitos

1. Adición de 20mL de una solución lisante fría (5mM de MgCl₂) a tubo con 5mL de sangre periférica con EDTA.
2. Centrifugación por 10min a 3000 revoluciones por minuto (rpm) y descarte del sobrenadante
3. Resuspensión del pellet (GBs) y repetición de los pasos anteriores
4. Lavado de los GBs con 1mL de buffer fosfato salino (PBS, del inglés: *Phosphate-buffered Saline*), centrifugación 10min a 3000rpm y descarte del sobrenadante.
5. Resuspensión de los GBs en 400µl de PBS y preservación a -20°C hasta la extracción de ADN.

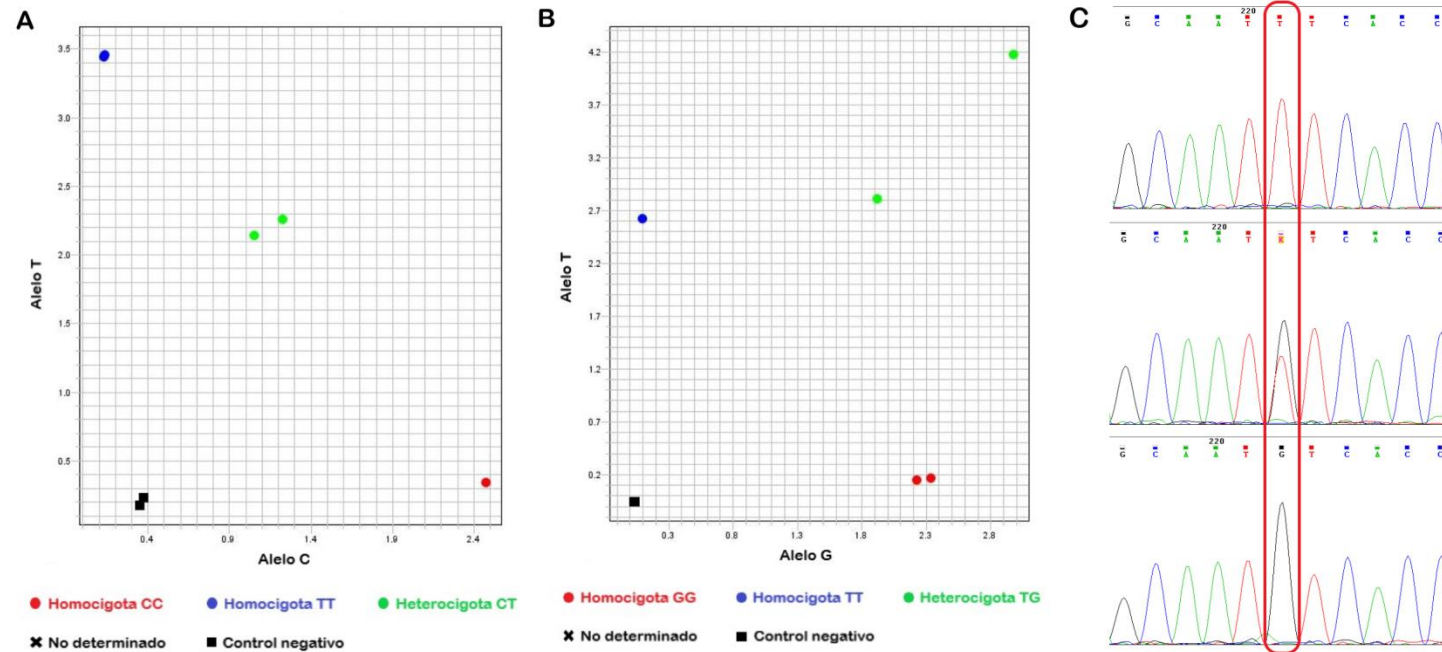


Figura suplementaria 1. Controles positivos empleados para los SNPs analizados. A y B) Plots de discriminación alélica por PCR a tiempo real de muestras utilizadas como controles positivos de los polimorfismos rs12979860 (**A**) y rs8099917 (**B**) que fueron empleadas para poner a punto el protocolo de discriminación alélica. Los correspondientes al rs12979860 habían sido previamente utilizados en el HC (verificados por ellos por secuenciación de Sanger). Resultados obtenidos con el *software* StepOne Plus v2.2.2. Se observa con claridad cómo estos ensayos son capaces de discriminar correctamente los diferentes genotipos, indicados con círculos coloreados acorde a la fluorescencia emitida, que se corresponde con las sondas utilizadas para cada alelo. Los controles negativos emiten fluorescencia basal únicamente. Ninguno de los controles empleados rindió resultados indeterminados. **C)** Cromatogramas obtenidos a partir de la secuenciación de un fragmento genómico correspondiente a la región intergénica entre *IFN-λ-4* e *IFN-λ-2* y que contiene al SNP rs8099917 (señalado con un recuadro rojo). En el diagrama superior se muestra un control homocigota TT, en el medio un control heterocigota TG y en el inferior un control homocigota GG.

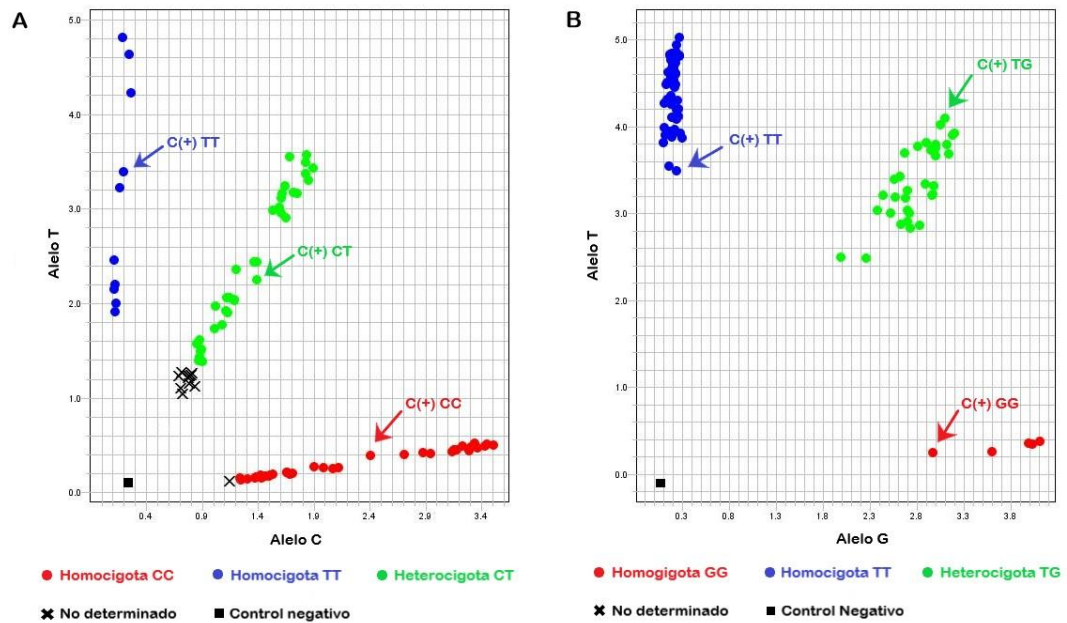


Figura suplementaria 2. Plot de discriminación alélica por PCR a tiempo real de muestras del grupo control (no infectados, n total = 103). Resultado obtenido con el *software* StepOne Plus v2.2.2. Los diferentes genotipos se indican con círculos coloreados acorde a la fluorescencia emitida, que se corresponde con las sondas utilizadas para cada alelo. Los controles negativos emiten fluorescencia basal únicamente (indicados con cuadrados negros). Los respectivos controles positivos se indican con flechas de color. **A)** rs12979860. Se utilizaron cebadores, sondas MGB y condiciones previamente descritas (Angulo et al. 2013). El poder discriminatorio de los genotipos no es óptimo para 11 muestras cuyos genotipos quedan indeterminados (se indican con cruces negras). **B)** rs8099917. Todas las muestras pudieron ser genotipadas correctamente mediante el ensayo TaqMan SNP prediseñado, número de referencia (AB) C_11710096_10 (Applied Biosystems).

Tabla Suplementaria 9. Tablas de contingencia para el análisis del HWE en la población control.

SNP	Genotipos Observados	Genotipos Esperados	Test χ^2	p valor ^a
<i>rs12979860, n</i>			0,222	0,895
CC	42	41		
CT	39	41		
TT	11	10		
<i>rs8099917, n</i>			0,049	0,976
TT	56	55		
TG	31	32		
GG	5	5		

^a Un $p \geq 0,05$ indica que no hay diferencias significativas entre la distribución de genotipos observados versus esperados, y por tanto, que los SNPs se encuentran en HWE

Tabla Suplementaria 10. Genotipos del SNP rs12979860 de acuerdo a las características de los pacientes infectados

Variable	CC (n=23)	CT (n=37)	TT (n=18)	Test Estadístico	p valor
<i>Sexo, n (n=78)</i>				χ^2 0,689	0,709
Masculino	15	21	12		
Femenino	8	16	6		
<i>Genotipo viral, n (n= 60)</i>				χ^2 3,912	0,418
				Exacto de Fisher	0,328
GT1	14	22	9		
GT2	1	1	1		
GT3	1	6	5		
<i>Estadío de fibrosis, n (n=49)</i>				χ^2 5,014	0,542
				Exacto de Fisher	0,605
1	2	7	1		
2	2	6	2		
3	0	4	1		
4	9	10	5		

χ^2 test de Chi-cuadrado

Tabla Suplementaria 11. Genotipos del SNP rs8099917 de acuerdo a las características de los pacientes infectados

Variable	TT (n=45)	GT (n=22)	GG (n=11)	Test Estadístico	p valor
<i>Sexo, n (n=78)</i>				χ^2 0,892	0,640
Masculino	26	14	8	Exacto de Fisher	0,644
Femenino	19	8	3		
<i>Genotipo viral, n (n=60)</i>				χ^2 0,698	0,951
G1	25	14	6	Exacto de Fisher	1,000
G2	2	1	0		
G3	7	3	2		
<i>Estadío de fibrosis, n (n=49)</i>				χ^2 4,239	0,644
1	5	5	0		
2	5	3	2		
3	3	2	0		
4	15	7	2		

χ^2 test de Chi-cuadrado

Tabla Suplementaria 12. Prevalencia del genotipo favorable de rs12979860 - CC reportada de pacientes infectados por VHC de acuerdo a la etnia

Población infectada por VHC, % (n total)	Etnia	Publicación
33,3 (2582) – 37,2 (1171)	Caucásicos	(Thompson et al. 2010; Mangia et al. 2016)
22,9 (105) – 29,3 (116)	Hispánicos	(Thompson et al. 2010; Mangia et al. 2016)
10,4 (48) – 14,0 (300)	Africanos americanos/negros	(Thompson et al. 2010; Mangia et al. 2016)
49,2 (181)	Asiáticos	(Mangia et al. 2016)

APÉNDICES

Tabla Suplementaria 13. Cebadores utilizados para la amplificación y la secuenciación de la región que codifica para NS3

Objetivo ^a	Nombre	Sentido ^b	Secuencia 5' - 3' ^c	Posición en el genoma ^d	Referencia		
NS3 Completa por PCR semi-anidada y anidada ó One-Step	p519fw	fw	TCCTTCCTYGTGTTCTTCTG	2640 - 2659	Vicenti et al., 2012		
	p520rv	rv	GCCTTCTGYTTGAAAYTGCTC	5517 - 5536			
	p525fw	fw	CCCGTCTCYGCCCGWAGG	3342 - 3359			
	p523rv	rv	GCACTCYTCCATCTCATCGAA	5454 - 5474			
NS3 completa por PCR subtipo específica	Subtipo 1a	NS3_1aF_ext	fw	ATGGARACCAAGCTCATCACG	3276 - 3298	Modificados de Chusri et al., 2015	
		NS3_1aR	rv	C YACTATGACCACGCAGCC	5373 - 5392		
	Subtipo 1b	NS3_1bF_ext	fw	CCGT Y GTCTTCTCTGA Y ATGG	3259 - 3279		
		NS3_1bR	rv	AGGTGCT V GTGACGACCTC	5301 - 5319		
	Subtipo 3a	NS3_3aF_ext	fw	GYCTYAAAGACCTAGCAGTRGC	3229 - 3250		Esta tesis
		NS3_3aR	rv	A R G T R CTGGTGGTYACTT	5302 - 5319		Modificado de Chusri et al., 2015
NS3 parcial por PCR One-step y anidada	Subtipo 1a	P1aF1	fw	CCTYTCCRRATGGAGACCAA	3266 - 3286	Modificados de Peres-da-Silva et al., 2010	
		P1aR1	rv	AC Y TT R TAGCC Y TGRG CY GC	4074 - 4093		
		P1aF2	fw	CT Y ATCACGTGGGGGGCRGA	3288 - 3307		
		P1aR2	rv	TT R GTGCT Y TRCCGCTGCC	4038 - 4057		
	Subtipo 1b	P1bF1	fw	GCCCGT C RTCTT Y TCTGACATGG	3257 - 3279		
		P1bR1	rv	TTGTACCCTTGGGCTGC R TA	4071 - 4090		
		P1bF2	fw	TCATCACCTGGGGGGC R GAC	3289 - 3308		
		P1bR2	rv	GTGCT Y TTGCCGCT R CC R GT	4035 - 4054		
Secuenciación	p527fw	fw	GACCCYACCTTYACCATTGAGAC	4740 - 4762	Vicenti et al., 2012		
	p528rv	rv	AGRTGYCTCCCCCCTTGAT	4494 - 4513			
	p529rv	rv	TRGTGCTCTTRCCGCTGCC	4038 - 4056			
	p530rv	rv	AGCCCGCGTCATAGCACTC	4896 - 4914			

^a Para secuenciación también se emplearon los cebadores de los segundos *rounds* o de la *One-Step*

^b fw: forward; rv: reverso

^c Las modificaciones introducidas se indican en letra itálica y negrita

^d Respecto a la cepa de referencia 1a, H77, N° de Acceso al *GenBank*: AF009606

Tabla Suplementaria 14. Secuencias de NS3 utilizadas para generar las secuencias consenso mundiales (referencias para los análisis de sustituciones).

Genotipo	País	N° de Acceso al GenBank					
1a	Alemania	EU256107	EU687193	EU862824	JQ914272	JQ914274	EU482873
		EU482832	EU687194	EU862832	JQ914273	KC155254	EU687195
	Australia	JQ417894	JX437292				
	Brasil	EF032886	EF032896	EF032900	EF032887	EF032898	
	China	KC844049					
	España	DQ068178	DQ068179	DQ068180	DQ068181	DQ068182	
		AF009606	DQ889303	EU155339	EU255937	EU781746	DQ889301
		DQ838739	DQ889319	EU155340	EU255942	EU862827	EU155338
		DQ838745	EF032883	EU155341	EU255965	FJ024274	EU255936
		DQ889252	EF032884	EU155342	EU255966	FJ024275	EU255975
	Estados Unidos	DQ889262	EF032885	EU155343	EU255967	FJ390394	DQ889292
		DQ889263	EU155214	EU155344	EU255968	JX463525	EU155238
		DQ889267	EU155215	EU234063	EU255969	JX463526	EU255935
		DQ889280	EU155236	EU234064	EU255970	JX463530	EU255973
		DQ889291	EU155237	EU234065	EU255971	JX463586	
	Italia	JN704198	JN704293				
	Japón	D10749					
	Nueva Zelanda	JX437282	JX437299				
	Suiza	EU155345	EU155355	EU255946	EU482853	EU482858	EU155352
EU155346		EU255943	EU255947	EU482854	EU660385	EU255945	
EU155350		EU255944	EU256071	EU482857	EU862836	EU256073	
No documentado	AB520610	EU781805	EU781809	EU781810	EU781811	EU781807	
	AJ278830						
1b	Alemania	AJ238799	AJ132997	EU155381	EU482833	U45476	
	Australia	AJ000009					
	Brasil	EF032892	EF032893	EF032894			
	China	AY587016	GU451219	GU451224	HQ639947	KC844052	GU451218
		D10934	GU451220	HQ639946	KC844051	L02836	GU451223
	Corea del Sur	U01214	U16362				
		EF407459	EF407485	EU155224	EU155330	FJ024277	EF407483
		EF407460	EF407498	EU155235	EU155331	FJ390397	EU155219
	Estados Unidos	EF407470	EF407500	EU155262	EU155332	FJ390398	EU155326
		EF407471	EU155217	EU155263	EU155334	FJ478453	
		EF407472	EU155218	EU155325	FJ024086	HQ110091	
	Francia	JN120912					
	Irlanda	AB154177	AB154179	AB154181	AB154191	AB154192	AB154190
		AB154178	AB154180				
	Japón	AB049087	AB429050	AF165054	D50480	D89815	D50482
		AB049088	AF165045	AF207753	D50481	M58335	X61596
		AB249644	AF165046	AF207754			
	Rusia	AF176573	AY587844				
	Suiza	EU155356	EU155360	EU155362	EU155364	EU155376	EU155358
EU155357		EU155361	EU155363	EU155368	EU482875		
Taiwan	DQ071885	M84754					
Turquía	AF483269						
No documentado	AB080299	AF313916	D85516	EU781827	EU781830	AB779679	
	AB691953	AF356827	EU781825	EU781828	EU781831	D45172	
	AB779562	D30613	EU781826	EU781829	M96362		
3a	Alemania	X76918					
	China	HQ639942	HQ639942	KC488041			
	Estados Unidos	AY956467	DQ430819	DQ430820			
	India	JQ717254	JQ717257	JQ717259	KF035124		
	Nueva Zelanda	D17763					
	Reino Unido	GQ356200	GQ356204	GQ356208	GQ356212	GQ356215	GQ356203
		GQ356201	GQ356205	GQ356209	GQ356213	GQ356216	GQ356207
		GQ356202	GQ356206	GQ356210	GQ356214	GQ356217	GQ356211
	Suiza	DQ437509					
	No documentado	AB691595	AB691596	AB792683	AF046866	D28917	

Tabla Suplementaria 15. RASs halladas en las secuencias consensos de NS3 obtenidas por secuenciación poblacional.

Muestra	Tratamiento ^a	WT	Residuo	Variante	Resistencia a DAAs ^b	Referencias
GT1a						
02	Naïve	Q	80	K	ASV, PTV, SMV, VOX	(Bae et al. 2010; McPhee et al. 2012; Janssen Products 2013; Lenz et al. 2013; AbbVie Inc 2014; Pilot-Matias et al. 2015; Verbinnen et al. 2015; Bristol-Myers Squibb 2016; Dvory-Sobol et al. 2017)
		S	122	G	VOX	(Dvory-Sobol et al. 2017)
20	PR	Q	80	K	ASV, PTV, SMV, VOX	Idem anterior Q80K
22	PR	Q	80	R	SMV, VOX	(Lenz et al. 2010; Lagacé et al. 2012; Janssen Products 2013; Verbinnen et al. 2015; Dvory-Sobol et al. 2017)
23	Naïve	S	122	G	VOX	Idem anterior S122G
28	PR	Q	80	K	ASV, PTV, SMV, VOX	Idem anterior Q80K
31	PR	Q	80	R	SMV, VOX	Idem anterior Q80R
35	DAAs	V	36	L	ASV, BOC, GZV, SMV, TVR, VOX	(Zhou et al. 2008; Lenz et al. 2010; Kieffer et al. 2012; McPhee et al. 2012; Ogert et al. 2013; Lenz et al. 2013; Sullivan et al. 2013; Howe et al. 2014; Dvory-Sobol et al. 2017)
GT1b						
10	PR	R	117	H	BOC, TVR	(Susser et al. 2012)
		S	122	R	SMV	(Janssen Products 2013; Lenz et al. 2013; Verbinnen et al. 2015)
13	PR	R	117	H	BOC, TVR	Idem anterior R117H
15	Naïve	Q	80	K	ASV, SMV, VOX	(Bae et al. 2010; McPhee et al. 2012; Janssen Products 2013; Lenz et al. 2013; Verbinnen et al. 2015; Bristol-Myers Squibb 2016; Dvory-Sobol et al. 2017)
		S	122	G	VOX	Idem anterior S122G
16	Naïve	T	54	S	BOC, TVR, VOX, VPV	(Susser et al. 2009; Bae et al. 2010; Lenz et al. 2010; Kieffer et al. 2012; Ogert et al. 2013; Sullivan et al. 2013; Barnard et al. 2013; Dvory-Sobol et al. 2017)
		R	117	H	BOC, TVR	Idem anterior R117H
24	Naïve	Y	56	F	GZV	(Merck & Co. Inc 2016)

^a PR: IFN- α -peg/RBV; DAAs: Viekira Pak (Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir/Dasabuvir)

^b ASV: Asunaprevir, BOC: Boceprevir, GZV: Grazoprevir, PTV: Paritaprevir, SMV: Simeprevir, TVR: Telaprevir, VOX: Voxilaprevir, VPV: Vaniprevir. ASV, BOC, PTV, SMV, TVR y VPV - IPs de 1a generación; GZV y VOX - IPs de 2da generación. La mayoría de las RASs a VOX y VPV, así como la RAS S122G generan resistencia únicamente en combinación con otras.

Tabla Suplementaria 16. Sustituciones aminoacídicas en la región NS3 de VHC, no asociadas *a priori* con resistencia a DAAs

Subtipo 1a				Subtipo 1b				Subtipo 3a			
Residuo	wt	variante	<i>n</i>	Residuo	wt	variante	<i>n</i>	Residuo	wt	variante	<i>n</i>
5	A	T	1	7	S	A	7	7	A	T	1
7	A	G	1	13	L	I	1	24	R	K	1
9	Q	H	1	13	L	M	1	47	T	A	1
16	C	S	1	14	L	F	4	48	V	I	1
18	I	V	2	18	I	V	2	52	I	M	2
27	N	S	1	26	K	R	1	67	A	V	1
33	V	I	2	26	K	N	1	98	A	T	1
40	A	T	4	33	V	I	1	102	S	A	2
46	T	S	5	49	N	S	1	143	V	I	1
48	I	V	2	58	G	V	1	166	S	A	1
52	C	F	1	61	S	A	1	224	N	T	1
61	T	S	3	71	I	V	4	249	D	E	1
64	I	L	4	72	T	I	5	253	R	G	1
67	P	S	2	72	T	N	1	256	N	T	1
68	K	N	2	86	Q	P	2	263	A	G	1
71	V	I	4	87	A	S	2	269	T	P	1
82	L	I	1	94	L	M	1	280	S	F	1
86	P	A	2	101	S	G	1	284	Y	H/N	1
86	P	T	2	102	S	T	1	287	I	F	1
89	Q	P	1	132	V	I	7	289	C	W	1
94	L	M	1	150	A	V	3	291	E	G	1
96	P	A	1	153	I	V	2	292	C	G	1
98	T	S	1	176	E	A	1	297	A	V	1
98	T	A	1	189	S	A	1	298	T	S	1
119	R	Q	1	196	T	A	1	312	T	A	1
124	G	A	1	197	F	Y	3	357	A	S	1
127	L	I	1	198	Q	E	1	360	K	R	1
147	A	A	1	199	V	L	1	377	I	M	1
189	S	A	1	202	L	V	1	380	K	N	1
189	S	T	1	213	K	R	1	403	T	A	2
189	S	Y	1	246	H	Y	3	477	A	T	1
192	A	V	2	248	V	I	3	478	S	P	2
196	S	C	1	251	N	S	1	534	S	G	1
196	S	T	1	252	I	V	1	609	T	I	2
197	F	Y	1	263	A	G	1	615	I	V	1
206	T	N	1	264	P	S	6	619	L	I	2
220	A	S	1	265	I	V	1				
237	G	A	1	288	I	M	3				
240	A	V	1	295	T	V	1				
248	V	I	1	299	T	S	5				
249	D	E	1	318	V	A	1				
253	R	K	1	325	P	R	1				
263	S	F	1	337	E	Q	2				
264	P	S	3	340	A	G	2				
300	I	V	1	340	A	S	1				
317	L	M	1	342	S	C	1				
329	V	I	7	343	N	T	1				
330	T	R/S	1	344	T	A	1				
332	P	L	1	344	T	I	1				
332	P	R	1	356	I	L	2				
332	P	S	1	356	I	V	1				
339	V	A	1	360	K	R	1				
339	V	I	1	371	K	R	1				

340	A	G	2
354	I	F	1
358	A/V	T	1
371	K	R	2
379	A	V	1
383	A	G	1
384	L	Q	2
386	I/V	L	2
399	V	A/I/T	1
399	V	I	1
402	T	A	1
460	Q	L	1
470	P	Q	1
472	I	T	1
490	V	I	2
507	A	S	1
520	P	S	1
556	N	T	1
572	Q	R	1
580	Q	L	1
586	I	T	4
586	I	V	1
593	H	Q	1
595	P	S	1
609	V	I	5
629	V	I	1

Total= 79
sustituciones

375	D	N	1
377	L	F	1
380	K	Q	1
382	S	T	1
383	G	A	1
383	G	S	6
386	L	I	2
402	T	A	3
402	T	S	1
403	S	N	1
405	D	N	1
418	F	Y	3
431	C	S	1
433	T	I	1
449	T	S	1
457	S	T	1
470	G/R	M	1
470	G/R	A	2
492	C	R	1
510	S	T	1
511	V	L	1
523	P	S	1
529	L	V	1
534	S	G	4
540	T	S	1
555	D	E	1
561	V	T	3
566	Q/R	T	2
570	R	K	1
572	Q	L	1
586	I	T	4
610	T	I	2
611	L	F	1
614	P	H	1
615	I	V	3
620	M	S	1
630	V	A	1

Total= 90
sustituciones

Total= 36
sustituciones

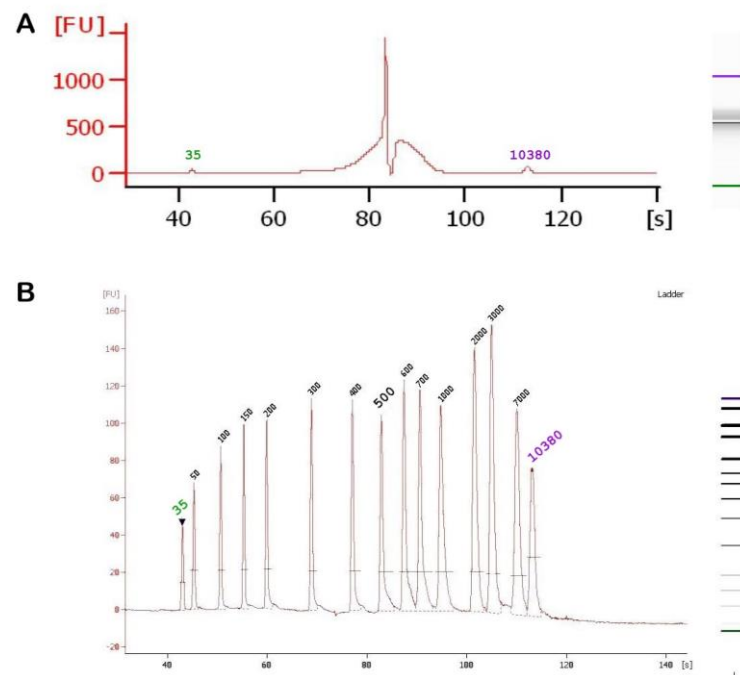


Figura suplementaria 3. Resultado de la calidad de una librería analizada mediante Bioanalyzer. Electroferogramas (izquierda) y geles (derecha) obtenidos con la muestra 01, como ejemplo **(A)** así como el peso molecular **(B)**. En el eje de las Y se grafican las unidades relativas de fluorescencia (FU) y en el eje de las X el tiempo de corrida en segundos (s) que correlaciona con el tamaño.

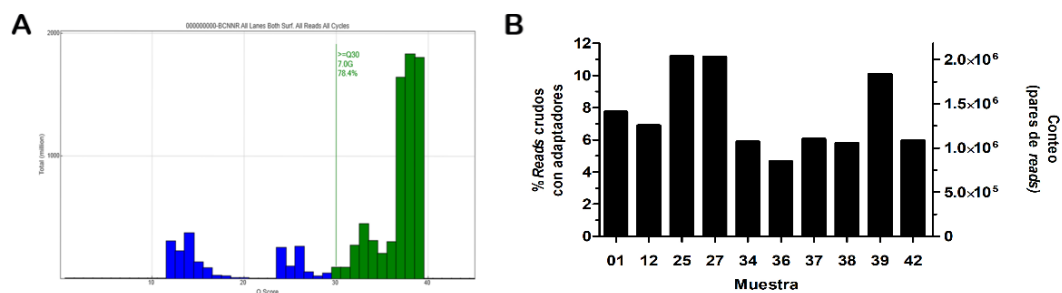


Figura suplementaria 4. Datos masivos obtenidos de la secuenciación. **A)** Calidad de las bases secuenciadas con el equipo MiSeq de Illumina. En el eje de las Y se grafican las bases secuenciadas y en el de las X la calidad. En verde se indican todas aquellas cuya calidad es $\geq Q30$, lo cual corresponde con el 78,4% de las bases secuenciadas. **B)** Conteo y porcentaje de *reads* crudos por muestra (incluye *reads* de las 4 regiones genómicas). Se obtuvieron 17.656.120 *reads* con adaptadores en ambos extremos (correspondiente al 97,0% de los *reads* totales). Gráfico realizado con el software GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA USA, www.graphpad.com).

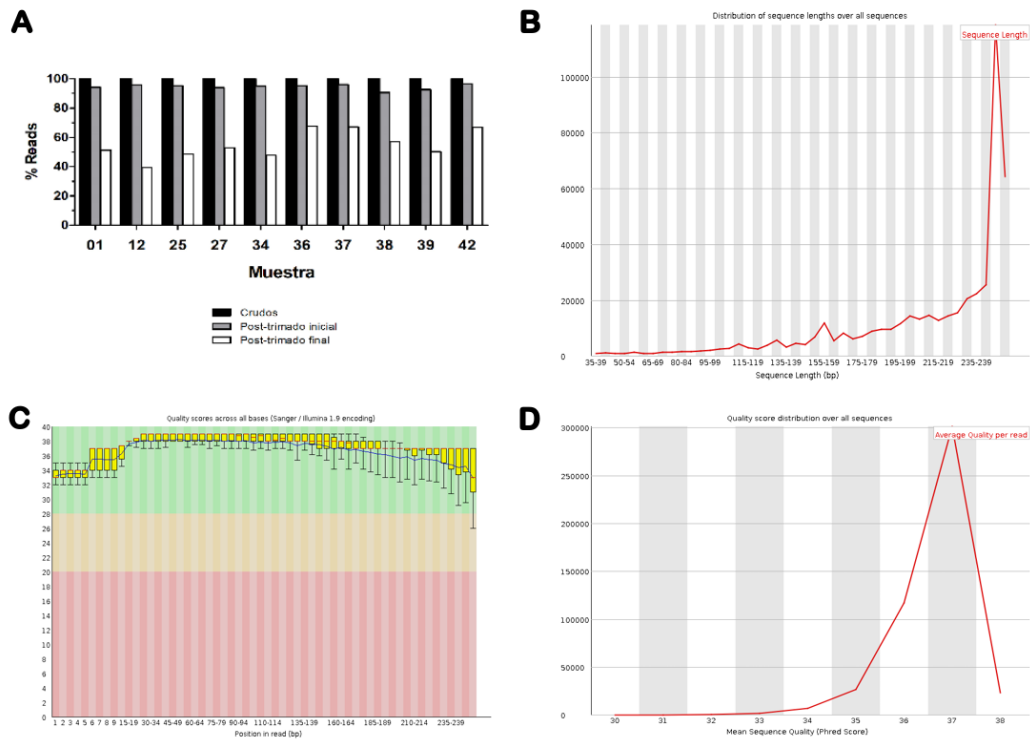


Figura suplementaria 5. Control de calidad de los datos de secuenciación masiva. A) Porcentaje de *reads* post-trimado de adaptadores, cebadores y aquellos *reads* con un promedio de calidad <Q25, relativo a la cantidad de *reads* crudos de cada muestra, considerada como 100%. Gráfico realizado con el software GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA USA, www.graphpad.com). (B a D) Ejemplo de resultados de *reads* crudos (*reads forward* de muestra 01), analizados con el programa FastQC (Andrews 2010). Todas las muestras rindieron resultados similares. **B)** Tamaño de los *reads* filtrados, donde la mayoría son de 245-249pb. **C)** Valores de calidad en cada una de las posiciones de los *reads*. La mayoría se encuentran en el área verde, y por encima de Q30. **D)** Valores de calidad promedio de los *reads* filtrados, donde la mayoría presenta valores altos (Q37).

Tabla Suplementaria 17. Conteo y porcentajes de reads crudos y trimados obtenidos de la secuenciación masiva (conteo individual)

Muestra	Reads sin filtrar [n]	Reads post-trimado inicial [n (%)]	Reads post-trimado final [n (%)]
01	2731852	2570014 (94,1)	1398322 (51,2)
12	2431694	2329456 (95,8)	960467 (39,5)
25	3951016	3764785 (95,3)	1918955 (48,6)
27	3940796	3703387 (94,0)	2081663 (52,8)
34	2073176	1970169 (95,0)	992400 (47,9)
36	1642836	1567030 (95,4)	1108825 (67,5)
37	2137842	2052919 (96,0)	1438569 (67,3)
38	2043616	1853538 (90,7)	1168951 (57,2)
39	3561138	3298625 (92,6)	1786561 (50,2)
42	2102770	2029291 (96,5)	1406988 (66,9)

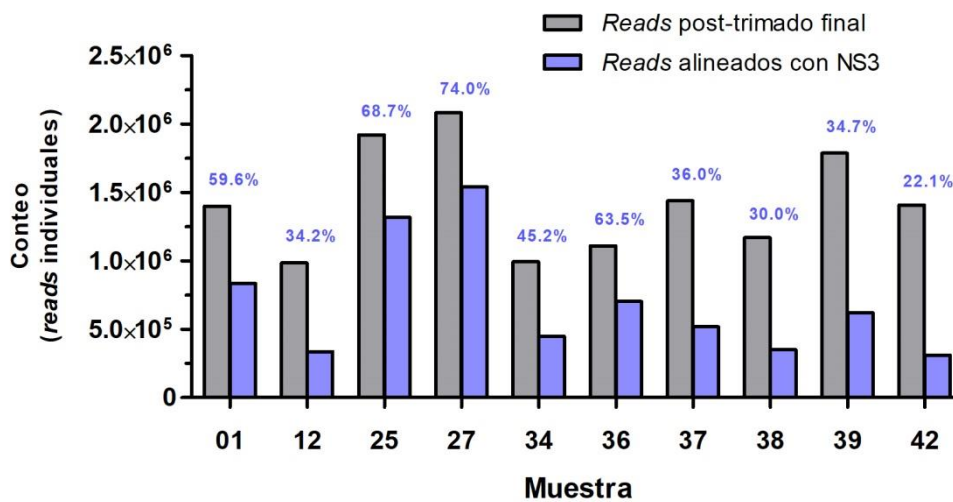


Figura suplementaria 6. Conteo y porcentajes de reads filtrados que alinearon efectivamente con NS3.

Tabla Suplementaria 18. Cebadores utilizados para generar mutantes únicos por mutagénesis sitio dirigida

Mutante	Genotipo	Nombre	Secuencia 5' - 3'
U61C	3a	U61C_3a_F	AGGAACTTCTG C CTTCACGCGG
		U61C_3a_R	TCCGCGTGAAG G CAGAAGTTCC
A73G	1a	A73G_1a_F	TCACGCAGAG A GCGTCTAGCC
		A73G_1a_R	CTAGACGCT C TCTGCGTGAAG
A85G	1a	A85G_1a_F	GCGTCTAGCC G TGGCGTTAG
		A85G_1a_R	ACTAACGCCA C GGCTAGACG
A119C	1a y 3a	A119C_F	CCTCCAGG C CCCCCCTC
		A119C_R	AGGGGGGG G CCTGGAGGC
G203A	3a	G203A_3a_F	CTTTCTTGGA A CAACCCGCTC
		G203A_3a_R	GAGCGGGTTG T TCCAAGAAAG
A204C	1a	A204C_1a_F	GTCCTTTCTTG A T C AACCCGCTCAATGC
		A204C_1a_R	GCATTGAGCGGGTT G ATCCAAGAAAGGAC
A204U	1a	A204U_1a_F	TTCTTG A T A ACCCGCTCAATGC
		A204U_1a_R	GAGCGGGTT A ATCCAAGAAAGGAC
Ins207A	3a	Ins207A_3a_F	TTTCTTGAGCAA A CCCGCTCAATACCC
		Ins207A_3a_R	GGTATTGAGCGGG T TGCTCCAAGAAAG
G243A	3a	G243A_3a_F	TGCCCCG C AAGATCACTAG
		G243A_3a_R	TAGTGATCTTGCGGGGGCAC
U248C	1a	U248C_1a_F	CCGCAAGAC C GCTAGCCGAG
		U248C_1a_R	TCGGCTAGC G GCTTGCGGG
C340U	1a	C340U_1a_F	AGACCGTGCATCATGAGCAC
		C340U_1a_R	CGTGCTCAT G ATGCACGGTC
del367G	1a	del367_1a_F	CCTAAACCTCAAA-AAAAACC
		del367_1a_R	ACGTTTGGTTTTT-TTTGAGG

Las mutaciones introducidas se indican en letra negra, la delección se indica con un guión. La numeración es acorde a la cepa H77.

APÉNDICES

Tabla Suplementaria 19. Cebadores utilizados para la generación y la secuenciación de mutantes en el SL IV del IRES.

Mutante	Objetivo ^a	Nombre	Sentido ^b	Secuencia 5' - 3' ^c	Diseño ^d
Todos	P1 y PF	JL-P-0280-F	Fw (promotor T7)	CGTTGTAAAACGACGGCCAGTGA	Joseph Luna
	P2 y PF	RU-O-16514	Rv (E1)	CATCGCGTACGCCAAGATCATG	RiceLab
A	P1	JL-P-0282-R	rv	GTTTAGGA AG TGTGCTCATG TT GCACGGTCTACGAGACCTC	Joseph Luna
	P2	JL-P-0288-F	fw	GTGCA AC ATGAGCAC ACT TCCTAAACCTCAAAGAAAAACC	Joseph Luna
B	P1	JL-P-0284-R	rv	GTTTAGGA AG TGTGCTCATGGTGCACGGTCTACGAGACCTC	Joseph Luna
	P2	JL-P-0290-F	fw	GTGCACCATGAGCAC ACT TCCTAAACCTCAAAGAAAAACC	Joseph Luna
C	P1	RU-O-24005	rv	GTTTAGGATTTGTGCTCATG TT GCACGGTCTACGAGACCTC	Esta tesis
	P2	RU-O-24006	fw	GTGCA AC ATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACC	Esta tesis
D	P1	RU-O-24008	rv	GTTTAGGATTT GTGCTT TGTGCTCATGGTGCACGGTCTACGAGACCTC	Esta tesis
	P2	RU-O-24007	fw	GTGCACCATGAGCAC AGCAC AAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACC	Esta tesis
E	P1	RU-O-24044	rv	GTTTAGGATTTGTGC NCATNNN GCACGGTCTACGAGACCTC	Esta tesis
	P2	RU-O-24043	fw	GTGC NNN ATG NG CACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACC	Esta tesis
Todos	Secuenciación	M13F	fw (promotor T7)	GTAAAACGACGGCCAGT	Cebador Universal
		RU-O-17104	rv (core)	CGCCGATCTTTAGGGATGGGC	Yingpu Yu
		RU-O-7086	fw (core)	TGGGCAGGATGGCTCCTGTC	RiceLab
		RU-O-17131	rv (E2)	GGCCAACAGAAGGATGAC	Yingpu Yu

^a **P1**: PCR1; **P2**: PCR2; **PF**: Producto final de Overlap-PCR

^b **fw**: forward; **rv**: reverso; entre paréntesis se indica la región de hibridación para los cebadores de secuenciación

^c Las mutaciones introducidas se indican en letra negrita color violeta

^d Joseph Luna y Yingpu Yu son post-docs del RiceLab; para el cebador RU-O-7086 se desconoce qué miembro del RiceLab lo diseñó

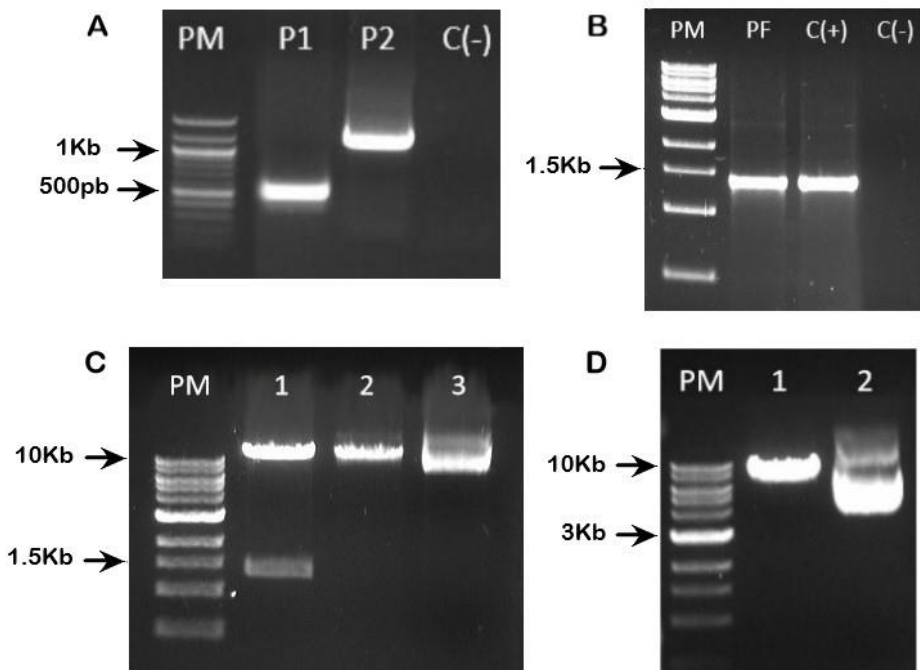


Figura suplementaria 7. Ejemplos de geles de agarosa con los productos de PCR y las digestiones de diferentes vectores empleados durante el Objetivo específico N° 5. **A)** Gel al 1.5% con los productos de la PCR1 (P1 – 404pb) y PCR2 (P2 – 1021pb) para generar uno de los mutantes. PM: 100pb (New England Biolabs). C(-): Control negativo de PCR (agua DEPC). Las PCRs 1 y 2 no contaban con controles positivos ya que los mismos vectores que se querían mutar eran el templado para amplificar con cebadores que incorporaban las mutaciones. **B)** Gel al 1.5% con el producto final (PF – 1399pb) de la *Overlap-extension* PCR. PM: 1Kb (New England Biolabs). C(+): vector pGNN amplificado con los cebadores JL-P-0280-F y RU-O-16514. C(-): Control negativo de PCR (agua DEPC). **C)** Gel al 1% en el que se muestran diferentes digestiones: en el carril 1, la digestión de un vector pGNN-m15-Mutante con las enzimas *EcoRI* y *BsiWI* para verificar la presencia del inserto; en el carril 2, la linearización de dicho vector con la enzima *XbaI* para generar el templado para la transcripción *in vitro*; y en el carril 3, el vector sin digerir como control (12985pb). PM: 1Kb (New England Biolabs). **D)** Gel al 1% en el que se muestra la linearización del vector monocistrónico de FLuc (pFLuc:DEST40, aproximadamente 7150pb) en el carril 1, mientras que el carril 2 es el control sin digerir. PM: 1Kb (New England Biolabs).

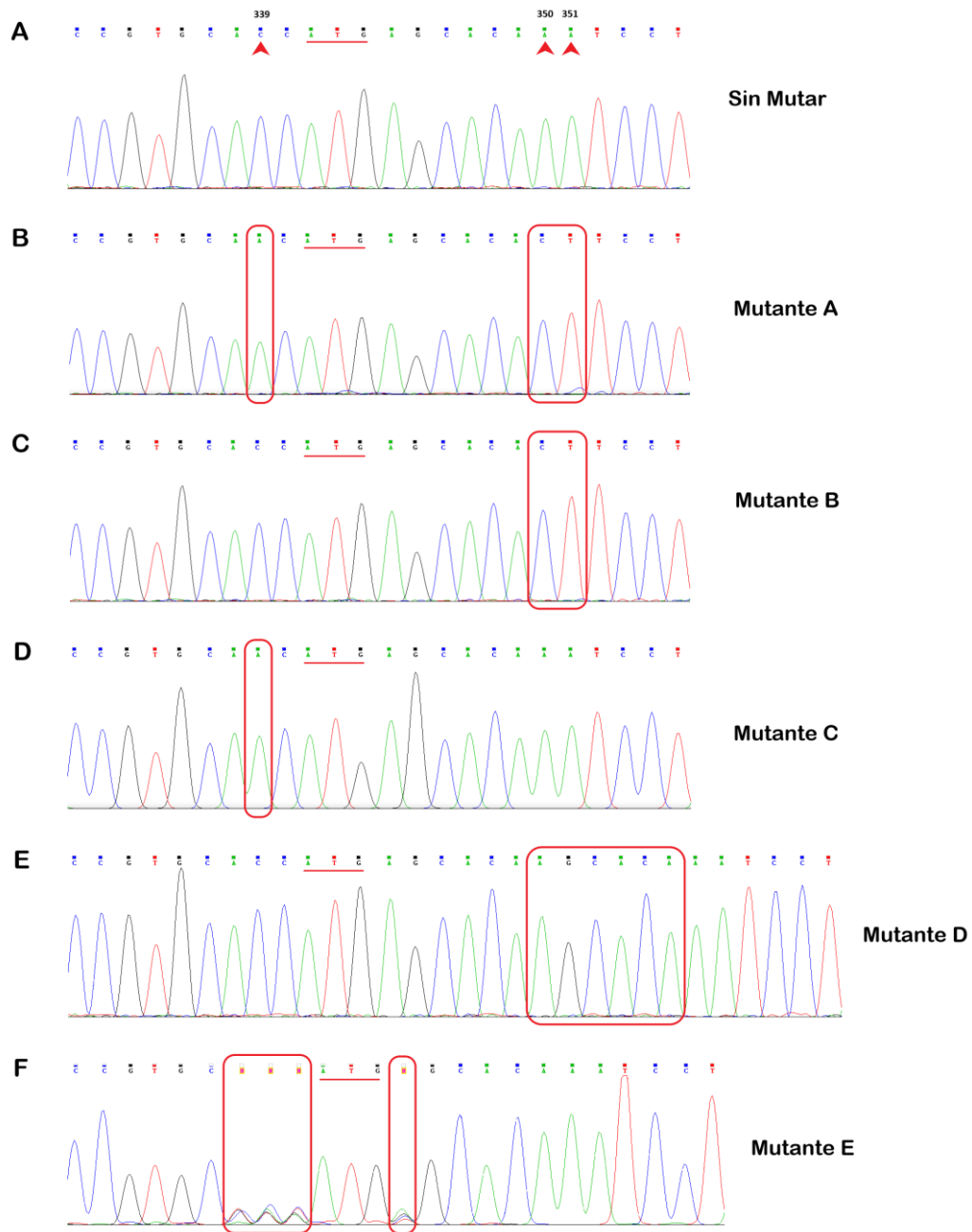


Figura suplementaria 8. Cromatogramas de la región correspondiente al SL IV del IRES de VHC en los diferentes mutantes generados. Cromatogramas obtenidos de los plásmidos enviados a secuenciar a Macrogen USA. En todos los casos se subraya en rojo el codón inicio. En los paneles B – F se enmarcan en rojo las posiciones mutadas. **A)** Secuencia del vector pGNN sin mutaciones. Con cabezas de flechas rojas se señalan las posiciones que se mutaron (339, 350 y 351) para generar los Mutantes A, B y C. **B)** Mutante A: C339A + AA350-351CU. **C)** Mutante B: AA350-351CU. **D)** Mutante C: C399A. **E)** Mutante D: Inserción AGCACA a partir de la posición 351. **F)** Mutante E: posiciones 338,339,340 y 344 mutadas al azar (cualquiera de los 4 nucleótidos: N).

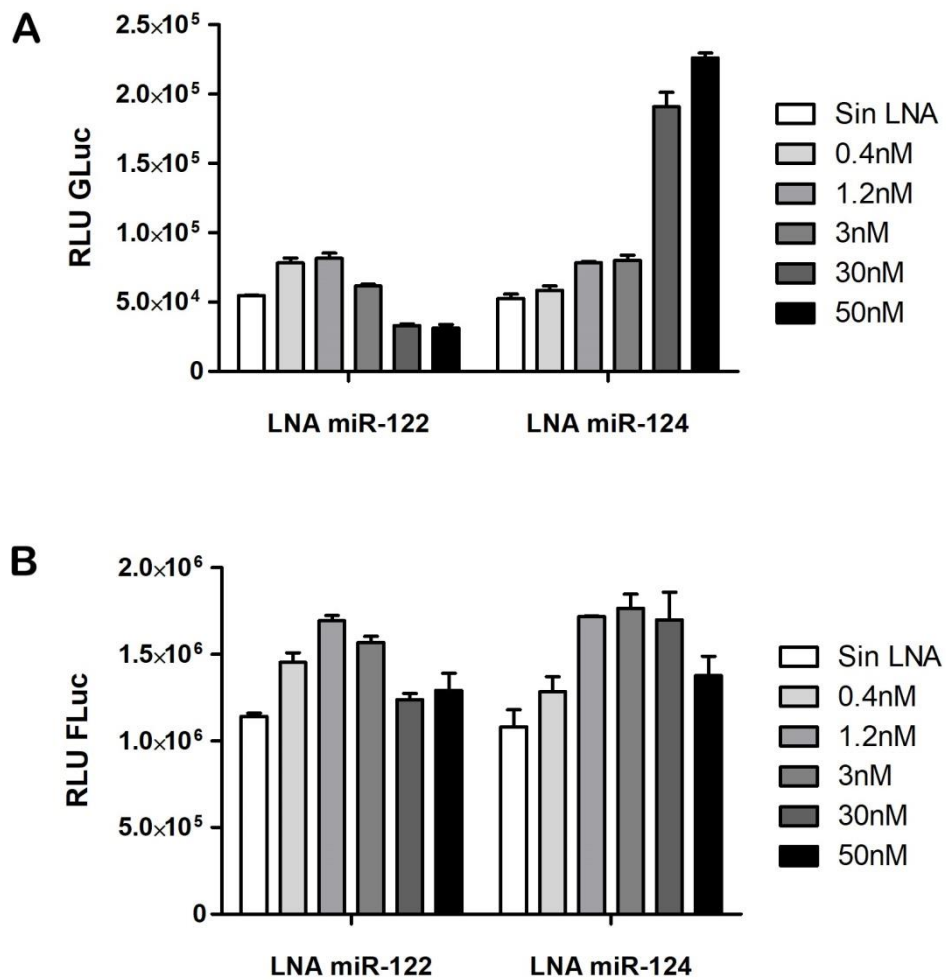


Figura suplementaria 9. Bioluminiscencia emitida por el ARN viral reportero (GLuc) y el de FLuc sometidos a diferentes concentraciones de inhibidores (LNA) de miR-122 o miR-124. Valores crudos de luminiscencia (RLU) emitidos por el ARN viral reportero (que expresa GLuc) (**A**) y por el ARN de FLuc (**B**) en presencia de diferentes concentraciones de inhibidores de miR-122 o miR-124. El patrón de emisión de FLuc es similar sin importar qué inhibidor se encuentre presente, mientras que GLuc aumenta considerablemente en presencia de LNA miR-124 a concentraciones iguales o mayores a 30nM. Resultado de un experimento con dos réplicas técnicas. Gráficos generados con el *software* GraphPad Prism versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA USA, www.graphpad.com).

11.2. Publicaciones derivadas de esta tesis

Echeverría N, Betancour G, Gámbaro F, Hernández N, López P, Chiodi D, Sánchez A, Boschi S, Fajardo A, Sóñora M, Moratorio G, Cristina J, Moreno P (2016). Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: Their relevance for developing countries. *Virus Research*, 223, 140–146. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.07.008

Echeverría N, Chiodi D, López P, Sánchez A, Angulo J, López-Lastra M, Silvera P, Canavesi A, Bianchi C, Colistro V, Cristina J, Hernández N, Moreno P (2018). IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients. *Virology Journal*, 15(1), 40. DOI: 10.1186/s12985-018-0946-2



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



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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2016

Received in revised form 15 July 2016

Accepted 18 July 2016

Available online 19 July 2016

Keywords:

HCV variability

DAAs

Resistance-associated variants

ABSTRACT

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

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

¹ both authors contributed equally to this work.

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

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

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

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

2. Materials and methods

2.1. Patients and clinical samples

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

2.2. RNA extraction, cDNA synthesis and NS3 amplification

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

2.3. NS3 sequencing

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

2.4. NS3 genotype determination and sequence analysis

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

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

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

2.5. Signature pattern analysis of HCV genotype 1a

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

2.6. Mapping amino acid substitutions in NS3 3D structure

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

3. Results

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

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

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

3.2. NS3 substitution analysis

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

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

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

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

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

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

RAVs to protease inhibitors were identified in HCV isolates from 5 patients (25% of the patients enrolled in these studies). Of these, 3 patients showed only one mutation associated to DAAs resistance, while the other two showed two different mutations (Q80K and S122G) (see Table 1). The mutation Q80K, conferring resistance to simeprevir (SMV), asunaprevir (ASV) and paritaprevir (PTV), as well as to grazoprevir (GZV), and faldaprevir (FDV) was found in two patients, and an additional one has the mutation Q80L which is associated to PTV and FDV intermediate resistance. Three patients had substitutions at position 122 (S122G/R), RAVs associated to SMV resistance, and only one showed the V55A substitution which confers resistance to both boceprevir (BOC) and telaprevir (TVR). Three patients also exhibited the substitutions P334S or S342P, which were reported to emerge in some relapsers and non-responder patients to therapy including PTV (Halfon and Locarnini, 2011; Wyles, 2013; Zhang, 2016) (see Table 1).

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

3.3. Viral epidemiology signature pattern analysis

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

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

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

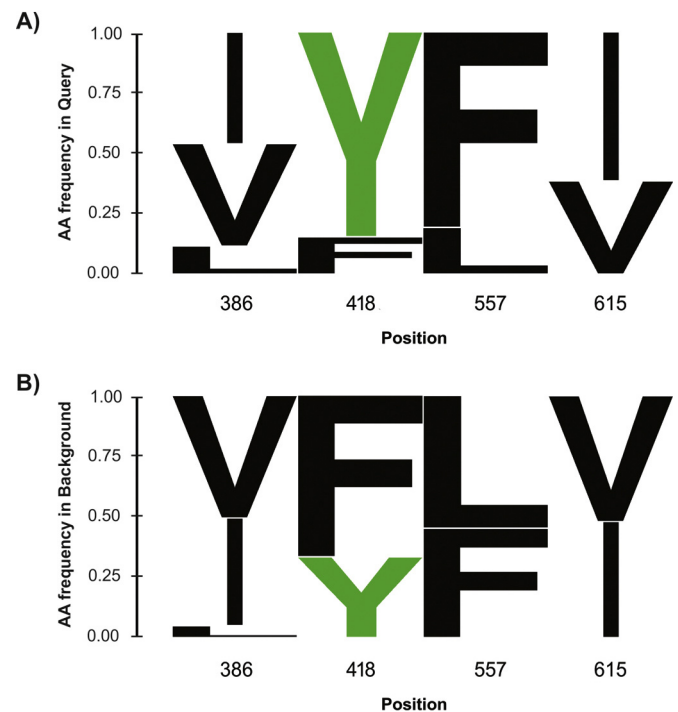


Fig. 2. Weblogo representation of the Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis (VESPA). The height of each amino acid in each position indicates its frequency. The four positions shown represent those NS3 amino acid positions for which a difference in frequencies was observed between the query (A)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

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

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

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

Most of the substitutions found are located on the surface of the protein (Fig. 3A) and do not seem to interfere with the active site of the NS3 protein (H57/D81/S139 in NS3 numbering). Importantly, these substitutions do not appear to be close enough to affect the drug binding pocket (*i.e.* residues within 3 Å of the drug molecule that bind to the active site). Substitutions V58G and H79D might represent an exception to this finding since both map in the vicinity of the catalytic triad (Fig. 3B).

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

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

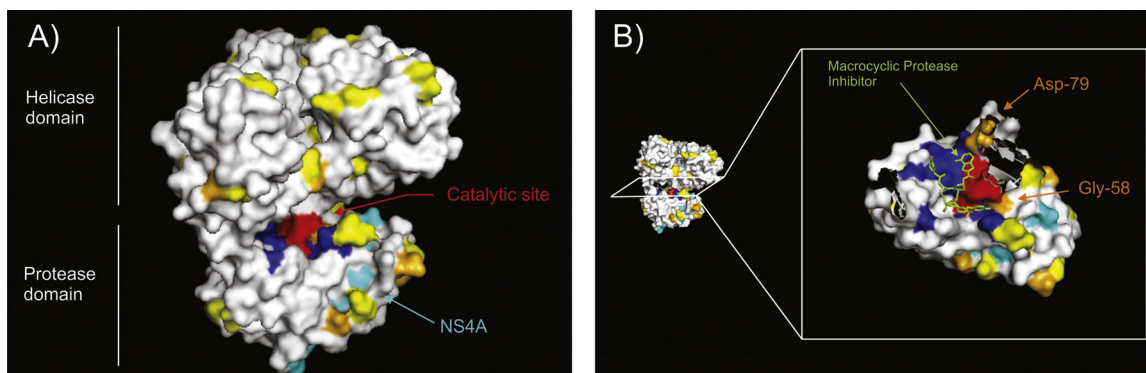


Fig. 3. Mapping of naturally occurring amino acid substitutions in NS3 protein from HCV strains isolated in Uruguay. The 3D structure model of the HCV NS3 protein shown in the figure was obtained by Schiering et al. (2011). Amino acids involved in the NS3 active site are shown in red and residues known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

4. Discussion

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

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

AA substitutions such as Q80 K, Q80L, S122G, S122 R and V55A associated with HCV genotype 1 PI resistance *in vivo* and *in vitro* were observed in 25% of our patients (5/20) (Table 1). To our knowledge this is the first report of circulation of RAVs in Uruguay. Recent studies, both analysing sequences retrieved from the Los Alamos databank as well as from GenBank, revealed that the overall prevalence of RAVs to NS3 protease inhibitors is high (40%), with most of the mutations being associated mainly to SMV resistance through the substitution Q80 K, present in around 35–37% of genotype 1a strains (Alves et al., 2013; Chen et al., 2016). Opposite to these findings, RAVs to PI seem to be less frequent in genotype 1b strains (Chen et al., 2016; Costantino et al., 2015; Paolucci et al., 2012). Nevertheless, little is known about DAA RAVs circulation in the South American region. In Brazil, different studies have found that between 3,2% and 18,9% of DAA treatment-naïve patients harboured HCV isolates with baseline RAVs (de Carvalho et al., 2014; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013). Studies carried out in Argentina revealed that only one RAV (Q80 K/L/R) was predominant in two out of 18 patients (Sede et al., 2015). The results of this study indicate the presence of DAA RAVs in 25% of the DAA treatment-naïve patients analysed, which suggests that the frequency of such mutations seems to be high in our country (Table 1). In reference to Q80 K, a mutation associated with resistance to SMV, it has been found at a high prevalence among treatment-naïve HCV carriers in the United States (46%) and in Europe (4–16%) (Nishiya et al., 2014; Vidal et al., 2016). In contrast, the frequency of Q80 K seems to be a rare event in Brazil (Hoffmann et al., 2015; Lisboa-Neto et al., 2015; Nishiya et al., 2014; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013). On the contrary, the results of the present work suggest that the presence of Q80 K is high when compared to Brazil or Argentina (de Carvalho et al., 2014; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres-da-Silva et al., 2012; Sede et al., 2015; Zeminian et al., 2013). More studies will be needed in order to address this important issue.

To date, the only drugs currently approved for triple therapy (in combination with IFN and RBV) in Uruguay are TVR and BOC, and even though their production has been worldwide discontinued, they are still available for Uruguayan patients. Although SMV and other macrocyclic drugs have not yet been approved in Uruguay, the data obtained here might prove useful if these drugs are eventually approved in this country. Recently, Uruguay approved a new therapy that involves three DAAs (with or without RBV): Ombitasvir (OBV), PTV and Dasabuvir (DSV), which target the NS5A, NS3 and NS5B, respectively. In the Uruguayan isolates analysed, the only RAV found conferring resistance to PTV was Q80L. However two emerging substitutions (P334 S and S342P) were also detected (see Table 1). Considering these data, it is of uttermost importance to address the identification of RAVs in NS5A and NS5B regions in these patients, in order to provide comprehensive information to physicians and help in therapeutic decisions.

Moreover, several other polymorphisms not associated, *a priori*, with resistance to DAAs were observed (Supplementary material Table S2). Mapping these positions in the three-dimensional structure of NS3 showed that the vast majority of these substitutions would apparently affect neither the catalytic triad nor residues involved in the zinc-binding domain (Fig. 3). More studies will be needed to confirm the possible effects of these substitutions, in particular for substitutions V58 G and H79D (Fig. 3B), which indeed map close to the catalytic triad, and since they involve changes in the physicochemical properties of the AA, they might affect the 3D structure of the binding pocket (Fig. 3).

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

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

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

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

Acknowledgments

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) [project FMV_1.2014.1.104171], PEDECIBA, Comisión Académica de Posgrados, Universidad de la República (UdelAR) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelAR, Uruguay.

Appendix A. Supplementary data

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

References

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


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

RESEARCH

Open Access



IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients

Natalia Echeverría^{1†}, Daniela Chiodi^{2†}, Pablo López³, Adriana Sanchez Ciceron², Jenniffer Angulo⁴, Marcelo López-Lastra⁴, Paola Silvera³, Adrian Canavesi², Carla Bianchi⁵, Valentina Colistro⁶, Juan Cristina¹, Nelia Hernandez^{2*} and Pilar Moreno^{1*} 

Abstract

Background: Host single-nucleotide polymorphisms (SNPs) near the interleukin 28B (*IL28B*) locus are associated with sustained virological response to antiviral therapy and with spontaneous Hepatitis C Virus (HCV) clearance. Prevalence of these SNPs varies depending on ethnicity. The impact of *IL28B* SNPs in HCV-infected patients is currently unknown in Uruguay. Therefore, the aim of this study was to evaluate and compare the distribution of polymorphisms in the *IL28B* gene (rs12979860 and rs8099917) among HCV-infected patients and healthy individuals in Uruguay and thus assess their possible association with the establishment of HCV infection.

Methods: DNA was recovered from 92 non-infected individuals and 78 HCV-infected patients and SNPs were determined by RFLP and allelic discrimination by real-time PCR.

Results: The distribution of rs12979860 genotypes for the infected population was 29.5%-CC, 47.4%-CT and 23.1%-TT and for the control group 45.7%, 42.4% and 11.9%, respectively. Prevalence in both infected and uninfected individuals is similar to that reported in other countries with admixed populations. The distribution of rs8099917 genotypes for the infected population was 57.7%-TT, 27.2%-TG and 14.1%-GG and for the control group 60.9%, 33.7% and 5.4%, respectively. The comparison of rs12979860 genotype distribution between the two populations evidenced a higher prevalence of the favourable genotype (CC) in the uninfected control group ($p < 0.05$). Additionally, results generated using logistic regression analysis show that individuals carrying rs12979860-TT or CT genotypes have a higher likelihood of developing chronic hepatitis upon infection with HCV, when compared to CC carriers, considering rs8099917 genotype as constant.

(Continued on next page)

* Correspondence: hernandez.nelia@gmail.com; pmoreno@cin.edu.uy

†Equal contributors

²Clinica de Gastroenterología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11600 Montevideo, Uruguay

¹Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2055 Montevideo, Mataojo, Uruguay

Full list of author information is available at the end of the article



(Continued from previous page)

Conclusion: Patients with HCV infection have a statistically significant lower prevalence of the favourable rs12979860 genotype when compared to uninfected individuals; therefore we can establish that only IL28B rs12979860-CT and TT genotypes seem to contribute to the occurrence of chronic HCV infection in the cohort of Uruguayan population studied. Considering that a trend towards a higher frequency of “good” response genotypes was observed in responder patients, we believe that IL28B rs12979860 genotyping could be a useful tool for predicting different therapies outcome, including in the DAA era.

Keywords: rs12979860, rs8099917, Hepatitis C, Genotypic distribution

Background

With an estimate of 71 million infected individuals worldwide, Hepatitis C virus (HCV) represents a major health problem and is currently the leading cause of cirrhosis, hepatocellular carcinoma and an indication for liver transplantation worldwide [1]. Despite the recent development of highly effective compounds, direct-acting agents (DAAs), designed to specifically block HCV replication, the combination of pegylated interferon alpha (peg-IFN- α) plus ribavirin (RBV) is still the main option for HCV treatment in several countries, including Uruguay. This therapy, however, only yields a sustained virological response (SVR) in about half of the treated patients when infected with HCV genotype 1; the most prevalent genotype in Uruguay [2–4]. The poor response to treatment, its high cost, as well as the frequent occurrence of severe side effects associated to the use of peg-IFN- α /RBV [5], highlight the relevance of enabling the means for predicting the patient’s response to antiviral therapy. This would allow an early selection of the most adequate cost-effective HCV treatment for each particular patient. Different predictors of SVR are known, some of which are linked to the virus (genotype, viral load) whereas others are linked to the host (age, sex, race, liver fibrosis, genetic factors) [6].

Among the host factors known to be associated with the outcome of HCV-treatment, specific single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located near the interleukin 28B (IL28B) gene (which codes for IFN- λ -3) have shown a significant relationship with both spontaneous virus clearance and response to peg-IFN- α /RBV treatment [7–10]. Patients carrying the “good” response genotypes (major allele in homozygosity) are more likely to resolve the infection than those carrying the “poor” response genotypes (risk allele in homozygosity or heterozygosity) [7–9]. Since its characterization, IL28B genotyping has proven useful in guiding clinicians towards the selection of the most adequate patient-personalized therapy [11]. Nevertheless the strong predictive value of these SNPs is only applicable for patients infected with HCV genotypes 1 and 4 [12, 13]. In cases of infection with genotypes 2 or 3 IL28B SNP information is valuable only for patients with detectable levels

of HCV RNA at week 4 (absence of rapid virological response) [14]. Interestingly, IL28B genotyping has also proven relevant to anticipate HCV SVR in regimens using DAAs either in combination with IFN [15–19] or in its absence [20].

Ethnicity is also a host factor that correlates with the patient’s ability to respond to antiviral treatment [21, 22]. This phenomenon has been partly explained by the prevalence of IL28B polymorphisms within different ethnic groups [23]. For example, the major C allele (“good” response allele) of rs12979860 SNP in the general population has a frequency of 0.23–0.55 among Africans, 0.53–0.80 among Europeans and 0.66–1.00 among Asians [24]. In this context, Asians and Europeans are better responders to peg-IFN- α /RBV treatment than African-descendants [22]. The case for Latin America is less clear as the prevalence of these IL28B SNPs is known only in a few countries [25–31]. Furthermore, given the admixed genetic background of the Latin American populations, it is unreasonable to assume an equivalent distribution of IL28B SNPs in all South America. In fact, when comparing different populations from Latin America a sharp difference in allele frequencies for IL28B is observed [24]. For example, the C allele is less prevalent in Mexico (0.38–0.56) than in Brazil (0.64–0.824) [24]. To date no genetic information regarding IL28B SNP prevalence is available for the Uruguayan population. Noteworthy, the Uruguayan population exhibits a European, Amerindian, and African contribution to ancestry, being the Europeans the main contributors [32]. The contribution of Amerindians and Africans to the Uruguayan ancestry largely varies throughout the country stressing the heterogeneity of this South American population [32].

Hence, the aim of this study was to determine the prevalence of IL28B polymorphisms (rs12979860 C > T and rs8099917 T > G) in treatment-naïve HCV-infected patients using uninfected individuals as controls and thus assess their possible association with the establishment of HCV infection. The results suggest that in Uruguay the prevalence of the favourable rs12979860 genotype (CC) is higher in the control group ($p < 0.05$).

Additionally, considering rs8099917 genotype constant, individuals carrying rs12979860-TT or CT genotypes have a higher likelihood of developing chronic hepatitis upon infection with HCV, when compared to CC carriers.

Methods

Study population

A cross-sectional and observational study was conducted in Uruguayan individuals with and without HCV infection, recruited between 2014 and 2015 at the Gastroenterology Clinic from Hospital de Clínicas (Control group, $n = 92$; HCV-infected group, $n = 78$). Chronic HCV-infected patients were treatment naïve and over 18 years old. All samples analysed in this study were negative for hBsAg and HIV and in the case of the control group, all individuals showed absence of reactive serology for HCV. The information obtained from the study populations included sex and age. For the HCV-infected patients virus genotype and stage of liver disease were included, if previously determined (See Table 1). Additionally, 48 of the 78 enrolled HCV-infected patients underwent dual therapy (peg-IFN- α plus RBV) during the study, 42 of which had completed it by the time of writing. SVR was defined as absence HCV RNA in serum 24 weeks after the end of treatment. Non-response (NR) to therapy was defined as HCV viral load decline less than 2 logs at week 12 during therapy or detectable serum HCV RNA at any other time during therapy. Relapse (R) was defined as undetectable level of HCV RNA by the end of treatment which becomes detectable after discontinuation of therapy. For analyses, we divided patients into two

groups: patients who achieved SVR and those who did not (NR and R).

Ethical and regulatory considerations

The study was conducted according to national and international ethical guidelines (good clinical practice, Nuremberg statements, Declaration of Helsinki) and local regulatory rules (Mercosur Standards/GMC/RES No. 129/96). The protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas on October 24th, 2014 and all patients gave written informed consent. Access to personal information was restricted to the medical doctors. The genetic information extracted from the samples was used exclusively for the purposes of this study.

Genotyping of SNPs rs12979860 and rs8099917

Genomic DNA was extracted from peripheral white blood cells by QIAamp DNA Kit (QIAGEN). All samples from HCV-infected individuals were SNP genotyped by end-point PCR amplification following restriction fragment length polymorphism analysis as previously described [33]. For rs12979860 primers used were: rs12-F 5'-GCGGAAGGAGCAGTTGCGCT-3' (sense) and rs12-R 5'-GGGGCTTTGCTGGGGGAGTG-3' (antisense). For rs8099917 primers used were: rs80-F 5'-CCCAC TTCTGGAACAAATCGTCCC-3' (sense) and rs80-R 5'-TCTCCTCCCCAAGTCAGGCAACC-3' (antisense) [33]. All samples from the control group were genotyped by real-time PCR using TaqMan SNP allelic discrimination assays carried out using StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The primers, MGB probes and conditions used to amplify rs12979860 have been previously

Table 1 Demographic characteristics of both populations studied

Variable	Total population ($n = 170$)	HCV-infected population ($n = 78$)	Uninfected population ($n = 92$)	Statistical test and value	p value
<i>Gender</i>					
Male (%)	115 (67.6)	48 (61.5)	67 (72.8)	χ^2 2.457	0.117
Female (%)	55 (32.4)	30 (38.5)	25 (27.2)		
Age (years), (mean \pm SD)	42.7 \pm 12.6	46.3 \pm 13.1	40 \pm 11.4	t = 3.230	0.002*
<i>Genotype ($n = 78$), n (%)</i>					
G1	45 (57.7)				
G2	3 (3.8)				
G3	12 (15.4)				
Not determined	18 (23.1)				
<i>Liver Stage ($n = 49$), n (%)</i>					
1	10 (20.4)				
2	10 (20.4)				
3	5 (10.2)				
4	24 (49.0)				

χ^2 Chi-square test; t: Student's t-test; * $p < 0.05$

described [27]. The rs8099917 SNP genotyping was determined by a TaqMan® Pre-designed SNP Assay (Applied Biosystems) (AB) reference: C_11710096_10. Genotyping of each sample was attributed automatically by the StepOne Software v2.2.2. Positive and negative controls (previously verified by direct Sanger sequencing) were used in each genotyping assay.

Statistical analyses

Data are presented as percentages (categorical variables), means and standard deviations (continuous variables). Comparisons between the two groups were made using the chi-square (χ^2) test or Fisher's exact test (when cell sample sizes were less than five) for categorical variables and Student's t-test for continuous variables. The existence of differences in genotypic frequencies between groups was assessed by Chi-square test under the three main inheritance models: codominant, dominant and recessive. A Monte Carlo permutation method was used for multiple test correction. A p value less than 0.05 was considered statistically significant. Raw p values are shown in the tables. Possible deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were studied in the control population (both exact and Chi-squared tests were performed) using PLINK Package version 1.9 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) [34]. We performed univariable and multivariable logistic regression analyses in order to analyse the independent contribution of each polymorphism to the occurrence of chronic HCV infection (dependent or outcome variable). The categorical independent variables included in the full multivariable model were rs12979860 and rs8099917 SNP genotypes (CC, CT, TT and TT, TG, GG, respectively) adjusted by age and gender. An interaction multiplicative term between both SNPs was also tested in order to consider their joint effect, if any. Odds Ratios (OR) and 95% confidence intervals were calculated. The analyses were performed using the IBM® SPSS® Statistics version 23 Software and R software version 3.4.0 [35]. Linkage disequilibrium analysis was performed using Haploview Software [36].

Results

Demographic characteristics of infected patients and controls

Seventy-eight treatment-naïve patients with chronic HCV infection were recruited. 61.5% were male with an average age of 46 years. In all cases, chronic infection was confirmed by a viral load above the limit of detection or by qualitative PCR detection. HCV genotypic analysis confirmed the prevalence of genotype 1 (57.7%) in the cohort. The control group included 92 individuals, all of which were HCV, HIV and HBV negative by serologic methods. 72.8% were male with an average age of

40 years. All demographic characteristics are presented in Table 1, including the histological stages for the infected population and the viral genotypes, if previously determined. No significant difference was found in terms of gender distribution ($p \geq 0.05$). On the contrary, the difference in age between groups was statistically significant ($p < 0.05$). The stage of liver disease according to Metavir score was available in 49 of the 78 infected patients. Cirrhosis (stage 3 and 4) was observed in 29 (59.2%) of them (Table 1).

SNPs rs12979860 and rs8099917 genotype distribution in non-infected individuals and in HCV-infected patients

Several reports establish a strong link between SNPs rs12979860 and rs8099917 with the response to peg-IFN- α /RBV treatment for HCV genotype 1 infected patients [7, 9, 13, 25, 28, 29, 31, 37–39]. To date no study exists that shows the distribution of these polymorphisms within the Uruguayan population despite the fact that HCV genotype 1 is confirmed as the most prevalent viral genotype in the country (Table 1) [40]. To gain information regarding the distribution of IL28B SNPs among the Uruguayan population the genomic DNA from 92 non-infected, non-related individuals were analysed. The distribution of rs12979860 genotypes within this control group were 45.7% CC, 42.4% CT and 11.9% TT, while for the rs8099917 they were 60.9% TT, 33.7% GT and 5.4% GG (Fig. 1 and Table 2). SNP rs12979860 and rs8099917 showed to be in Hardy-Weinberg equilibrium (χ^2 tests, $p \geq 0.05$) in the control group, which allowed us to proceed with the genotype distribution comparison in both populations. Next we sought to establish the distribution of IL28B polymorphisms within a Uruguayan cohort of 78 treated naïve HCV-infected patients. SNP analysis in the HCV-infected cohort revealed that the frequencies for the rs12979860 genotypes were 29.5% CC, 47.4% CT and 23.1% TT, while frequencies for the rs8099917 TT, GT and GG genotypes were 57.7%, 28.2% and 14.1%, respectively (Fig. 1 and Table 2). Under both a codominant as well as a dominant model, the genotype distribution corresponding to rs12979860 (CC, CT, TT) between the non-infected control group and the HCV-infected cohort (Fig. 1a) evidenced to be statistically significant ($p < 0.05$) even after multiple test correction, with a higher prevalence of the favourable genotype (CC) within the control group (Table 2). A similar analysis was done for rs8099917 genotype distributions; however no statistically significant differences between both cohorts were found (Fig. 1b and Table 2). The allelic frequencies between both populations also showed to be statistically different only for rs12979860 (Fig. 1c and 1d). No association was observed between IL28B genotype and

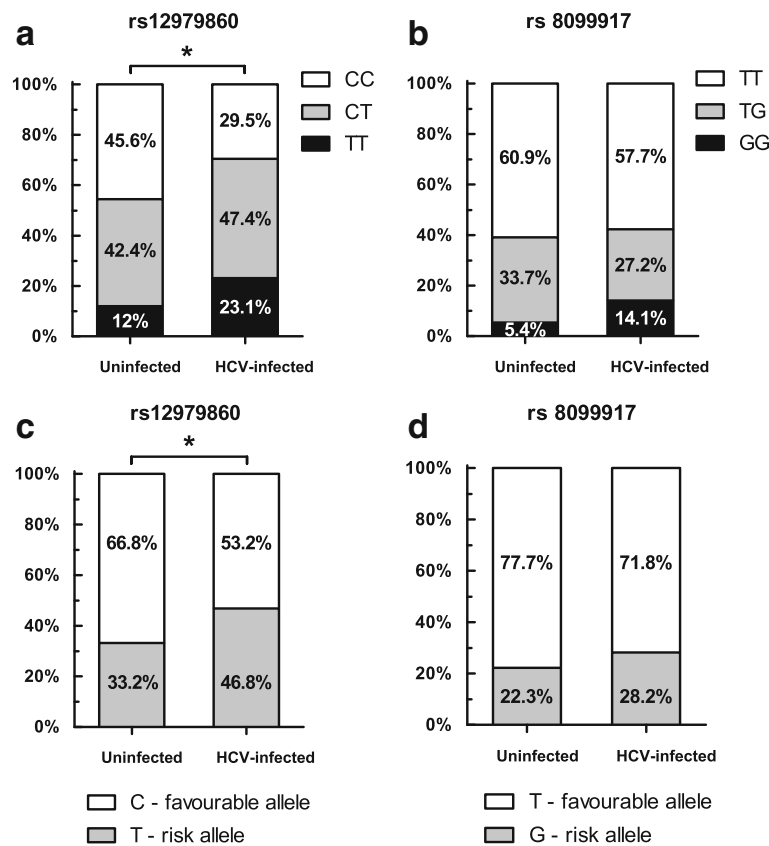


Fig. 1 IL28B polymorphisms in a Uruguayan HCV-infected population ($n = 78$) and a Uruguayan uninfected population ($n = 92$). **a** SNP rs12979860 genotype distribution, where CC is considered as the good genotype and CT/TT as the unfavourable genotypes. The difference between groups is statistically significant (χ^2 test - codominant model, $p = 0.045$). **b** SNP rs8099917 genotype distribution, where TT is considered as the good genotype and TG/GG as the unfavourable genotypes. **c** SNP rs12979860 allelic distribution. The distribution between both populations is statistically significant (χ^2 test, $p = 0.010$). **d** SNP rs8099917 allelic distribution

Table 2 Genotype frequency of SNP rs12979860 and rs8099917 in both populations

IL28B SNP	HCV-infected population ($n = 78$)	Uninfected population ($n = 92$)	Statistical test and value	p value
rs12979860, n (%)			χ^2_{cd} 6.185	0.045*
CC	23 (29.5)	42 (45.7)		
CT	37 (47.4)	39 (42.4)		
TT	18 (23.1)	11 (11.9)		
CT + TT d	55 (70.5)	50 (54.3)	χ^2_d 4.671	0.031*
CC + CT r	60 (76.9)	81 (88.0)	χ^2_r 3.689	0.055
rs 8,099,917, n(%)			χ^2_{cd} 3.850	0.146
TT	45 (57.7)	56 (60.9)		
TG	22 (28.2)	31 (33.7)		
GG	11 (14.1)	5 (5.4)		
TG + GG d	33 (42.3)	36 (39.1)	χ^2_d 0.177	0.674
TT + TG r	67 (85.9)	87 (94.6)	χ^2_r 3.720	0.054

χ^2 Chi-square test; cd = Codominant model; d = Dominant model; r = Recessive model; * $p < 0.05$

other variables such as gender, HCV genotype or liver fibrosis stage (Additional files 1 and 2).

Of the 42 HCV-infected patients who underwent and finished IFN- α /RBV treatment, 17 achieved SVR, whereas 25 did not (3 NR and 21 relapsers). Among those who responded favourably, 23.5% carried the rs12979860 good-response genotype (CC) while 58.8% carried the rs8099917 favourable genotype (TT). Among non-responder and relapsing patients, these frequencies were lower (20.0% - CC and 48.0% - TT, respectively). Nevertheless, chi-squared and Fischer's exact tests did not evidence statistically significant differences in distributions of IL28B genotypes between both groups.

Next we sought to determine the contribution of IL28B SNPs to the occurrence of chronic HCV-infection by performing logistic regression analyses (Table 3). The results of univariable and multivariable (adjusted by age and sex) models suggest that when rs8099917 genotype is constant, individuals carrying rs12979860 unfavourable genotypes TT and CT on average have a 5.783 (TT) and 3.086 (CT) fold higher likelihood (adjusted OR_{TT} = 5.783, $p = 0.023$; adjusted OR_{CT} = 3.086, $p = 0.015$) of developing a chronic infection upon infection with HCV when compared to individuals hosting the favourable genotype (CC). Noteworthy, all individuals homozygous for the favourable allele of rs12979860 (CC) also carried the favourable genotype of rs8099917 (TT). It should be noted that no interaction between the SNPs was evidenced, as revealed by a non-converging model. In addition, rs12979860 - TT/CT as well as age were found to be associated with a higher chance of chronic infection occurrence in both univariable and multivariable models.

The results of the genotype distribution comparisons as well as the logistic regression are supported by Haploview analyses showing that both SNPs are in

weak Linkage Disequilibrium in both of the studied populations (controls: $r^2 = 0.57$; infected-patients: $r^2 = 0.37$; both: $r^2 = 0.48$). This observation also indicates that for the studied population of HCV-infected patients the association between IL28B SNPs and development of HCV chronicity is primarily driven by only one of the evaluated polymorphisms.

Discussion

Infections with HCV have become a major cause of liver cancer and one of the most common indications for liver transplantation [1]. In Uruguay the combination of peg-IFN- α plus RBV is still the main option for HCV treatment, despite the fact that HCV genotype 1 is the predominant genotype among the infected patients in Uruguay [40]. This, in addition to the high cost of the new direct-acting therapies, highlight the relevance of searching for new indicators of response to antiviral therapy in the Uruguayan population in order to provide information that could be a useful guide for clinicians, enabling them to select a more patient-personalised anti-HCV therapy.

Many host factors have been associated with HCV-treatment outcome, among which, specific single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located near the interleukin 28B (IL28B) gene have been shown to exhibit a significant relationship with both spontaneous virus clearance and response to peg-IFN- α /RBV treatment [7–10]. In this context, and considering that no information on IL28B SNPs genotype distribution was known for Uruguay, we were interested in evaluating the frequency of IL28B rs12979860 and rs8099917 in a cohort of Uruguayan individuals (HCV-infected as well as uninfected). With this aim, 92 healthy individuals and 78 HCV-infected patients were studied.

Table 3 Logistic regression of each polymorphism in cases (chronic HCV-infected patients) versus controls (uninfected individuals)

Factor	Univariable Models		Multivariable Model			
	Estimate	OR (95% CI)	p value	Estimate	OR (95% CI)	p value
<i>rs12979860</i>						
CC	NA	1		NA	1	
TT	1.095	2.988 (1.208–7.395)	0.018*	1.755	5.783 (1.279–26.142)	0.023*
TC	0.550	1.732 (0.879–3.415)	0.113	1.127	3.086 (1.247–7.642)	0.015*
<i>rs 8,099,917</i>						
TT	NA	1		NA	1	
GG	1.007	2.738 (0.886–8.454)	0.080	-0.240	0.787 (0.141–4.375)	0.784
TG	-0.124	0.883 (0.451–1.730)	0.717	-0.672	0.511 (0.197–1.325)	0.167
Age	0.051	1.052 (1.023–1.082)	<0.001*	0.036	1.037 (1.008–1.067)	0.012*
Gender	-0.516	0.597 (0.312–1.141)	0.118	0.546	1.727 (0.843–3.537)	0.135

Odds ratio were constructed considering favourable genotypes (rs12979860-CC and rs 8,099,917-TT) as reference. OR: Odds ratio; CI: Confidence Interval; * $p < 0.05$

In full agreement with what others have reported [26, 27, 30, 41–43], the frequency of the IL28B rs12979860 favourable genotype (CC), which strongly predicts spontaneous clearance of HCV infection, was less prevalent among the studied HCV-infected population than within the non-infected individuals. This differential genotypic distribution was statistically significant ($p < 0.05$) (Fig. 1). This bias toward the less favourable genotype for rs12979860 is most probably associated to the way HCV-infected patients were selected for the study as all were recruited in a hospital setting. No significant differences between the frequencies of the protective rs8099917-TT genotype in general population and the studied HCV-infected patients were observed. The unfavourable homozygous genotypes were found at a low frequency in both populations under study (rs12979860-TT 23.1% vs 11.9% and rs8099917-GG 14.1% vs 5.4%, in the infected and control group, respectively). Given that a higher prevalence of favourable rs12979860 genotype has been found among healthy individuals when compared to HCV-infected patients [41], it is plausible

that our results support the notion of a protective effect of IL28B “good” response genotype within the Uruguayan population, as has been previously suggested by others [10, 44].

Additionally, by means of logistic regression analyses we show that individuals carrying rs12979860-TT or CT genotypes have a higher likelihood of developing chronic hepatitis upon infection with HCV, when compared to CC carriers, when the rs8099917 genotype is constant (Table 3). Therefore, our results suggest that within the Uruguayan population rs12979860 might be a better predictor than rs8099917, at least in terms of occurrence of chronic HCV infection. This is also in agreement with the fact that these SNPs seem to be in weak linkage disequilibrium, which indicates that only one of them might be associated with development of chronicity in the studied Uruguayan cohort.

An interesting finding of this work is that it shows that the genotype frequencies in Uruguay seem to fall in the same ranges as those found in other countries (Table 4), this with the exception of Asian countries where the prevalence of protective genotypes were

Table 4 IL28B favourable genotype prevalence reported in different countries

IL28B SNP	Uninfected population % (n)	HCV-infected population % (n)	Country	Year of publication
<i>Rs12979860; CC</i>				
	44.7 (378)	45.6 (283)	Spain	2010 [42]
	45.1 (122)	26.9 (108)	Egypt	2015 [43]
	44.6 (92)	32.1 (136)	Turkey	2015 [41]
	43.7 (142)	38.0 (921) – 42.0 (100)	Iran	2012 [49], 2016 [50]
	86.9 (320)	88.6 (297)	China	2015 [51]
	ND	24.1 (83)	Mexico	2012 [25]
	35.7 (185)	ND	Bolivia	2014 [26]
	38.1 (76)	ND	Peru	2014 [26]
	38.8 (98)	ND	Paraguay	2014 [26]
	37.0 (405)	20.2 (99)	Chile	2013 [27], 2011 [28]
	51.6 (991)	18.4 (102)	Argentina	2014 [26], 2011 [29]
	47.4 (190)	24.0 (221) – 30.9 (175)	Brazil	2012 [31], 2015 [30]
	45.6 (92)	29.5 (78)	Uruguay	This study
<i>rs8099917; TT</i>				
	64.1 (142)	58.3 (921)	Iran	2012 [49]
	88.7 (320)	89.6 (297)	China	2015 [51]
	89.3 (197)	81.0 (400)	Taiwan	2016 [45]
	ND	27.5 (80)	Mexico	2012 [25]
	46.9 (405)	29.3 (99)	Chile	2013 [27], 2011 [28]
	ND	40.2 (102)	Argentina	2011 [29]
	67.8 (199)	54.2 (177) – 63.1 (222)	Brazil	2015 [30], 2012 [31]
	60.9 (92)	57.7 (78)	Uruguay	This study

found to be higher [37, 45]. Although the allelic frequencies of both SNPs in the control group fall in the range of the frequencies reported for different European populations [24], the distribution of genotypes in the Uruguayan population seems to be more similar to the frequencies reported in Brazil [30, 31] and the rs12979860-CC prevalence among infected patients (29.5%) resembles the one reported for Hispanics, rather than Caucasians (Table 5). This observation raises important questions regarding the Uruguayan genetic background and ethnicity. Uruguay has no Native American or African-descendant communities and until the 1980s its national identity was regarded as almost strictly Caucasian [32]. More recently, however, several reports based both on classical markers as well as nuclear DNA analysis have revealed that the Uruguayan population has a small but important African and Native American ancestry contribution (see [32] for a detailed review). Thus, it is tempting to speculate that it is this previously non-considered ethnic contribution that would explain why the SNPs frequencies within the Uruguayan population closely resemble those of admixed rather than a Caucasian population.

Several reports from different countries and regions have found associations between favourable genotypes of IL28B SNPs and SVR [8, 25, 28, 29, 31, 37, 38, 46], regrettably we did not find evidence which supports this link in our Uruguayan population. Differences in SNPs genotype distributions between SVR and NR/R patients were not statistically significant (chi-squared and Fisher's exact tests considering the three modes of inheritance: codominant, dominant and recessive). This might be attributable to the small number of patients included in this study that had finished their therapy by the time of writing this report ($n = 42$) which accounts for 53.8% of all HCV-infected patients enrolled. In addition, of those 42 HCV-infected individuals that had completed their dual treatment, 17 achieved SVR while 25 were either non-responders or relapsers (NR/R). Of those who achieved SVR, 23.5% ($n = 4/17$) harboured the favourable IL28B genotype (rs12979860-CC), whereas only 20.0% of the NR/R patients had the favourable genotype ($n = 5/25$). These results suggest a slight trend towards a higher

frequency of "good" response genotypes in responder patients. This tendency has also been observed in other populations in Latin America where the frequency of CC-carriers among the NR patients (2% in Chile [28] and 20% in Mexico [25]) seems to be lower than among SVR patients. The small number of patients corresponding to each group (SVR or NR/R) might explain why we were not able to confirm the association between IL28B genotypes and response to therapy. Despite Heo et al. (2014) [47] also reported no association even when including a larger number of patients ($n = 156$), the ethnic disparities between Uruguayan and Korean populations does not allow us to confirm our findings. A limitation of our analyses, however, is that due to the limited number of patients, association studies were performed without taking into account the viral genotype. In this respect, some authors report no association between IL28B SNPs and SVR in patients infected with HCV genotype 3 [48]. This fact might have biased our results since we included both HCV genotype 1 and 3 infected patients.

As mentioned before, despite the fact that some of the new treatment regimens including DAAs have been approved for use by Uruguayan national authorities, their costs are not always covered by our health system, making them unaffordable for most of the population. Therefore, we believe it would still be relevant for our country to use hosts genotype data as a predictor of response to HCV-treatment. Furthermore, IL28B genotype seems to be also informative when new DAAs are used, both in the context of protease inhibitors combination therapy [15–19] as well as in IFN-free regimens with sofosbuvir (polymerase inhibitor) and ledipasvir (NS5A inhibitor) [20]. Therefore, it is feasible to propose that IL28B genotyping could be a powerful tool use in Uruguay to predict the best personalised anti HCV-treatment in the upcoming years.

Conclusions

In conclusion, the present study shows that the favourable genotypes rs12979860-CC and rs8099917-TT were present in 29.5% and 57.7% of the Uruguayan population infected with HCV, respectively. As expected, the prevalence within the non-infected population was higher (45.6% for rs12979860 and 60.8% for rs8099917). Only IL28B rs12979860-CT and TT genotypes seem to contribute to the occurrence of chronic HCV infection in the cohort of Uruguayan population studied. Considering that a slight trend towards a higher frequency of "good" response genotypes was observed in responder patients, we believe that IL28B rs12979860 genotyping could be a useful tool for predicting different therapies outcome, including in the DAA era. It is worth mentioning that this study also found that allele and genotype

Table 5 Rs12979860 favourable genotype (CC) prevalence reported according to ethnicity in HCV-infected patients

HCV-infected population % (n)	Ethnicity	Year of publication
33.3 (2582) – 37.2 (1171)	Caucasians	2016 [52], 2010 [13]
22.9 (105) – 29.3 (116)	Hispanics	2016 [52], 2010 [13]
10.4 (48) – 14.0 (300)	African Americans/ Black	2016 [52], 2010 [13]
49.2 (181)	Asian	2016 [52]

frequencies closely resemble those of an admixed population rather than a uniformly European-descendant one, which is in agreement with previous studies on non-Caucasian ancestry contribution to Uruguayan population [32].

Additional files

Additional file 1: SNP rs12979860 genotypes according to infected patient characteristics. (DOCX 15 kb)

Additional file 2: SNP rs8099917 genotypes according to infected patient characteristics. (DOCX 15 kb)

Abbreviations

DAA: Direct-acting Agent; HCV: Hepatitis C Virus; IL28B: Interleukin 28B; Peg-IFN- α : pegylated interferon alpha; RBV: Ribavirin; SNP: Single-nucleotide Polymorphism; SVR: Sustained Virological Response

Acknowledgements

We thank Dr. Lilia López for her assistance on recruiting healthy individuals for this study.

Funding

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), PEDECIBA, Comisión Académica de Posgrados, Clínica de Gastroenterología-Hospital de Clínicas, Universidad de la República (UdelaR) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelaR, Uruguay. Work conducted by NE in Chile was funded by CONICYT-PIA ACT1408, and project P09/016-F-ICM.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

NE, DC, NH and PM conceived the study. NE, DC, JA, MLL, NH and PM designed the analysis. AC and CB contributed to data collection. NE, DC, PS and PL performed the SNPs studies. NE, DC, VC and NH performed statistical analyses. JC, MLL and JA contribute to the discussion of all results obtained in this work. NE, DC, NH and PM wrote the paper. All authors reviewed and approved the final manuscript. NE, DC, NH and PM were responsible for the integrity of the work as a whole.

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted according to national and international ethical guidelines (good clinical practice, Nuremberg statements, Declaration of Helsinki) and local regulatory rules (Mercosur Standards/GMC/RES No. 129/96). The protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas on October 24th (2014) and all patients gave written informed consent. Access to personal information was restricted to the medical doctors. The genetic information extracted from the samples was used exclusively for the purposes of this study.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2055 Montevideo, Matajojo, Uruguay. ²Clínica de Gastroenterología, Hospital de Clínicas,

Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11600 Montevideo, Uruguay. ³Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁴Laboratorio de Virología Molecular, Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia, Centro de Investigaciones Médicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. ⁵Sanatorio SEMM-Mautone, Maldonado, Uruguay. ⁶Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Received: 12 October 2017 Accepted: 5 February 2018

Published online: 02 March 2018

References

- 2017 GHR. Geneva: World Health Organization. Geneva; 2017. licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Hernandez N, Mescia G, Pollio C, Robaina G, Quintana L, Bianchi C. Effectiveness of pegylated interferon alfa 2a and ribavirin for chronic hepatitis C in clinical practice. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2010;40:117–21.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* (London, England). 2001;358:958–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06102-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06102-5).
- Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004;140:346–55. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-5-200403020-00010>.
- Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*. 2006;55(9):1350. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.076646>.
- Cornberg M, Hardtke S, Port K, Manns MP, Wedemeyer H, Standard HC. Of care. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H, editors. *Short guide to hepatitis C*. Flying Publisher; 2012. p. 34–57.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461:399–401. <https://doi.org/10.1038/nature08309>.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41:1100–4. <https://doi.org/10.1038/ng.447>.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41:1105–9. <https://doi.org/10.1038/ng.449>.
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461:798–801. <https://doi.org/10.1038/nature08463>.
- Scherzer TM, Stättermayer AF, Strasser M, Laferl H, Maieron A, Stauber R, et al. Impact of IL28B on treatment outcome in hepatitis C virus G1/4 patients receiving response-guided therapy with peginterferon alpha-2a (40KD)/ribavirin. *Hepatology*. 2011;54:1518–26.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010;138:1338–45, 1345-7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.056>.
- Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained Virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*. 2010;139(1):120-9.e18. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.013>.
- Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K, et al. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology*. 2010;139:827.e1–827.
- Holmes JA, Desmond PV, Thompson AJ. Does IL28B genotyping still have a role in the era of direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C infection? *J Viral Hepat*. 2012;19:677–84.
- Calisti G, Tavares A, Macartney MJ, McCormick A, Labbett W, Jacobs M, et al. IL28B genotype predicts response to chronic hepatitis C triple therapy with telaprevir or boceprevir in treatment naïve and treatment-experienced

- patients other than prior partial- and null-responders. *Spring*. 2015;4:357. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1137-x>.
17. About F, Oudot-Mellakh T, Niyaj J, Rabiéga P, Pedergrana V, Duffy D, et al. Impact of IL28B, APOH and ITPA polymorphisms on efficacy and safety of TVRor BOC-based triple therapy in treatment-experienced HCV-1 patients with compensated cirrhosis from the ANRS CO20-CUPIC study. *PLoS One*. 2015;10:1–13.
 18. Barreiro P, Vispo E, Poveda E, Fernández-Montero JV, Soriano V. Hepatitis C therapy: highlights from the 2012 annual meeting of the European Association for the Study of the liver. *Clin Infect Dis*. 2013;56:560–6. <https://doi.org/10.1093/cid/cis915>.
 19. D'Offizi G, Cammà C, Taibi C, Schlag M, Palma M, Demasi R, et al. Clinical and virological predictors of sustained response with an interferon-based simeprevir regimen for patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *New Microbiol*. 2017;40:19–26.
 20. Akuta N, Sezaki H, Suzuki F, Fujiyama S, Kawamura Y, Hosaka T, et al. Retreatment efficacy and predictors of ledipasvir plus sofosbuvir to HCV genotype 1 in Japan. *J Med Virol*. 2017;89:284–90.
 21. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA*. 2000;284:450–6.
 22. Muir a J, Hu K-Q, Gordon SC, Koury K, Boparai N, Noviello S, et al. Hepatitis C treatment among racial and ethnic groups in the IDEAL trial. *J Viral Hepat*. 2011;18:e134–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01402.x>.
 23. Trinks J, Hulaniuk ML, Redal MA, Flichman D. Clinical utility of pharmacogenomics in the management of hepatitis C. *Pharmgenomics Pers Med*. 2014;7:339–47.
 24. Rajeevan H, Soundararajan U, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK. ALFRED: an allele frequency resource for research and teaching. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database Issue):D1010–5.
 25. Martínez-Gómez LE, Chávez-Tapia NC, Burguete-García AI, Aguilar-Olivos N, Madrid-Marina V, Román-Bahena M, et al. IL28B polymorphisms predict the response to chronic hepatitis C virus infection treatment in a Mexican population. *Ann Hepatol*. 2012;11:876–81.
 26. Trinks J, Hulaniuk ML, Caputo M, Pratz LB, Ré V, Fortuny L, et al. Distribution of genetic polymorphisms associated with hepatitis C virus (HCV) antiviral response in a multiethnic and admixed population. *Pharmacogenomics J*. 2014;14:549–54.
 27. Angulo J, Pino K, Pavez C, Biel F, Labbé P, Miquel JF, et al. Genetic variations in host IL28B links to the detection of peripheral blood mononuclear cells-associated hepatitis C virus RNA in chronically infected patients. *J Viral Hepat*. 2013;20:263–72.
 28. Venegas M, Villanueva RA, González K, Brahm J. IL28B polymorphisms associated with therapy response in Chilean chronic hepatitis C patients. *World J Gastroenterol*. 2011;17:3636–9.
 29. Ridruejo E, Solano Á, Marciano S, Galdame O, Adrover R, Cocozzella D, et al. Genetic variation in interleukin-28B predicts SVR in hepatitis C genotype 1 argentine patients treated with PEG IFN and ribavirin. *Ann Hepatol*. 2011;10:452–7.
 30. Bertol BC, Moreira S, Garcia RFL, Ferreira LE, Debortoli G, de Leite Pinho MS, et al. IL28B gene polymorphisms in mono- and HIV-coinfected chronic hepatitis C patients. *Front Microbiol*. 2015;6:1–8.
 31. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo ALD, Machado TMB, Lemaire DC, Mendes CMC, et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver Int*. 2012;32:476–86.
 32. Salzano FM, Sans M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol*. 2014;37(1 SUPPL. 1):151–70.
 33. Sharafi H, Pouryasini A, Alavian SM, Behnava B, Keshvari M, Mehrnosh L, et al. Development and validation of a simple, rapid and inexpensive PCRFLP method for genotyping of common IL28b polymorphisms: a useful pharmacogenetic tool for prediction of hepatitis C treatment response. *Hepat Mon*. 2012;12:190–5.
 34. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007;81:559–75. <https://doi.org/10.1086/519795>.
 35. R Core Team. R: A Language and Environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2014. <http://www.r-project.org/>.
 36. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21:263–5.
 37. Shi X, Pan Y, Wang M, Wang D, Li W, Jiang T, et al. IL28B genetic variation is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus, treatment response, serum IL-28B levels in Chinese population. *PLoS One*. 2012;7:1–8.
 38. Ramos JA, Ramos AL, Hoffmann L, Perez Rde M, HSM C, Úrményi TP, et al. A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, mono-infected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-rib. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:888–92.
 39. Rallón NI, Naggie S, Benito JM, Medrano J, Restrepo C, Goldstein D, et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS*. 2010;24:F23–9.
 40. Castells M, Bello G, Ifrán S, Pereyra S, Bosch S, Uriarte R, et al. Epidemic history of major genotypes of hepatitis C virus in Uruguay. *Infect Genet Evol*. 2015;32:231–238. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.021>.
 41. Taheri S, Aygen B, Korkmaz K, Yildiz O, Zarusiz G, Canatan H. Characterization of the interleukin-28B gene rs12979860 C/T polymorphism in Turkish chronic hepatitis C patients and healthy individuals. *Balkan Med J*. 2015;32:147–55.
 42. Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gómez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, et al. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*. 2010;52:33–7.
 43. Knapp S, Zakaria Z, Hashem M, Zaghla H, Khakoo SI, Waked I, et al. Influence of IFNL3.rs12979860 and IFNL4.ss469415590 polymorphism on clearance of hepatitis C virus infection among Egyptians. *Hepatol Int*. 2015;9:251–7.
 44. Sharafi H, Moayed Alavian S, Behnava B, Pouryasini A, Keshvari M. The impact of IFNL4 rs12979860 polymorphism on spontaneous clearance of hepatitis C; a case-control study. *Hepat Mon*. 2014;14:e22649.
 45. Mah Y-H, Liu C-H, Chen C-L, Tseng T-C, Liu C-J, Chen P-J, et al. Prevalence and clinical implications of IL28B genotypes in Taiwanese patients with chronic hepatitis C. *J Formos Med Assoc*. 2016;115:953–60. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2016.07.013>.
 46. de Seixas Santos Nastro AC, de Mello Malta F, Diniz MA, Yoshino A, Abe-Sandes K, Dos Santos SE, et al. Association of IFNL3 and IFNL4 polymorphisms with hepatitis C virus infection in a population from southeastern Brazil. *Arch Virol*. 2016;161:1477–84.
 47. Heo NY, Lim YS, Lee W, Oh M, An J, Lee D, et al. No association between the IL28B SNP and response to peginterferon plus ribavirin combination treatment in Korean chronic hepatitis C patients. *Clin Mol Hepatol*. 2014;20:177–84. <https://doi.org/10.3350/cmh.2014.20.2.177>.
 48. Mghaddam A, Melum E, Reinton N, Ring-Larsen H, Verbaan H, Bjørø K, et al. IL28B genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. *Hepatology*. 2011;53:746–54. <https://doi.org/10.1002/hep.24154>.
 49. Sharafi H, Pouryasini A, Alavian SM, Behnava B, Keshvari M, Salimi S, et al. Distribution of IL28B genotypes in Iranian patients with chronic hepatitis C and healthy individuals. *Hepat Mon*. 2012;12:e8387.
 50. Minakari M, Golshani M, Yaran M, Ateai B. Prevalence of interleukin-28B single nucleotide polymorphism genotypes in patients with hepatitis C infection in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res*. 2016;5:90.
 51. Dong ZX, Zhou HJ, Xiang XG, Guo SM, Zhuang Y, De ZG, et al. IL28B genetic variations are associated with treatment response of patients with chronic hepatitis C in a Chinese Han population. *J Dig Dis*. 2015;16:90–7. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12202>.
 52. Mangia A, De Ledingham V, Bailly F, Brahm J, Keiss J, Valantinas J, et al. IL28B genotype is associated with cirrhosis or transition to cirrhosis in treatment-naive patients with chronic HCV genotype 1 infection: the international observational gen-C study. *Spring*. 2016;5:1990. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3663-6>.

11.3. Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis

Angulo J, Pino K, **Echeverría N**, Marco C, Martínez-Valdebenito C, Galeno H, Villagra E, Vera L, Lagos N, Becerra N, Mora J, Bermúdez A, Cárcamo M, Díaz J, Ferrés M, López-Lastra M (2015) Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in IL28B, but Not TNF-alfa, With Severity of Disease Caused by Andes Virus. *Clinical Infectious Diseases (E)*, 61 (12), 62 – 69. DOI: 10.1093/cid/civ830

Sóñora M, Moreno P, **Echeverría N**, Fischer S, Comas V, Fajardo A, Cristina J. (2015) An evolutionary insight into Newcastle disease viruses isolated in Antarctica. *Archives of Virology*, 160 (8), 1893 – 1900. DOI: 10.1007/s00705-015-2434-y

Echeverría N, Moratorio G, Moreno P, Cristina J (2015) Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World Journal of Hepatology*, 7 (6), 831 – 845. DOI: 10.4254/wjh.v7.i6.831

Fischer S, **Echeverría N**, Cristina J, Moreno P (2016) Human Endogenous Retrovirus: Their Relationship with Hematological Diseases. *Journal of Leukemia*, 4 (4), 1000217. DOI: 10.4172/2329-6917.1000217

Yu Y, Scheel TKH, Luna JM, Chung H, Nishiuchi E, Scull MA, **Echeverría N**, Ricardo-Lax I, Kapoor A, Lipkin IW, Divers TJ, Antczak DF, Tennant BC, Rice CM (2017) miRNA independent hepacivirus variants suggest a strong evolutionary pressure to maintain miR122 dependence. *PLOS Pathogens*, 13 (10), e1006694. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006694

Echeverría N, Moreno P, Cristina J (2017) Chapter 17: Molecular evolution of Hepatitis C Virus: from epidemiology to antiviral therapy - Current research in Latin America. In book: *Human Virology in Latin America*, 333 – 359. Springer International Publishing AG. DOI: 10.1007/978-3-319-54567-7_17

Aldunate F, **Echeverría N**, Chiodi D, López P, Sánchez-Cicerón A, Fajardo A, Soñora M, Cristina J, Hernández N, Moreno P (2018) Pretreatment Hepatitis C virus NS5A/NS5B resistance associated substitutions in genotype 1 Uruguayan infected patients. *Disease Markers*, 2018 (Article ID 2514901), 1 – 9. DOI: 10.1155/2018/2514901

Aldunate F, **Echeverría N**, Chiodi D, López P, Sánchez A, Fajardo A, Soñora M, Cristina J, Hernández N, Moreno P (2019). Comment on "Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B Resistance-Associated Substitutions in Genotype 1 Uruguayan Infected Patients". *Disease Markers*, 2019 (Article ID 2520302), 1 – 4. DOI: 10.1155/2019/2520302

Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in *IL28B*, but Not *TNF- α* , With Severity of Disease Caused by Andes Virus

Jennifer Angulo,¹ Karla Pino,¹ Natalia Echeverría-Chagas,⁶ Claudia Marco,² Constanza Martínez-Valdebenito,² Héctor Galeno,⁴ Eliecer Villagra,⁴ Lilian Vera,⁴ Natalia Lagos,⁴ Natalia Becerra,⁴ Judith Mora,⁴ Andrea Bermúdez,⁵ Marcela Cárcamo,⁵ Janepsy Díaz,⁵ Juan Francisco Miquel,³ Marcela Ferrés,² and Marcelo López-Lastra¹

¹Laboratorio de Virología Molecular, Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia, ²Laboratorio de Infectología, Centro de Investigaciones Médicas, Escuela de Medicina, División de Pediatría and ³Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, ⁴Subdepartamento de Virología Clínica, Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia, and ⁵Departamento de Asuntos Científicos, Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago; and ⁶Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Background. Andes virus (ANDV) is the sole etiologic agent of hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) in Chile, with a fatality rate of about 35%. Individual host factors affecting ANDV infection outcome are poorly understood. In this case-control genetic association analysis, we explored the link between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) rs12979860, rs8099917 and rs1800629 and the clinical outcome of ANDV-induced disease. The SNPs rs12979860 and rs8099917 are known to play a role in the differential expression of the interleukin 28B gene (*IL28B*), whereas SNP rs1800629 is implicated in the expression of tumor necrosis factor α gene (*TNF- α*).

Methods. A total of 238 samples from confirmed ANDV-infected patients collected between 2006 and 2014, and categorized according to the severity of the disease, were genotyped for SNPs rs12979860, rs8099917, and rs1800629.

Results. Analysis of *IL28B* SNPs rs12979860 and rs8099917 revealed a link between homozygosity of the minor alleles (TT and GG, respectively), displaying a mild disease progression, whereas heterozygosity or homozygosity for the major alleles (CT/CC and TG/TT, respectively) in both *IL28B* SNPs is associated with severe disease. No association with the clinical outcome of HCPS was observed for *TNF- α* SNP rs1800629 (*TNF* -308G>A).

Conclusions. The *IL28B* SNPs rs12979860 and rs8099917, but not *TNF- α* SNP rs1800629, are associated with the clinical outcome of ANDV-induced disease, suggesting a possible link between *IL28B* expression and ANDV pathogenesis.

Keywords. ANDV; HCPS; *IL28B*; *TNF-alpha*; SNP.

Andes virus (ANDV), member of the genus *Hantavirus* within the family *Bunyaviridae* [1], is endemic in Argentina and Chile. The main reservoir host for ANDV is the long-tailed pygmy rice rat (*Oligoryzomys longicaudatus*) [2]. Transmission to humans occurs mainly via exposure to aerosolized rodent urine, saliva, and

feces containing the virus [1]. However, human-to-human transmission has also been described [3]. ANDV causes a respiratory disease known as hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS), characterized by the development of a vascular leakage syndrome, eventually leading to massive pulmonary edema, shock and, in many cases, death [4, 5]. HCPS was first recognized in Chile in 1995 and serologically confirmed in retrospective cases from 1993 [6]. As of April 2015, a total of 925 confirmed cases had been reported with a current case fatality rate of about 35% (Department of Epidemiology Chilean Ministry of Health; <http://www.minsal.cl>).

To date, no Food and Drug Administration–approved antiviral drugs, immunotherapeutics, or

Received 31 May 2015; accepted 4 September 2015; electronically published 22 September 2015.

Correspondence: Marcelo López-Lastra, PhD, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Marcoleta 391, Santiago, Chile (malopez@med.puc.cl).

Clinical Infectious Diseases® 2015;61(12):e62–9

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/civ830

vaccines are available for HCPS [7]. Patient survival rates hinge largely on early diagnosis, hospital admission and aggressive pulmonary and hemodynamic support in an intensive care unit (reviewed in [4, 5]). There is currently no blood biomarker to predict the outcome of ANDV-induced HCPS. Interestingly, several reports have established links between host single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and disease progression for other members of the *Hantavirus* genus (reviewed in [8]). For example, a study conducted in Brazil showed that the host SNP rs1800629 in the tumor necrosis factor α (*TNF- α*) gene promoter, involving the substitution of guanine (G) to adenosine (A), linked with the outcome of Araraquara virus-induced HCPS [9]. Individual host factors affecting ANDV infection outcome are poorly understood but are likely to prove important for predicting disease progression in hospitalized patients.

One example of how the knowledge of the patients' genetic background can be used in the clinic has emerged from the study of the hepatitis C virus (HCV) (reviewed in [10–12]). Several genome-wide association studies reported SNPs near the interleukin (IL) 28B gene (*IL28B*) locus on chromosome 19 that are associated with sustained virological response to antiviral therapy [10–12]. These studies defined rs12979860 CC and rs8099917 TT as a favorable *IL28B* genotype during HCV infection. *IL28B* expression is higher in individuals with rs12979860 CC and rs8099917 TT genotypes than in those with rs12979860 non-CC and rs8099917 non-TT genotypes [13–15]. With HCV, elevated expression of *IL28B* is associated with virus clearance, a positive response to therapy, and a better disease outcome [11, 12, 16].

IL 28B or interferon (IFN) λ 3 together with IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL28A), and IFN- λ 4, constitute the type III IFN family (reviewed in [17, 18]). The members of the IFN- λ family interact through unique receptors that are distinct from type I (IFN- α/β) and type II (IFN- γ) IFN receptors [17–19]. The expression of the IFN- λ receptor is limited primarily to epithelial and immune cells. IFN- λ is coexpressed together with other type I IFNs by virus-infected cells, triggering the Jak-STAT pathway [17, 18] and resulting in the expression of IFN-stimulated genes involved in the antiviral response [17].

ANDV infection induces IFN- λ expression in Vero E6 cell lines, suggesting a possible link between IFN- λ expression and a cellular antiviral response [20]. In addition, pretreatment of cultured cells with IFN- λ inhibits infection by Hantaan virus [21], the prototypic hantavirus. Based on these reports linking hantavirus infection and disease outcome with IFN- λ and TNF- α [9, 20, 21], we designed this case-control genetic association analysis study specifically to address whether there is a link between the outcome of ANDV-induced disease in Chilean patients and *IL28B* SNPs rs12979860 and rs8099917, known to affect *IL28B* protein expression [13–15], or SNP rs1800629, known to play a role in determining TNF- α levels [22].

Table 1. Characteristics of Andes Virus-Infected Patients (n = 238)

Variable	Patients, No. (%) ^a
Sex ^b	
Male	167 (70)
Female	70 (30)
Age, mean (SD), y ^c	34 (16)
Age group	
0–15 y	22 (9.8)
16–30 y	77 (34.2)
31–50 y	89 (39.6)
51–80 y	37 (16.4)
Area (south latitude) ^d	
North (17°30' to 32°16')	2 (0.9)
Center (32°02' to 36°33')	71 (30.3)
South (36°00' to 56°30')	161 (68.8)
Area of infection ^e	
Urban	22 (10.1)
Rural	197 (89.9)
Risk factor ^f	
Rural resident	120 (73.6)
Farm worker	47 (37.0)
Forestry worker	9 (8.3)
Excursionist	44 (34.4)
Contact case	16 (14.5)
Mouse bite	1 (0.9)
Outcome	
Mild	104 (43.7)
Severe ^g	134 (56.3)
Death	59 (24.8)

Abbreviation: SD, standard deviation.

^a Data represent No. (%) of patients unless otherwise specified.

^b Data were available for 237 patients.

^c Data were available for 225 patients.

^d Data were available for 234 patients.

^e Data were available for 219 patients.

^f Risk factors were calculated for 163, 127, 109, 128, 110, and 107 patients respectively.

^g Including the 59 deceased patients.

MATERIAL AND METHODS

Study Population and Biological Samples

This study included 238 peripheral blood, plasma, or serum samples from patients infected with ANDV, collected at the time of hospital admission, between January 2006 and January 2014. Sample selection was based on availability. Approval for the use of the samples and for the designed research protocol was obtained from the Ethical Review Board of the Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile (code 12–292). ANDV infection was confirmed by positive hantavirus immunoglobulin M serology or by ANDV genome detection using reverse-transcription polymerase chain reaction [23, 24]. According to the

Table 2. Available Clinical and Laboratory Findings at the Time of Sample Collection

Variable	Patients, No. (%)		P Value
	Severe Disease ^a	Mild Disease ^a	
Fever (>38.5°C)	127 (94.5)	97 (96.9)	.30
Gastrointestinal symptoms	115 (69.6)	86 (65.1)	.30
Headache	118 (85.6)	92 (92.4)	.09
Myalgia	123 (84.6)	93 (91.4)	.10
Respiratory distress	127 (94.5)	88 (69.3)	<.001
Infiltrates on chest radiograph	118 (94.1)	88 (80.7)	.003
Blood shift (>10% bands)	80 (66.3)	57 (49.1)	.33
Atypical lymphocytosis ^b	56 (46.4)	42 (38.1)	.27
Thrombocytopenia ^c	117 (98.3)	83 (96.4)	.34
Increased hematocrit ^d	110 (58.2)	71 (42.2)	.03

^a Classified according to clinical outcome.

^b Defined as >10% atypical lymphocytes.

^c Defined as <150,000 mm³.

^d Defined as >52% for men and >48% for women.

patients' final clinical outcome, samples were grouped by the authors into mild and severe infection categories (Tables 1 and 2). A mild hantavirus infection was characterized as a febrile illness with nonspecific symptoms (eg, headache, myalgias, chills, gastrointestinal symptoms) with no or minimal respiratory compromise. Severe cases were characterized as exhibiting rapid and progressive impaired lung function requiring oxygen support and the use of vasoactive drugs, followed by the onset of shock, or death.

DNA Extraction and SNP Genotyping

The distribution of the evaluated SNPs was determined with total genomic DNA from 500 nonrelated and ANDV-uninfected individuals, obtained from a well-characterized DNA library considered representative of the Chilean population [25–28], the control cohort. Genomic DNA was extracted from samples using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), according to protocols described elsewhere [25, 29]. Genotyping of SNPs rs12979860 and rs8099917 was performed as described elsewhere [25]. Genotyping of the rs1800629 SNP was performed using a TaqMan pre-designed SNP assay (Applied Biosystems; reference C_7514879_10). The amplification reaction was conducted in a Stratagene Mx3000P thermal cycler (Agilent Technologies), and the correct assignment of alleles in each sample was attributed automatically by MXPro QPCR software version 4.10 (Agilent Technologies), as described elsewhere [25]. Positive and negative controls, described in a previous study [25], were used in each genotyping assay.

Statistical Analysis

The clinical symptoms exhibited by patients at admission were analyzed using a 1-tailed Fisher exact test for each variable;

analyses were performed with GraphPad software (version 5.1; GraphPad). The association between polymorphisms and the severity of infection was calculated using a 2-tailed Fisher exact test with a 2 × 2 contingency table assuming a minor allele recessive effect model for rs12979860 and rs8099917 and a minor allele dominant effect model for rs1800629; analyses were performed with GraphPad (version 5.1) and OpenEpi (version 3.01) software [30]. A χ^2 test was used to verify any discrepancies of distribution from Hardy–Weinberg equilibrium in the ANDV-infected population [31]. A Wilcoxon matched pairs test was used to determine differences between genotype frequencies in the control and ANDV-infected groups. Differences were considered significant at $P < .05$.

RESULTS

Analysis of *IL28B* SNPs in ANDV-Infected Patients

Demographic information available for patients is included in Table 1. Clinical information reported at the time of sample collection is in Table 2. Most samples ($n = 232$) were obtained from hospitals located in regions that overlap with the geographic distribution of the virus reservoir (Table 1; center and south) [2]. The mean (standard deviation) age of the patients was 34 (16) years, and 70% were male (Table 1). Most patients declared themselves as having been in a high-risk geographic location (Table 1) and exhibited symptoms typical of hantavirus-induced distress (Table 2).

The classification of HCPS cases into severe, mild, and self-limited forms has been shown to have a prognostic value, with statistically significant differences between survivors and non-survivors [32]. Thus, based on the available clinical information, the ANDV-infected patients were divided into 2 main groups, mild or severe infection, depending on the final clinical outcome [32]. That outcome was not associated with the patient's sex; 55.7% of all males and 58.6% of all female patients were classified as having severe infection. A univariate analysis revealed that respiratory distress, radiographic signs of pulmonary disease, and high hematocrit levels at the time of sample collection differed significantly according to clinical outcome (Table 2).

SNP analysis in ANDV-infected patients revealed that the frequencies for the rs12979860 CC, CT, and TT genotypes were 0.44, 0.39, and 0.17, respectively, compared with 0.50, 0.37, and 0.13 for the rs8099917 TT, GT, and GG genotypes (Figure 1A). The allele frequencies of rs12979860 and rs8099917 within the group of ANDV-infected patients were similar to those reported for the control cohort, in which the rs12979860 CC, CT, and TT genotype frequencies are 0.37, 0.44, and 0.19, respectively, and the rs8099917 TT, GT and GG genotype frequencies were 0.47, 0.43, and 0.10 [25]. A direct comparison of the

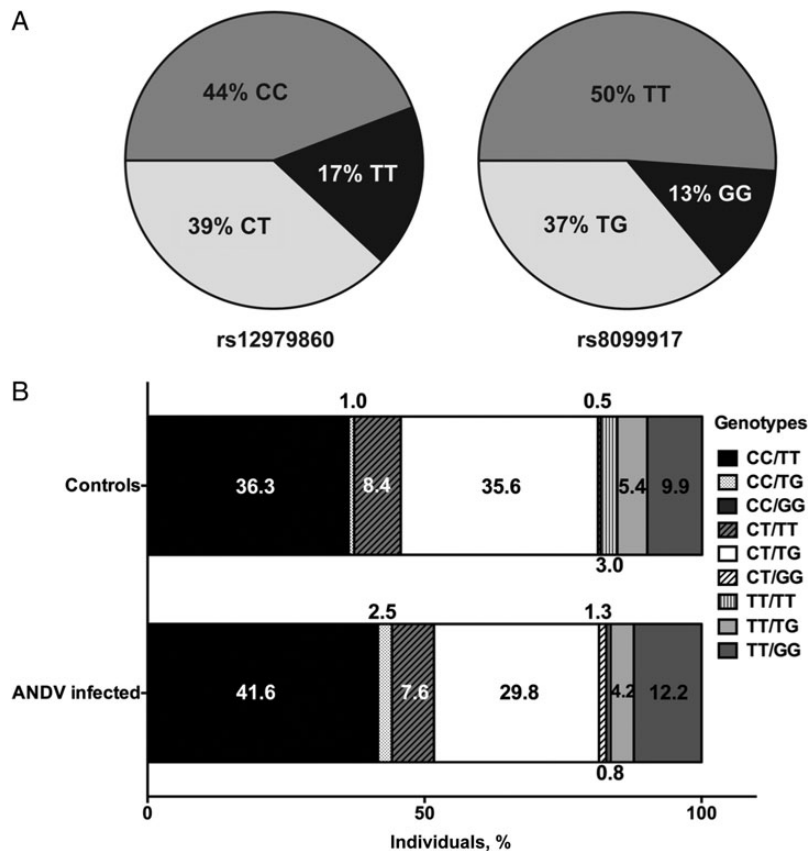


Figure 1. Interferon λ single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among the studied population. *A*, Distribution of rs12979860 and rs8099917 SNP genotypes among 238 Andes virus (ANDV)-infected patients. *B*, Frequency of the genotype combination for the 2 SNPs rs12979860 and rs8099917 in control population ($n = 405$) and ANDV-infected ($n = 238$) population. The total number of individuals in each group was defined as 100%, and the percentages of individuals with 1 of the 9 possible genotypes were calculated. The numbers within each box correspond to the percentage of individuals with a particular genotype. Control group data were sourced from a previous report [25].

different combinations of genotypes for SNPs rs12979860 and rs8099917 between noninfected and ANDV-infected individuals showed no significant variations in the genotype distribution (Figure 1*B*).

There was an increase in individuals showing homozygosity for the major C allele in rs12979860 and major T allele in rs8099917 among the ANDV-infected population (Figure 1*B*). Within the control cohort, both SNP genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium (χ^2 test, $P > .1$) [25]. In contrast, in infected patients these SNPs were found not to be in equilibrium (rs12979860 ($\chi^2 = 6.61$; $P = .01$); rs8099917 ($\chi^2 = 5.80$ $P = .01$)), suggesting a possible selection effect.

Link Between *IL28B* SNPs and the Severity of ANDV-Associated Pathogenesis

Next, we evaluated whether a correlative link existed between *IL28B* SNPs and the severity of ANDV-associated pathogenesis. Analysis of SNP rs12979860 revealed a link between the

genotypes that carry the minor T allele homozygosity (41 patients) and the severity of ANDV infection (odds ratio, 2.644; 95% CI, 1.317–5.309; $P = .006$) (Figure 2*A*). These observations suggest that homozygosity for the minor T allele is associated with a mild disease progression. Analysis of SNP rs8099917 also revealed a link between homozygosity for the minor G allele (32 patients) (odds ratio, 2.421; 95% CI, 1.123–5.217; $P = .034$) and mild disease progression (Figure 2*B*).

We then evaluated *IL28B* SNPs in the subpopulation of individuals who died due to HCPS (59 patients; 24.8% of all studied cases) (Table 1). Consistent with our findings for SNP rs12979860 in the whole infected cohort, 88.1% of deceased patients showed heterozygosity or homozygosity for the major C allele, while for SNP rs8099917, 91.5% of deceased patients were heterozygote or homozygote for the major T allele (Figure 2*C*). This observation strongly suggests that heterozygosity or homozygosity for the major alleles in both *IL28B* SNPs is associated with the severity of the disease caused by ANDV.

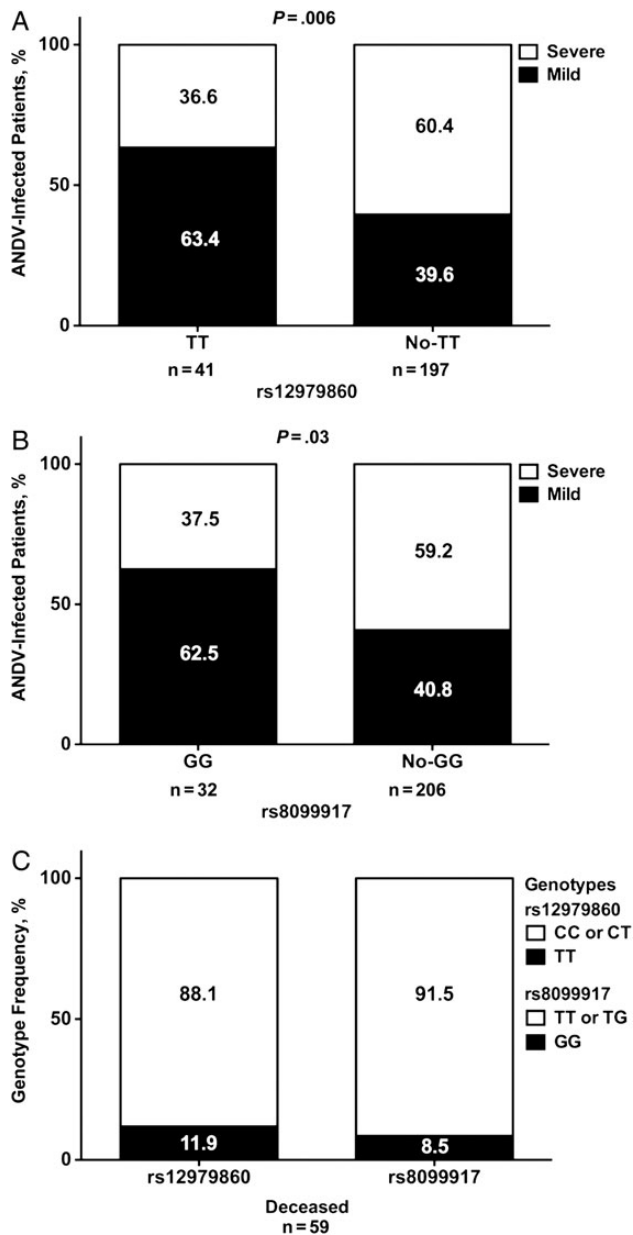


Figure 2. Association between the severity of Andes virus (ANDV) pathogenesis and interferon λ single-nucleotide polymorphism (SNP) genotype. Patients were grouped according to the SNP rs12979860 (A) and rs8099917 (B) genotypes. Each genotype was divided into 2 groups: those with a homozygous status for the minor allele, and those with a heterozygous or homozygous status for the major allele. The total number of patients in each group was defined as 100%, and the severity of ANDV-associated disease was evaluated as a dichotomous variable using a Fisher exact test. The number within each box corresponds to the percentage of patients with mild or severe disease. C, Total number of deceased patients was grouped according to the genotype for SNPs rs12979860 and rs8099917. The number within each box corresponds to the percentage of patients with a protective genotype (homozygous for the minor allele) and with a risk genotype (heterozygous or homozygous status for the major allele).

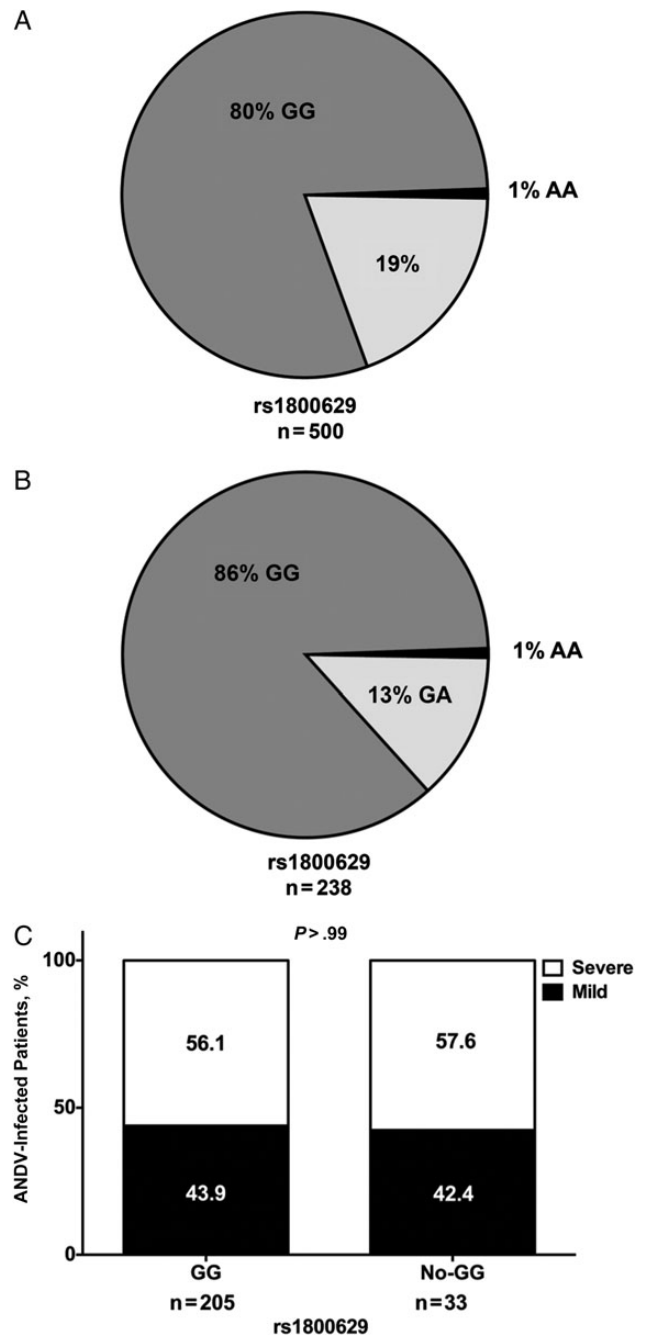


Figure 3. Polymorphism analysis for tumor necrosis factor α gene (*TNF- α*). A, Distribution of *TNF- α* single-nucleotide polymorphism (SNP) rs1800629 among 500 noninfected individuals obtained from a well characterized DNA library considered e representative of the Chilean population [25–28]. The total number of individuals was defined as 100%. B, Distribution of *TNF- α* SNP rs1800629 among 238 patients infected with Andes virus (ANDV). The total number of patients was defined as 100%. C, ANDV-infected patients were grouped into those with a homozygous status for the major allele (GG) and those with a heterozygous or homozygous (non-GG) status for the minor allele. The total number of patients in each group was defined as 100%, and the severity of ANDV-associated disease was evaluated as a dichotomous variable using a Fisher exact test. The number within each box corresponds to the percentage of patients with mild or severe disease.

No Link Between *TNF- α* Gene Polymorphism –308G>A and the Severity of ANDV-Associated Pathogenesis

No data are available regarding the allelic frequencies of SNP rs1800629 polymorphism within the Chilean population. Thus, we analyzed the genomic DNA from 500 noninfected individuals, obtained from a well-characterized DNA library considered representative of the Chilean population [25–28]. The frequencies for the rs1800629 GG, GA, and AA genotypes were 0.80, 0.19, and 0.01, respectively (Figure 3A). Next, we evaluated SNP rs1800629 in ANDV-infected patients; frequencies for the rs1800629 GG, GA, and AA genotypes were 0.86, 0.13, and 0.01, respectively (Figure 3B). For both control and ANDV-infected groups, the SNP was in Hardy–Weinberg equilibrium (χ^2 test, $P > .1$). The allele frequencies of SNP rs1800629 were similar in the control cohort and in ANDV-infected patients. *TNF- α* SNP rs1800629 was then compared between patients with mild versus severe disease pathogenesis. The distribution of *TNF- α* alleles of SNP rs1800629 were not observably correlated with the severity of outcome of the infection (Figure 3C).

DISCUSSION

There is considerable evidence to suggest that immune mechanisms rather than direct viral cytopathology are responsible for the massive vascular dysfunction and plasma leakage displayed by HCPS (reviewed in [4, 5]). A robust T-cell response is generated in humans during hantavirus infection, followed by a long-lived memory T-cell response [33]. However, experiments conducted in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), which develop a disease similar to HCPS on infection with ANDV, suggest that ANDV-induced disease is not the result of T-cell-mediated immunopathology [34–36]. At the same time, findings of some studies indicate that specific HLA alleles can be associated with either mild or severe disease [33, 37]. In Sin Nombre virus–infected patients with HCPS, the HLA-B*35 allele has been associated with a severe disease [37], whereas in ANDV-infected patients with HCPS, HLA-B*35 restricted memory T-cell responses were associated with a mild disease outcome [33]. Even though results for Sin Nombre virus and ANDV seem contradictory, both reports raise the possibility that host factors, distinct from T-cell involvement, might be linked to the pathogenesis and outcome of ANDV infection [33, 37].

Infection of Vero E6 cells by ANDV induces the expression of IFN- λ [20]. The level of expression of IFN- λ influences the outcome of infection by several different viruses including the prototype hantavirus Hantaan [11, 21, 38]. These observations led us to evaluate the potential effect of *IL28B* genetic variation on the outcome of ANDV infection. We analyzed samples from a total of 238 patients, all confirmed as ANDV infected (Figures 1 and 2). Although the sample size may seem marginal

and a limitation to the present study, it nevertheless corresponds to 60.4% of all ANDV infections reported in Chile between January 2006 and January 2014.

In recent years, public and private healthcare systems in Chile have worked together to improve the diagnosis of HCPS and the intensive care therapeutic approach to cases of ANDV infection. The clinical guidelines for management of ANDV-infected patients are followed by all intensive care units throughout the country (Hantavirus Clinical Guidelines/Department of Epidemiology Chilean Ministry of Health; <http://www.minsal.cl>). On this basis, we believe it is fair to assume that the outcomes of ANDV infection observed in the studied cohort were not unduly influenced by variability in the application of management procedures across the locations of sample collection (Table 1). *IL28B* genotyping revealed that in the analyzed cohort SNPs seemed biased toward a genotype associated with a poor disease outcome, rs12979860 CC and rs8099917 TT (Figure 1). This observation was somewhat expected, because serological studies conducted in endemic regions of Chile have reported a nonnegligible proportion of clinically asymptomatic ANDV infections [39, 40].

Results suggest that heterozygosity or homozygosity for the major alleles of *IL28B* SNPs rs12979860 C and rs8099917 T, known to be associated with high levels of *IL28B* expression [13–15], are linked with a poor disease outcome in ANDV-infected patients (Figure 2). These data represent a reversal of what is observed in HCV infections where *IL28B* SNP rs12979860 CC and rs8099917 TT are considered protective [11, 12]. Albeit unexpected and counterintuitive, our findings suggest that in contrast to what has been described for HCV, the innate immune system might play an important, yet not fully characterized, role in ANDV pathogenesis.

The precise mechanisms underlying the association between severe ANDV infection and the *IL28B* genotype are still obscure because this study was not designed to evaluate cytokine expression through time. Therefore, no direct conclusions can be drawn on any association between *IL28B* expression and ANDV disease progression. Nonetheless, the direct connection between *IL28B* SNPs rs12979860 and rs8099917 and the differential expression of *IL28B* has been well documented by others [13–15]. Results presented herein establish a clear link between genotypes rs12979860 CC/CT and rs8099917 TT/TG, an elevated *IL28B* expression phenotype [13–15], and severe ANDV-induced disease. In turn, this is potentially suggestive of excessive cytokine production and signaling, with resulting effects on *IL28B* expression playing a role in the progression of ANDV-associated disease. In agreement with this possibility, high levels of cytokine-producing cells are seen in the lungs of patients with HCPS after death [41], the pulmonary fluid of patients with HCPS seems to be exudative [42], and proinflammatory mediators are found at elevated levels in the plasma as

well as the renal interstitium of patients with acute hantavirus-induced illness [43, 44]. It is well documented that IFN- λ cytokines, including IL28B, promote a prolonged inflammatory cytokine response to pathogens [17]. It is plausible to predict that an increased magnitude of this response might make pathogen clearance in the immune system less efficient and promote disease [45, 46].

Our discovery of an apparent association between *IL28B* SNPs and the severity of ANDV-induced pathogenesis, however, might not be a general phenomenon applicable to all hantavirus induced illnesses. The disease caused by New World hantaviruses HCPS shares many (though by no means all) clinical features of the disease caused by the Old-World hantaviruses, known as *hemorrhagic fever with renal syndrome*. This might indicate that the biological mechanisms underlying HCPS and hemorrhagic fever with renal syndrome are not equivalent. The level of IFN- λ induction varies in Vero E6 cells infected with different hantaviruses indicating that not all viruses induce a similar IFN- λ response [20].

Patients with Puumala virus infection have been shown to have significantly lower serum levels of IFN- λ during the acute phase than during the convalescent phase [21]. The clinical importance of this observation and its possible relation to what is being reported herein remain to be addressed, but the finding may suggest that the level of IFN- λ expression is central to the resolution of the infection [21]. It should be noted that all patients included in the current study are expected to express *IL28B* in response to ANDV infection. What is likely to vary between individuals is the level of *IL28B* production, according to genotypes in *IL28B* SNPs [13–15]. It remains to be elucidated what level of *IL28B* production is required to clear ANDV infection, as opposed to excessive expression levels that may lead to severe disease.

A previous report described an association between *TNF- α* rs1800629 and the outcome of Araraquara virus-induced HCPS [9]. In the case of Puumala virus infection, Kanerva et al [47] reported an association between SNP rs1800629 and severe nephropathia epidemica in Finnish patients. It was tempting to predict that a similar association may exist for ANDV-induced HCPS. Our results show that a link between *TNF- α* rs1800629 and the outcome of ANDV-induced HCPS could not be established in the studied cohort (Figure 3). This may suggest that ethnic background should be accounted for when establishing genetic associations. As shown, rs1800629 AA genotype is poorly represented within the Chilean population (Figure 3A).

To date, there are few examples of the use of patient genetic information in routine clinical practice. Here we present compelling evidence that knowledge of host genomic background allows the severity of ANDV-induced disease to be predicted. In conclusion, our findings show that *IL28B* SNPs rs12979860

and rs8099917, but not *TNF- α* SNP rs1800629, are associated with the severity of ANDV-induced disease, potentially allowing these molecular markers to be used as predictors of clinical outcome in ANDV-infected patients.

Notes

Acknowledgments. We thank Drs Alejandro Soza, Jaime Cerda, and Michael Kann for critical reading of the manuscript and Dr Michael Rau for editing it.

Financial support. This work was supported by the Iniciativa Científica Milenio del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia (project P09/016-F to M. L. L.), the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (grant U01AI045452 to M. F. and M. L. L.), Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (grant 1130303 to J. F. M.) Fondo de Financiamiento de Centros de Investigación en Áreas Prioritarias Center for Genome Regulation (grant 15090007 to J. F. M.), Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (doctoral fellowship to J. A.), and the Uruguayan Comisión Sectorial de Investigación Científica (research fellowship to N. E. C.).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, et al. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat Rev Microbiol* **2013**; 11:539–50.
2. Medina RA, Torres-Perez F, Galeno H, et al. Ecology, genetic diversity, and phylogeographic structure of Andes virus in humans and rodents in Chile. *J Virol* **2009**; 83:2446–59.
3. Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, Lopez NM, Rossi CM, Rabinovich RD. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* **1998**; 241:323–30.
4. Jonsson CB, Hooper J, Mertz G. Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res* **2008**; 78:162–9.
5. Macneil A, Nichol ST, Spiropoulou CF. Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res* **2011**; 162:138–47.
6. Toro J, Vega JD, Khan AS, et al. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerg Infect Dis* **1998**; 4:687–94.
7. Dolgin E. Hantavirus treatments advance amidst outbreak in US park. *Nat Med* **2012**; 18:1448.
8. Charbonnel N, Pages M, Sironen T, et al. Immunogenetic factors affecting susceptibility of humans and rodents to hantaviruses and the clinical course of hantaviral disease in humans. *Viruses* **2014**; 6:2214–41.
9. Borges AA, Donadi EA, Campos GM, et al. Association of –308G/A polymorphism in the tumor necrosis factor- α gene promoter with susceptibility to development of hantavirus cardiopulmonary syndrome in the Ribeirao Preto region, Brazil. *Arch Virol* **2010**; 155:971–5.
10. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. *IL28B* genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol* **2011**; 106:38–45.
11. Hayes CN, Imamura M, Aikata H, Chayama K. Genetics of *IL28B* and HCV—response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2012**; 9:406–17.
12. Matsuura K, Watanabe T, Tanaka Y. Role of *IL28B* for chronic hepatitis C treatment toward personalized medicine. *J Gastroenterol Hepatol* **2014**; 29:241–9.
13. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet* **2009**; 41:1100–4.

14. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* **2009**; 41:1105–9.
15. Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, et al. *IL28B* genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **2010**; 52:1888–96.
16. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **2009**; 461:798–801.
17. Kotenko SV. IFN- λ s. *Curr Opin Immunol* **2011**; 23:583–90.
18. O'Brien TR, Prokunina-Olsson L, Donnelly RP. IFN- λ 4: the paradoxical new member of the interferon lambda family. *J Interferon Cytokine Res* **2014**; 34:829–38.
19. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* **2003**; 4:63–8.
20. Prescott J, Hall P, Acuna-Retamar M, et al. New World hantaviruses activate IFN λ production in type I IFN-deficient Vero E6 cells. *PLoS One* **2010**; 5:e11159.
21. Stoltz M, Ahlm C, Lundkvist A, Klingstrom J. Lambda interferon (IFN- λ) in serum is decreased in hantavirus-infected patients, and in vitro-established infection is insensitive to treatment with all IFNs and inhibits IFN- γ -induced nitric oxide production. *J Virol* **2007**; 81:8685–91.
22. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**; 94:3195–9.
23. Lee HW, Calisher C, Schmaljohn C, eds. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (Hantaviruses), Asan Institute for Life Sciences, Seoul, Korea, **1999**.
24. Padula PJ, Rossi CM, Della Valle MO, et al. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. *J Med Microbiol* **2000**; 49:149–55.
25. Angulo J, Pino K, Pavez C, et al. Genetic variations in host *IL28B* links to the detection of peripheral blood mononuclear cells-associated hepatitis C virus RNA in chronically infected patients. *J Viral Hepat* **2013**; 20:263–72.
26. Miquel JF, Covarrubias C, Villaroel L, et al. Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroenterology* **1998**; 115:937–46.
27. Olmos P, Bastias MJ, Vollrath V, et al. C(–106)T polymorphism of the aldose reductase gene and the progression rate of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* **2006**; 74:175–82.
28. Nervi F, Miquel JF, Alvarez M, et al. Gallbladder disease is associated with insulin resistance in a high risk Hispanic population. *J Hepatol* **2006**; 45:299–305.
29. Cariani E, Critelli R, Rota C, Luongo M, Trenti T, Villa E. Interleukin 28B genotype determination using DNA from different sources: a simple and reliable tool for the epidemiological and clinical characterization of hepatitis C. *J Virol Methods* **2011**; 178:235–8.
30. Sullivan KM, Dean A, Soe MM. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep.* **2009**; 124:471–4.
31. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol* **2009**; 169:505–14.
32. Boroja M, Barrie JR, Raymond GS. Radiographic findings in 20 patients with hantavirus pulmonary syndrome correlated with clinical outcome. *AJR Am J Roentgenol* **2002**; 178:159–63.
33. Manigold T, Mori A, Graumann R, et al. Highly differentiated, resting gn-specific memory CD8⁺ T cells persist years after infection by Andes hantavirus. *PLoS Pathog* **2010**; 6:e1000779.
34. Brocato RL, Hammerbeck CD, Bell TM, Wells JB, Queen LA, Hooper JW. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome in immunosuppressed Syrian hamsters infected with Sin Nombre virus. *J Virol* **2013**.
35. Prescott J, Saffronetz D, Haddock E, Robertson S, Scott D, Feldmann H. The adaptive immune response does not influence hantavirus disease or persistence in the Syrian hamster. *Immunology* **2013**; 140:168–78.
36. Hammerbeck CD, Hooper JW. T cells are not required for pathogenesis in the Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *J Virol* **2011**; 85:9929–44.
37. Kilpatrick ED, Terajima M, Koster FT, Catalina MD, Cruz J, Ennis FA. Role of specific CD8⁺ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome. *J Immunol* **2004**; 172:3297–304.
38. Jewell NA, Cline T, Mertz SE, et al. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J Virol* **2010**; 84:11515–22.
39. Castillo C, Sanhueza L, Tager M, Munoz S, Ossa G, Vial P. Seroprevalence of antibodies against hantavirus in 10 communities of the IX Region of Chile where hantavirus infection were diagnosed [in Spanish]. *Rev Med Chil* **2002**; 130:251–8.
40. Tager Frey M, Vial PC, Castillo CH, Godoy PM, Hjelle B, Ferres MG. Hantavirus prevalence in the IX Region of Chile. *Emerg Infect Dis* **2003**; 9:827–32.
41. Mori M, Rothman AL, Kurane I, et al. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* **1999**; 179:295–302.
42. Bustamante EA, Levy H, Simpson SQ. Pleural fluid characteristics in hantavirus pulmonary syndrome. *Chest* **1997**; 112:1133–6.
43. Linderholm M, Ahlm C, Settergren B, Waage A, Tarnvik A. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* **1996**; 173:38–43.
44. Temonen M, Mustonen J, Helin H, Pasternack A, Vaheri A, Holthofer H. Cytokines, adhesion molecules, and cellular infiltration in nephropathia epidemica kidneys: an immunohistochemical study. *Clin Immunol Immunopathol* **1996**; 78:47–55.
45. Cohen TS, Prince AS. Bacterial pathogens activate a common inflammatory pathway through IFN λ regulation of PDCD4. *PLoS Pathog* **2013**; 9:e1003682.
46. Cohen TS, Prince AS. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* **2013**; 123:1630–7.
47. Kanerva M, Vaheri A, Mustonen J, Partanen J. High-producer allele of tumour necrosis factor-alpha is part of the susceptibility MHC haplotype in severe Puumala virus-induced nephropathia epidemica. *Scand J Infect Dis* **1998**; 30:532–4.

An evolutionary insight into Newcastle disease viruses isolated in Antarctica

Martin Soñora¹ · Pilar Moreno¹ · Natalia Echeverría¹ · Sabrina Fischer¹ · Victoria Comas¹ · Alvaro Fajardo¹ · Juan Cristina¹

Received: 9 December 2014 / Accepted: 17 April 2015
© Springer-Verlag Wien 2015

Abstract The disease caused by Newcastle disease virus (NDV) is a severe threat to the poultry industry worldwide. Recently, NDV has been isolated in the Antarctic region. Detailed studies on the mode of evolution of NDV strains isolated worldwide are relevant for our understanding of the evolutionary history of NDV. For this reason, we have performed Bayesian coalescent analysis of NDV strains isolated in Antarctica to study evolutionary rates, population dynamics, and patterns of evolution. Analysis of F protein cleavage-site sequences of NDV isolates from Antarctica suggested that these strains are lentogenic. Strains isolated in Antarctica and genotype I reference strain Ulster/67 diverged from ancestors that existed around 1958. The time of the most recent common ancestor (MRCA) was established to be around 1883 for all class II viruses. A mean rate of evolution of 1.78×10^{-3} substitutions per site per year (s/s/y) was obtained for the F gene sequences of NDV strains examined in this study. A Bayesian skyline plot indicated a decline in NDV population size in the last 25 years. The results are discussed in terms of the possible role of Antarctica in emerging or re-emerging viruses and the evolution of NDV populations worldwide.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-015-2434-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Juan Cristina
cristina@cin.edu.uy

¹ Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igua 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

Introduction

The disease caused by Newcastle disease virus (NDV) is one of the most important diseases of poultry, affecting the poultry industry worldwide [1]. NDV belongs to the genus *Avulavirus* of the family *Paramyxoviridae*, and its genome is a non-segmented, single-stranded, negative-sense RNA molecule of approximately 15,186 nucleotides (nt) in length [2].

NDV isolates have been grouped by virulence phenotype, with lentogenic, mesogenic, and velogenic strains, in order of increasing virulence [3]. Lentogenic viruses typically cause subclinical infections or mild respiratory disease. Mesogens are of intermediate virulence, usually resulting in moderate respiratory disease with occasional nervous signs. Velogens are the most virulent viruses and may cause extensive hemorrhagic lesions, particularly in the gastrointestinal tract (viscerotropic), and/or a predominance of nervous signs (neurotropic) [4].

NDV infection is initiated by the action of two envelope glycoproteins. One of these mediates attachment of the virus to a host-cell receptor and is designated HN (hemagglutinin-neuraminidase). The other glycoprotein, designated as the fusion (F) protein, is responsible for virus penetration into the host cell and syncytium formation [5]. The F protein plays a key role in viral virulence and is a major target for the immune response [6]. The NDV F protein is a trimeric type I integral membrane protein that is synthesized as an inactive precursor, F0 (66 kDa), which is posttranslationally cleaved by host-cell proteases into two disulfide-linked subunits, the N-terminal F2 (12.5 kDa) and the C-terminal F1 (55 kDa) [7, 8]. The sequence of the F protein cleavage site is a major determinant of NDV pathogenicity. The cleavage sites of virulent NDV strains usually contain multiple basic residues, whereas avirulent strains have fewer basic residues [9].

The consensus sequence of the F protein cleavage site of velogenic and mesogenic strains is ¹¹²(R/K)RQ(R/K)RF¹¹⁷, while the consensus sequence of the lentogenic F cleavage site is ¹¹²(G/E)(K/R)Q(G/E)RL¹¹⁷ [10]. Most of the recent virulent NDV strains bear the virulence motif ¹¹²RRQKRF¹¹⁷ at the cleavage site of their F0 protein [11, 12]. Seven neutralizing epitopes have been mapped on the F protein of NDV [5, 13, 14]. Critical amino acids involved in neutralization sites are sites 72, 74, 75, 78, 79 and 343, as well as a stretch of amino acids from residues 157 to 171 [14, 15].

NDV strains are divided into two classes based on genetic analysis: class I strains, which are mainly isolated from wild birds and are generally avirulent, and class II strains, which are isolated from wild and domestic birds can be either virulent or avirulent [16]. Class I viruses comprise a single genotype, while class II viruses are divided into 18 or possibly 19 genotypes (I–XIX) [17–19]. Strains of genotypes V, VI and VII of class II are currently circulating in chickens throughout the world [20].

Since NDV was first reported in poultry in 1926, vaccination has been widely used for prevention and control of the disease caused by NDV [21]. The most commonly used live vaccines are LaSota and Clone-30, which belong to genotype II [22]. Characterization of NDV strains is important to evaluate field changes, anticipate new outbreaks, and develop adequate control measures [23]. Large gaps in our current knowledge in the areas of epidemiology and evolution limit the possibilities for controlling the disease [24, 25].

Three main panzootics have occurred in the last century. The first one (1926 to 1960) was caused by viruses belonging to genotypes II, III and IV, while the second (1960 to 1973) and third (1970–1980) were caused by viruses of genotypes V–VI [14]. Severe outbreaks in Western and Southern Europe [26, 27], South Africa [28] and Taiwan [29] in the 1990s were caused by genotype VII, the currently circulating genotype in Asia, Africa and Europe [14]. A recent outbreak of NDV in South America (Venezuela) has also been attributed to a genotype VII virus, suggesting that viruses of this genotype are spreading worldwide [30, 31].

In 2010, infection by virulent NDV was confirmed in 80 countries, including infections of wild birds in Canada, Germany, Israel, Italy, Kenya, Mongolia and the USA, and infections in domestic poultry in countries of North and South America, Europe, Africa, and Asia [32]. Moreover, recent studies revealed the isolation of NDV in penguins from King George Island in the Antarctic region [33]. Detailed studies on the mode of evolution of these new NDV strains are relevant for inferring the evolutionary history of NDV. In order to gain insight into these matters, Bayesian coalescent studies were performed to investigate

the evolutionary rates, population dynamics and patterns of evolution of NDV.

Materials and methods

Sequences

Nucleotide sequences from NDV strains were obtained using ARSA from the DDBJ database (available at: <http://arsa.ddbj.nig.ac.jp/>). Strain names and accession numbers can be found in Supplementary Material Table 1.

Sequence alignment and *in silico* translation of nucleotide sequence

Sequences were aligned using the MUSCLE program [34]. Nucleotide sequences were translated to amino acids *in silico* using software from the MEGA 5 program [35].

Bayesian coalescent Markov chain Monte Carlo (MCMC) analysis

In order to gain insight into the evolutionary rate and mode of evolution of NDV strains, we used a Bayesian Markov MCMC approach as implemented in the BEAST package v.1.7.5 [36]. For strains included in these analyses, see Supplementary Material Table 1. First, software from the Datamonkey server [37] was used to identify the optimal evolutionary model that best fitted our sequence dataset. Akaike information criteria and the hierarchical likelihood ratio test indicated that the HKY + Γ model was the most accurate. Using this model and 50 million steps of MCMC, different population models were tested (constant population size, exponential population growth, expansion population growth, logistic population growth and Bayesian Skyline). Statistical uncertainty in the data was reflected by the 95 % highest probability density (HPD) values. Results were examined using the TRACER v1.5 program (available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) from the BEAST package. Convergence was assessed with ESS (effective sample size) values after a burn-in of 2 million steps. Models were compared by calculating the Bayes factor (BF) [38] from the posterior output of each of the models using the TRACER v1.5 program as explained on the BEAST website ([http://beast.bio.ed.ac.uk/Model comparison](http://beast.bio.ed.ac.uk/Model%20comparison)). A log BF (natural log units) values greater than 2.3 indicates strong evidence against the null model. The Bayesian skyline model was the best fit to the data. Maximum clade credibility trees were generated using the Tree Annotator program from the BEAST package and the FigTree program v1.4.1 (available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk>) was used for the visualization of the annotated trees.

Bayesian skyline plots (BSPs) were used to infer how the effective population size has changed over time [38, 39].

Results

Mapping of amino acid substitutions found in the fusion proteins of NDV strains isolated in Antarctica

Previous studies have identified NDV strains isolated in Antarctica as class II strains [33]. In order to gain insight into the virulence status of these strains, partial F gene sequences from NDV isolates from Antarctica (positions 4502 to 4995 relative to NDV reference strain LaSota, accession number AF077761) were aligned with the corresponding sequences of members of nine genotypes of class II strains for which complete genome sequences had been determined. For names and accession numbers of NDV strains included in this analysis, see Supplementary Material Table 1. Once aligned, they were translated *in silico* to amino acids using the MEGA 5 program [35], and the results are shown in Figure 1.

The F protein cleavage-site sequence of NDV isolated in Antarctica is ¹¹²GKQGRLI¹¹⁸, suggesting that the NDV strains isolated in that region of the world and included in

these studies are lentogenic strains. Nevertheless, more studies will be needed to address this issue. Moreover, no amino acid substitutions were found at positions 72, 74, 75, 78 and 79 of the F2 protein, which were previously shown to be involved in neutralization [15]. An N-linked glycosylation acceptor site (N-X-S/T, where X corresponds to any amino acid except aspartic acid or proline) at position 85-87 of the F2 protein is also conserved [9, 40], as are the cysteine residues at positions 25 and 76 of the F2 protein [41].

Bayesian coalescent analysis of NDV strains isolated in Antarctica

In order to determine the evolutionary rate and mode of evolution of the NDV population, we used a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) approach as implemented in the BEAST package [36]. In this case, the same F gene sequences from NDV strains isolated in Antarctica were aligned with corresponding sequences from 74 NDV strains, representing class I and genotypes I to XIX of class II strains. Names and accession numbers of NDV strains included in these analyses can be found in Supplementary Material Table 1. After performing the alignment and determining that the optimal evolutionary model is HKY + Γ , different population dynamic models were



Fig. 1 Alignment of F amino acid sequences of NDV strains. Strain names are shown at the left side of the figure, and their class II genotype is indicated in parentheses. Identity to the LaSota strain (genotype II) is indicated by a dash. F2 sequences are shown in bold, and F1 sequences are shown in bold and italics. Numbers above the alignment indicate amino acid positions. The F protein cleavage site

is highlighted in yellow. Amino acid substitutions detected in antigenic sites in neutralization escape mutants are indicated in turquoise [5, 6, 13]. A potential acceptor site for N-linked glycosylation at residues 85-87 is highlighted in green [8]. Cysteine residues at positions 26 and 76, which are conserved among most NDV isolates, are highlighted in fuchsia [22]

tested. The results for 50 million steps of MCMC analysis, using the HKY + Γ model, a relaxed clock and the Bayesian skyline model [42] are shown in Table 1. A mean rate of 1.78×10^{-3} substitutions per site per year (s/s/y) was obtained for the F gene sequences of NDV strains used in these studies. A maximum clade credibility tree revealed that all class II genotype strains have evolved from ancestors that existed around 1883 (130 years before the most recent isolates included in these studies, see Fig. 2). Both classes of NDV strains evolved from ancestors that existed around 1819 (Table 1). Strains isolated in Antarctica and genotype I reference strain Ulster/67 diverged from ancestors around 1958 (Fig. 2). BSPs suggested that a constant effective population size was maintained until the late 1980s (Fig. 3), where a decline in the population is observed.

Discussion

NDV strains isolated from penguins in Antarctica were assigned to genotype I of class II (Fig. 2), in agreement with previous reports [33] and with antigenic studies of NDV isolated from penguins from Antarctica that showed a reaction against a monoclonal antibody raised against NDV Ulster/67 strain (genotype I) [43]. Viruses of this genotype have been associated with outbreaks in Australia that occurred between 1998 and 2000 [44]. Genotype I viruses from these same outbreaks were found to be velogenic, and previous reports have shown that the origin of these viruses can be traced back to low-virulence NDV strains circulating in waterfowl just prior to the outbreak [45].

NDV strains circulating in one particular avian species may have the ability to cause disease in other avian species. For example, NDV strains from pigeons have been reported to be responsible for outbreaks in chickens [46–48]. Moreover, virtually all domestic and wild bird species are susceptible to infection with NDV [49]. Therefore, although the possibility of direct contact between penguins and chickens seems unlikely, other wild birds may act as

carriers of different NDV strains through transmission routes that are not yet fully understood [19].

The presence of NDV strains in Antarctica, where other avian species live, indicates the importance of NDV strain characterization in all regions of the world. Genotypes V, VI, and VII of class II are currently circulating worldwide in chickens [20]. The role of Antarctica in maintaining other NDV genotypes not circulating at the moment also reinforces the relevance of in-depth NDV surveillance studies.

The F protein cleavage-site sequence has been shown to be a major determinant of NDV virulence [50]. The F protein cleavage sites of NDV strains isolated in Antarctica were found to have the consensus cleavage site of avirulent strains (Fig. 1). These cleavage sequences are insensitive to intracellular proteases and depend on extracellular secreted proteases for cleavage, limiting the replication of avirulent strains to the respiratory and enteric tracts [8–10]. More studies will be needed in order to confirm the avirulent (lentogenic) phenotype of NDV isolated from penguins in Antarctica.

Bayesian coalescent analysis revealed a rate of evolution of 1.78×10^{-3} s/s/y for NDV strains (see Table 1). This evolutionary rate is slightly higher than the rate estimated in a recent study for full-length NDV F gene sequences (1.35×10^{-3} s/s/y), although it lies within the confidence intervals of these estimations ($0.71 - 1.98 \times 10^{-3}$ s/s/y) [21]. This evolutionary rate is comparable to rates previously estimated for other fast-evolving RNA viruses such as human immunodeficiency virus type 1 (gp160env; 2.4×10^{-3} s/s/y) [51], human respiratory syncytial virus (G; 1.9×10^{-3} s/s/y) [52] and hepatitis C virus (E2; 3.4×10^{-3} s/s/y) [53].

The time of the most recent common ancestor (MRCA) was established to be around 1883 for all class II viruses (Fig. 2). This estimate is in agreement with previous reports that established the time of the MRCA for class II NDV strains to be around 1885 [21]. This finding is also in line with studies done by Macpherson in 1956, which suggest that a disease outbreak in domestic birds in

Table 1 Bayesian coalescent inference of Newcastle disease viruses

Group ^a	Parameter	Value ^b	HPD ^c	ESS ^d
F gene sequences	Log likelihood	-5576	-5595 to -5558	4010
	Posterior	-9101	-9055 to -9150	402
	Prior	-3525	-3573 to -3483	287
	Mean rate ^e	1.78×10^{-3}	9.22×10^{-4} to 2.56×10^{-3}	228
	Root age (years)	194	104 to 308	221
	MRCA ^f	1819	1705 to 1909	

^a See Supplementary Material Table 1 for strains included in this analysis. ^b In all cases, mean values are shown. ^c High probability density values. ^d Effective sample size. ^e Mean rate was calculated in substitutions/site/year. ^f Year of the most common recent ancestor

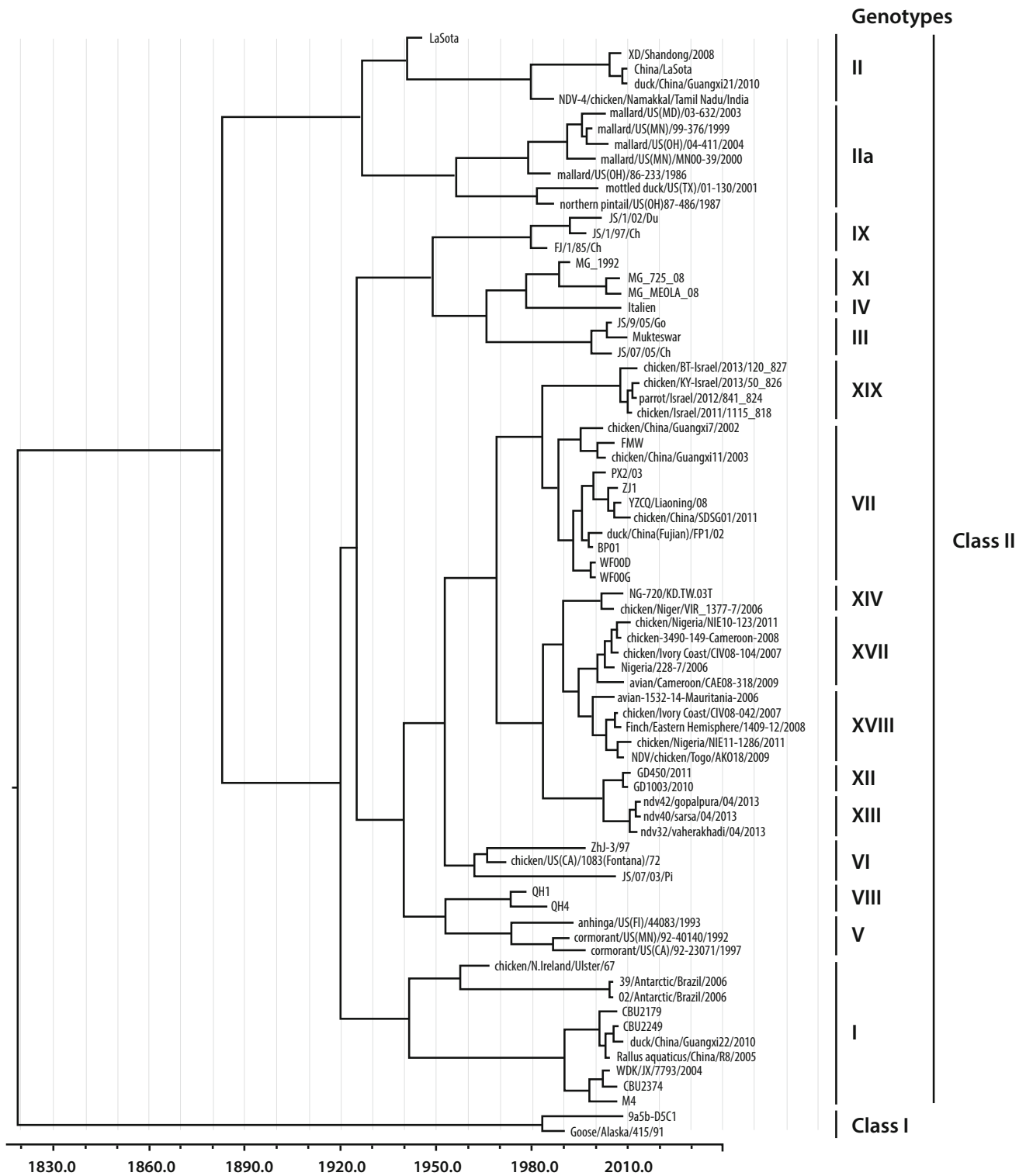


Fig. 2 Bayesian MCMC phylogenetic tree analysis of F genes of NDV strains. A maximum-credibility clade obtained using the HKY + Γ model, the Bayesian Skyline model and a relaxed clock (uncorrelated exponential) is shown. The tree is rooted to the MCRA.

Years are indicated on the x-axis. Strains are shown by name and their genotypes are indicated on the right side of the figure. Strains isolated in Antarctica are shown by black arrows

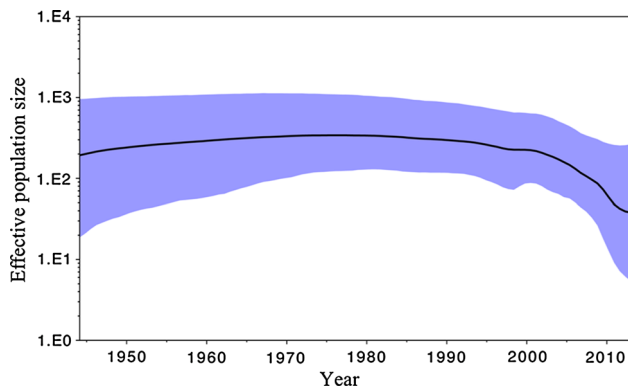


Fig. 3 Bayesian skyline plot depicting the population history of NDV strains. The x-axis indicates the year and the y-axis shows the product of effective population size and the generation length in years. The thick solid black line is the median estimate, and the blue area shows the 95 % highest probability density (HPD) values [38]

northwest Scotland between 1897 and 1898 was due to NDV [54].

In recent studies, Chong *et al.* have investigated the demographic history of NDV class II genotypes I–VII through Bayesian coalescent approaches, suggesting the maintenance of a constant effective population size until the late 1990s, when an abrupt decline with a posterior recovery (around 2000) was observed [21]. Roughly similar results were suggested by the analyses performed in the present study, which are summarized in a BSP supported by a narrow 95 % HPD (Fig. 3). Interestingly, the population dynamics observed in the last years of our analysis suggest a different behavior compared to what was reported previously, since a persistent continuous decrease in the effective population size was observed. This behavior can be explained by the larger number of class II genotypes considered in the present analysis (I–XIX), as distinct genotypes have been reported previously to exhibit different population dynamics [21]. Although the reasons for the observed decline are currently unknown, both climate change and avian influenza control measures have been suggested previously as possible factors [21]. More studies should be conducted in order to address these issues.

Considering that NDV seems to evolve rapidly towards higher virulence [55] and that several studies have reported not only increased pathogenicity but also outbreaks in vaccinated animals and increased host range [56, 57], it is becoming clear that it is important to conduct in-depth characterization of new strains isolated during the course of outbreaks worldwide to determine how these viruses are evolving. Additionally, studying viruses isolated from different wild birds and environments might contribute to our understanding of how NDV evolves and spreads around the world.

Acknowledgments We thank Instituto Antártico Uruguayo and Base Científica Antártica Artigas, Uruguay, for encouragement and support. We also thank Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for support through project PE_ALI_2009_1_1603 and PEDECIBA, Uruguay.

References

1. Samal SK (2011) Newcastle disease and related avian paramyxoviruses. In: Samal SK (ed) The biology of paramyxoviruses. Caister Academic Press, Norfolk, pp 69–114
2. Lamb R, Parks G (2007) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds) Fields virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1449–1496
3. Kim LM, King DJ, Curry PE et al (2007) Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle Disease Viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J Virol* 81:12641–12653
4. Alexander DJ (2003) Newcastle disease virus, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds) Disease of poultry, 11edn. Iowa State University Press, Ames, pp 63–87
5. Toyoda T, Gotoh B, Sakaguchi T, Kida H, Nagai Y (1988) Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization. *J Virol* 62:4427–4430
6. Neyt C, Geliebter J, Slaoui M, Morales D, Meulemans G, Burny A (1989) Mutations located on both F1 and F2 subunits of the Newcastle Disease virus fusion protein confer resistance to neutralization with monoclonal antibodies. *J Virol* 63:952–954
7. Nagai Y, Hamaguchi M, Toyoda T (1989) Molecular biology of Newcastle disease virus. *Prog Vet Microbiol Immunol* 5:16–64
8. Samal S, Khattar S, Kumar S, Collins PL, Samal SK (2012) Coordinate deletion of N-glycans from the heptad repeats of the fusion F protein of Newcastle Disease virus yields a hyperfusogenic virus with increased replication, virulence, and immunogenicity. *J Virol* 86:2501–2511
9. Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemann DD, Samal SK (2004) Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathog* 36:1–10
10. De Leeuw OS, Koch G, Hartog L, Ravenshorst N, Peeters BPH (2005) Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin–neuraminidase protein. *J Gen Virol* 86:1759–1769
11. Choi KS, Lee EK, Jeon WJ, Kwon JH (2010) Antigenic and immunogenic investigation of the virulence motif of the Newcastle disease virus fusion protein. *J Vet Sci* 11:205–211
12. Pedersen JC, Senne DA, Woolcock PR, Kinde H, King DJ, Wise MG, Panigrahy B, Seal BS (2004) Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002–2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin Microbiol* 42:2329–2334
13. Yusoff K, Nesbit M, McCartney H, Meulemans G, Alexander DJ, Collins MS, Emmerson PT, Samson AC (1989) Location of neutralizing epitopes on the fusion protein of Newcastle disease virus strain Beaudette C. *J Gen Virol* 70:3105–3109
14. Maminaiaina OF, Gil P, Briand FX et al (2010) Newcastle Disease Virus in Madagascar: identification of an original genotype

- possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. *PLoS ONE* 5:e13987
15. Mase M, Murayama K, Karino A, Inoue T (2010) Analysis of the fusion protein gene of Newcastle Disease viruses isolated in Japan. *J Vet Med Sci* 73:47–54
 16. Czeglédi A, Ujvári D, Somogyi E, Wehmann E, Werner O, Lomniczi B (2006) Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res* 120:36–48
 17. Diel DG, da Silva LH, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL (2012) Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect Genet Evol* 12:1770–1779
 18. Fernandes CC, Varanib AM, Lemos EGM, de Miranda VFO, Silva KR, Fernando FS, Montassiera MFS, Montassiera HJ (2014) Molecular and phylogenetic characterization based on the complete genome of a virulent pathotype of Newcastle disease virus isolated in the 1970s in Brazil. *Infect Genet Evol* 26:160–167
 19. Snoeck CJ, Owoade AA, Couacy-Hymann E, Alkali BR, Okwen MP, Adeyanju AT, Komoyo GF, Nakouné E, Le Faou A, Muller CP (2013) High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype and newly defined genotypes XVII and XVIII. *J Clin Microbiol* 51:2250–2260
 20. Xiao S, Paldurai A, Nayak B, Mirande A, Collins PL, Samal SK (2013) Complete genome sequence of a highly virulent Newcastle disease virus currently circulating in Mexico. *Genome Announc*. doi:10.1128/genomeA.00177-12
 21. Chong YL, Padhi A, Hudson PJ, Poss M (2010) The effect of vaccination on the evolution and population dynamics of avian paramyxovirus-1. *PLoS Pathog* 6:e1000872
 22. Rui Z, Juan P, Jingliang S, Jixun Z, Xiaoting W, Shouping Z, Xiaojiao L, Guozhong Z (2010) Phylogenetic characterization of Newcastle disease virus isolated in the mainland of China during 2001–2009. *Vet Microbiol* 141:246–257
 23. Zhang S, Wang X, Zhao C, Liu D, Hu Y, Zhao J, Zhang G (2011) Phylogenetic and pathotypical analysis of two virulent Newcastle disease viruses isolated from domestic ducks in China. *PLoS ONE* 6:e25000
 24. Susta L, Miller PJ, Afonso CL, Brown CC (2011) Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Vet Pathol* 48:349–360
 25. Afonso CL, Miller PJ (2013) Newcastle disease: progress and gaps in the development of vaccines and diagnostic tools. *Dev Biol* 135:95–106
 26. Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J et al (1998) Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* 143:49–64
 27. Herczeg J, Wehmann E, Bragg RR, Travassos-Dias PM, Hadjiev G, Werner O, Lomniczi B (1999) Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Arch Virol* 144:2087–2099
 28. Abolnik CHR, Bisschop SP, Parker ME, Romito M, Viljoen GJ (2004) A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. *Arch Virol* 149:603–619
 29. Yang CY, Shieh HK, Lin YL, Chang PC (1999) Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in western Europe. *Avian Dis* 43:125–130
 30. Perozo F, Marciano R, Afonso CL (2012) Biological and phylogenetic characterization of a genotype VII Newcastle disease virus from Venezuela: efficacy of field vaccination. *J Clin Microbiol* 50:1204–1208
 31. Diel DG, Susta L, Garcia SC, Killian ML, Brown C, Miller PJ, Afonso CL (2012) Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. *J Clin Microbiol* 50:378–387
 32. OIE (2011) World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. <http://web.oie.int>
 33. Thomazelli LM, Araujo J, Oliveira DB et al (2010) Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic region. *Vet Microbiol* 146:155–160
 34. Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinform* 5:113
 35. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
 36. Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214
 37. Delpont W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky-Pond SL (2010) Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26:2455–2457
 38. Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4:e88
 39. Suchard MA, Weiss RE, Sinsheimer JS (2001) Bayesian selection of continuous time Markov chain evolutionary models. *Mol Biol Evol* 18:1001–1013
 40. Paldurai A, Kumar S, Nayak B, Samal SK (2010) Complete genome sequence of highly virulent neurotropic Newcastle disease virus strain Texas GB. *Virus Genes* 41:67–72
 41. Seal BS (2004) Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Funct Integr Genomics* 4:246–257
 42. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22:1185–1192
 43. Alexander DJ, Manvell RJ, Collins MS, Brockman SJ, Westbury HA, Morgan I, Austin FJ (1989) Characterization of paramyxoviruses isolated from penguins in Antarctica and sub-Antarctica during 1976–1979. *Arch Virol* 109:135–143
 44. Gould AR, Kattenbelt JA, Selleck P, Hansson E, Della-Porta A, Westbury HA (2001) Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998–2000. *Virus Res* 77:51–60
 45. Kattenbelt JA, Stevens MP, Gould AR (2006) Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Res* 116:168–184
 46. Alexander DJ (1998) Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, pp 156–163
 47. Alexander DJ (1997) Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: Calnek BW (ed) Diseases of poultry. Mosby-Wolfe Iowa State University Press, Ames, pp 541–569
 48. Werner O, Römer-Oberdörfer A, Köllner B, Manvell RJ, Alexander DJ (1999) Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. *Avian Pathol* 28:79–88
 49. Alexander DJ, Senne DA (2008) Newcastle disease. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds) Diseases of poultry, 12th edn. Blackwell Publishing, Ames, pp 75–100
 50. Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, Peeters BP, Brown CC (2006) The effect on pathogenesis of Newcastle disease virus LaSota

- strain from a mutation of the fusion cleavage site to a virulent sequence. *Avian Dis* 50:483–488
51. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BBH, Wolinsky S, Bhattacharya T (2000) Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288:1789–1796
 52. Zlateva KT, Lemey P, Moes E, Vandamme AM, Van Ranst M (2005) Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol* 79:9157–9167
 53. Allain JP, Dong Y, Vandamme AM, 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. *J Virol* 74:2541–2549
 54. Macpherson LW (1956) Some observations on the epizootiology of New Castle Disease. *Can J Comp Med Vet Sci* 20:155–168
 55. Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL (2009) Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect Genet Evol* 10:26–35
 56. Nakamura K, Ohtsu N, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M, Imai K (2008) Pathologic and immunohistochemical studies of Newcastle disease (ND) in broiler chickens vaccinated with ND: severe nonpurulent encephalitis and necrotizing pancreatitis. *Vet Pathol* 45:928–933
 57. Wan H, Chen L, Wu L, Liu X (2004) Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection. *Avian Pathol* 33:216–221

Hepatitis C virus genetic variability and evolution

Natalia Echeverría, Gonzalo Moratorio, Juan Cristina, Pilar Moreno

Natalia Echeverría, Gonzalo Moratorio, Juan Cristina, Pilar Moreno, Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay

Gonzalo Moratorio, Viral Populations and Pathogenesis Laboratory, Institut Pasteur, 75724 Paris CEDEX 15, France

Pilar Moreno, Recombinant Proteins Unit, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay

Author contributions: Echeverría N contributed to bibliographical revision, figures and table design and article drafting; Moratorio G made contributions to bibliographical revision, table design, article drafting and revision; Cristina J contributed to article drafting and critically revised the manuscript for intellectual content; Moreno P made substantial contributions to conception and design, article drafting and revision of intellectual content; all authors contributed to final approval of the version to be published.

Supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) through project FMV_2_2011_1_6971 and PEDECIBA, Uruguay.

Conflict-of-interest: The authors do not have any conflict of interest.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Correspondence to: Pilar Moreno, PhD, Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Mataojo 2055, 11400 Montevideo, Uruguay. pmoreno@cin.edu.uy

Telephone: +598-2-5250800

Fax: +598-2-5250895

Received: August 13, 2014

Peer-review started: August 14, 2014

First decision: September 16, 2014

Revised: January 29, 2015

Accepted: February 9, 2015

Article in press: February 11, 2015

Published online: April 28, 2015

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) has infected over 170 million people worldwide and creates a huge disease burden due to chronic, progressive liver disease. HCV is a single-stranded, positive sense, RNA virus, member of the *Flaviviridae* family. The high error rate of RNA-dependent RNA polymerase and the pressure exerted by the host immune system, has driven the evolution of HCV into 7 different genotypes and more than 67 subtypes. HCV evolves by means of different mechanisms of genetic variation. On the one hand, its high mutation rates generate the production of a large number of different but closely related viral variants during infection, usually referred to as a quasispecies. The great quasispecies variability of HCV has also therapeutic implications since the continuous generation and selection of resistant or fitter variants within the quasispecies spectrum might allow viruses to escape control by antiviral drugs. On the other hand HCV exploits recombination to ensure its survival. This enormous viral diversity together with some host factors has made it difficult to control viral dispersal. Current treatment options involve pegylated interferon- α and ribavirin as dual therapy or in combination with a direct-acting antiviral drug, depending on the country. Despite all the efforts put into antiviral therapy studies, eradication of the virus or the development of a preventive vaccine has been unsuccessful so far. This review focuses on current available data reported to date on the genetic mechanisms driving the molecular evolution of HCV populations and its relation with the antiviral therapies designed to control HCV infection.

Key words: Recombination; Quasispecies; Hepatitis C virus; RNA; Evolution; Antiviral therapy

© **The Author(s) 2015.** Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Hepatitis C virus (HCV) is the major causative agent of parenterally-acquired hepatitis. To date there is

no preventive vaccine, and though antiviral therapy has been improved in the past few years, not all patients eradicate the virus as a result of it. The main reason lies in the intrinsic genetic variability that characterises RNA viruses, such as HCV, whose RNA polymerase lacks proof-reading activity, leading to a high mutation rate and the generation of a wide range of genome variants better known as a quasispecies. Therefore this review summarises current data on HCV quasispecies dynamics, antiviral therapy and recombination events.

Echeverría N, Moratorio G, Cristina J, Moreno P. Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J Hepatol* 2015; 7(6): 831-845 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v7/i6/831.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v7.i6.831>

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) has infected over 170 million people worldwide and therefore creates a huge disease burden due to chronic, progressive liver disease^[1]. Infections with HCV have become a major cause of liver cancer and one of the most common indications for liver transplantation^[2-4]. The fact that chronic infection with HCV can lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma creates the need to develop drugs that effectively eradicate the infection^[5] and a prophylactic vaccine that prevents its dissemination. Unfortunately, to date there is no effective vaccine available^[6]. Currently, the standard of care (SOC) therapy involves pegylated interferon α (INF- α -peg) and ribavirin (RBV)^[7]. In addition, the new SOC (NSOC) therapy of protease inhibitors boceprevir or telaprevir in combination with INF- α -peg and RBV have been approved for the eradication of HCV genotype 1 in the United States, Europe and Japan^[8-11]. Unfortunately, interferon is not widely available globally, not always well tolerated and some genotypes of HCV respond better than others causing that not all patients achieve a sustained virological response (SVR)^[12]. Other adverse events such as rash have also been associated with the NSOC^[13].

The main route of transmission is direct or indirect exposure to contaminated blood, either through blood transfusions or blood products, through the consumption of intravenous drugs, use of surgical material poorly sterilized, organ transplants, accidents in health centres, vertical transmission from mother to child, *etc.*^[12].

HCV is a member of the family *Flaviviridae*, although it differs from other members of this family in many details of its genome organization^[1]. HCV is a single-stranded, positive sense, RNA virus with a genome of approximately 9600 nucleotides in length. Most of the genome carries a single open reading frame that encodes three structural (core, E1, E2) and seven non-structural (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) proteins (Figure 1)^[14,15]. In addition, alternative

translation products (F protein) have been detected from a reading frame overlapping the core gene (core + 1/ARFP)^[16,17]. Possible roles in regulation of gene expression, cell signalling and apoptosis have been suggested^[18-20]. Short untranslated regions at each end of the genome (5'-NCR and 3'-NCR) are required for its translation and replication^[21,22]. The mechanism of translation initiation is dependent on an internal ribosomal entry site in the 5'-NCR, which interacts directly with the 40S ribosomal subunit^[23].

The high error rate of RNA-dependent RNA polymerase and the pressure exerted by the host immune system, has driven the evolution of HCV towards the development of a global diversity that revealed the existence of seven genetic lineages (genotypes 1 to 7) (Figure 2)^[24]. On average, the complete genome differs in 31%-33% of nucleotide sites^[4]. Genotypes 1 to 6 of HCV contain a series of more closely related sub-types (67 accepted subtypes and many more to be confirmed) that typically differ from each other by at least 15% in nucleotide positions within the coding region^[24]. Subtypes 1a, 1b and 3a are widely distributed and account for the vast majority of infections in Western countries^[1].

HCV genetic variability is not evenly distributed across the viral genome. The regions of the genome that correspond to essential viral functions (such as those involved in translation and replication) or those with major structural domains (5'-NCR and 3'-NCR) are the most conserved. The 5'-NCR region is the most conserved region of the genome with 90% sequence identity between distant strains^[25,26]. The region encoding the viral capsid is also highly conserved with 81%-88% sequence identity between different isolates. The most variable region of the genome is the one that codes for the membrane glycoproteins E1 and E2^[27]. The sequences belonging to the hypervariable regions 1 and 2 (*HVR1* and *HVR2*) of E2 gene are the ones that show less sequence homology with only 50% identity between different isolates^[28]. Factors that may contribute to high genetic variability of these viruses include large population sizes, short generation times and high replication rates^[29].

An important breakthrough in the treatment of chronic HCV infection was undoubtedly the introduction of alpha interferon (IFN- α) plus RBV as combination therapy^[27]. However, the rate of sustained virological response is still unsatisfactory^[30,31], particularly in patients infected with genotype 1^[32], the most prevalent in many geographic regions of the world^[4,33]. Although IFN- α is effective in reducing the viral load, complete eradication of the virus is achieved in less than 20% of patients treated with IFN- α alone^[32]. In those patients who initially respond to IFN- α , ribavirin helps increasing the frequency of virus eradication, yet its effect on non-responder patients is still limited^[7]. Although viral genotype and viral load, as well as serum HCV RNA clearance during therapy are definitely related to response, further insight into viral factors involved in

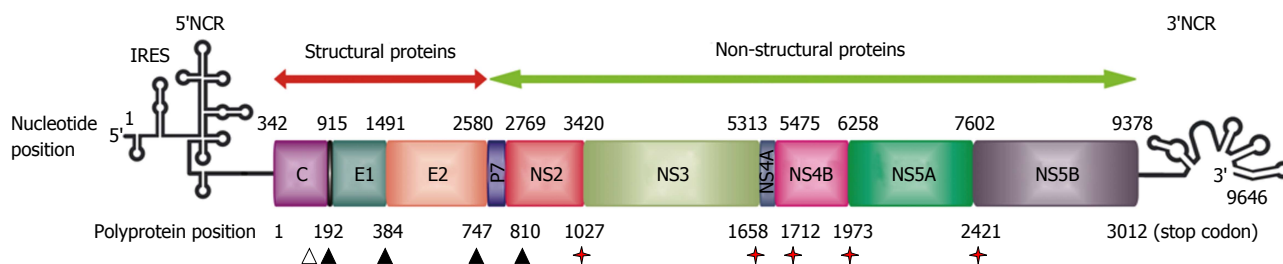


Figure 1 Organisation of hepatitis C virus genome and hepatitis C virus polyprotein processing. Schematic representation of the 9.6 kb positive-stranded RNA genome. Simplified RNA secondary structures in the 5' and 3' non-coding regions (NCRs) are shown. Internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation produces a polyprotein precursor that is processed into the mature structural and non-structural proteins. Nucleotide positions are shown by numbers on the upper part of the scheme. Amino acid positions are shown by numbers in the lower part of the scheme. The coding region is depicted by rectangles showing the corresponding encoded proteins. Solid arrowheads denote cleavages by the endoplasmic reticulum signal peptidase. The open arrowhead indicates further C-terminal processing of the core protein by signal peptide peptidase. Red stars indicate cleavages by the hepatitis C virus NS2 and NS3-4A proteases.

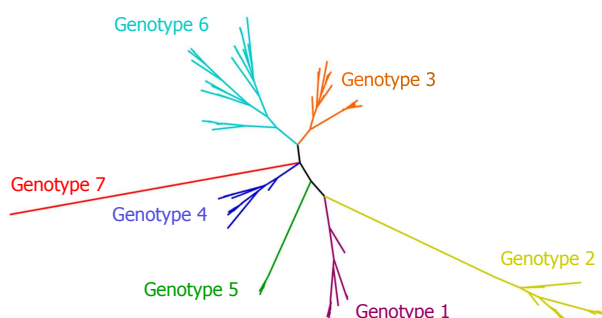


Figure 2 Evolutionary tree of the seven genotypes and all known subtypes of hepatitis C virus. The tree was constructed using the maximum likelihood method using GTR + I + G (general time-reversible substitution model considering invariable sites and gamma distribution) as the nucleotide substitution model that best fitted the data using a 307-nucleotide sequence from the NS5B-coding region. Sequences used for the construction of this phylogenetic tree were extracted from Yusim *et al.*^[165]

therapeutic responsiveness is still necessary^[27]. The different genotypes and subtypes vary in their responses to treatment with INF- α or INF- α /RBV. As mentioned above, only 10%-20% of individuals chronically infected with HCV genotype 1 treated with INF- α monotherapy and 40%-50% of those treated with combination therapy (INF- α /RBV) exhibit a complete and permanent disappearance of the virus. These percentages are lower than rates of 50 and 70%-80%, respectively, observed in the treatment of patients infected with HCV genotypes 2 or 3^[3,34]. Despite these facts, the use of INF- α -peg has been associated with a significant increase in these rates^[35].

Two inhibitors of the NS3/4A serine protease, boceprevir (BOC) and telaprevir (TVR) have demonstrated potent inhibition of HCV genotype 1 replication and markedly improved SVR rates in treatment-naïve and treatment-experienced patients^[36]. Nowadays the NSOC therapy for genotype 1, chronic HCV infection is the use of BOC or TVR in combination with INF- α -peg and RBV^[37-40]. Additionally, two other direct antiviral drugs (DAAs), simeprevir (protease-inhibitor)^[41] and sofosbuvir (nucleotide analogue of the NS5B RNA-polymerase)^[42] have been recently approved for triple therapy in the United States and Europe. Despite these

new advances in what respects to triple therapy, it is worth to note that a wide range of different DAAs are currently under clinical trials aiming at all-oral IFN-free regimens^[43-47].

MUTATIONS AND QUASISPECIES DYNAMICS

HCV evolution is a highly dynamic process^[48]. Like most RNA viruses, HCV exploits all possible mechanisms of genetic variation to ensure its survival. Mutation at the nucleotide level seems to be the main cause of genetic variation in RNA viruses, such as HCV. These mutations are primarily generated by an error-prone, non-proofreading RNA-dependent RNA-polymerase which directs the replication of the virus genetic material^[1,49]. The mutation rate of HCV, estimated at 10^{-4} substitutions per site and round of replication^[50], is among the highest for RNA viruses including retroviruses^[51], and would seem to be high enough to generate all the genetic variation found in this virus. Due to this feature and to the high replication rate of HCV, a large number of different but closely related viral variants are continuously produced during infection. These circulate *in vivo* as a complex population commonly referred to as a quasispecies^[52-58].

The idea of quasispecies was first used by Eigen *et al.*^[59,60] to refer to the first self-replicating structures. Originally conceived as a mathematical framework formulated to explain the evolution of life in the "pre-cellular RNA world"^[61], quasispecies theory is based on classical population genetics, but seeks to explore the consequences of error-prone replication and near-infinite population sizes for genome evolution. More recently, quasispecies theory has been used to describe the evolutionary dynamics of RNA viruses^[62]. These structured populations also possess a high mutation rate which would lead to the existence of a complex mixture of different but related genomes that would behave as a selection unit (Figure 3). At a particular point of infection, the HCV quasispecies viral distribution reflects the balance between the continued generation of new variants, the need to preserve essential viral functions and the positive selective

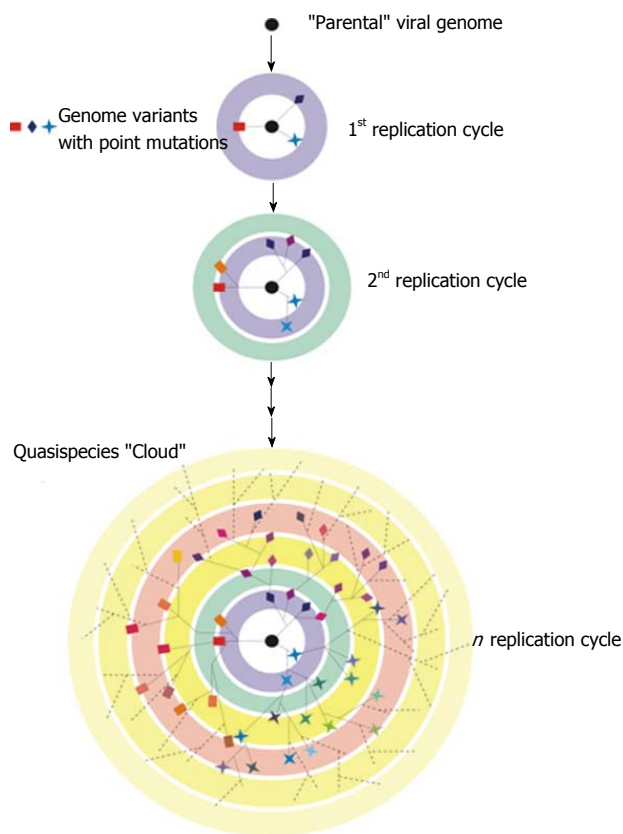


Figure 3 Viral quasispecies. A virus replicating with a high mutation rate will generate a diverse mutant repertoire over the course of a few generations. In this schematic representation, a “parental” viral genome (black filled circle) gives rise to different variants (coloured squares, prisms and stars), each linked to another one by a point mutation. The concentric circles represent replication cycles. The resulting distribution is often referred to as quasispecies “Cloud”.

pressure exerted by the environment^[63]. It is important to highlight that multiple viral quasispecies co-exist in infected individuals at different replicative sites and in consecutive times, which offers a rich environment for intra and inter quasispecies interactions.

The theory of quasispecies predicts that a particular mutant surrounded by a more favourable mutant spectrum (more related) can dominate another one with better fitness. This phenomenon has been called suppressive effect. This suppressive or interfering effect of the mutant spectrum rises along with the mutation rates in viral quasispecies, as has been suggested by the strong suppressive effect in infectivity that viral populations have near to extinction^[64]. It has been proposed that interference generated by defective genomes contributes to viral extinction due to an increased mutagenesis rate. We can also see the opposite effect: genome complementation between different components of the mutant spectrum, which demonstrates that the behaviour of quasispecies cannot be understood solely as the sum of individual behaviours^[65]. Because of this, quasispecies is defined as a dynamic distribution of genomes subject to variation, competition and selection, and that act as a selection unit. This means that the quasispecies as a whole, instead of a particular viral variant, is the target of

the selection process^[62,64,66].

As mentioned before, low fitness variants can be preserved at higher than expected frequencies just because they are coupled to a well represented higher fitness genotype in sequence space. One of the defining characteristics of a quasispecies is the phenomenon of mutational coupling, as it places individual mutants within a functional network of variants^[62]. The elevated mutation rates in RNA viruses mean that a fast replicator will generate genetically diverse progeny, many of which will be significantly less fit than the parent. As a result, quasispecies theory predicts that slower replicators will be favoured if they give rise to a fitter progeny^[67].

One of the consequences of quasispecies dynamics is the existence of a threshold error to the preservation of genetic information^[64]. When the error rate exceeds a tolerable limit (related to genome size, fitness and population size of the quasispecies) distribution collapses and the nucleotide sequence loses its information. This transition is known as the entrance to catastrophic error and its application to viral extinction through mutagenesis is called lethal mutagenesis^[64]. There are experimental evidences that show that RNA viruses replicate very closely to this threshold error and that an increase in mutation rates can have a negative impact on the viability of viral populations.

The theory of evolution predicts that, in a dynamic environment, high mutation rates are favoured, and therefore viral error rates may have been optimized by natural selection^[68,69]. For RNA viruses, low replicative fidelity generates a diverse population of variants. Even though many of these variants are generally less fit, they may take over if an unexpected change in environment occurs, such as immune pressure, shifting the corresponding fitness landscape. On the contrary, a homogeneous population, generated by high replicative fidelity, would lack this flexibility and might be less successful in the dynamic host environment. Experimental support for this hypothesis has been provided by two different groups^[70,71]. They isolated a poliovirus variant, resistant to ribavirin, which had a single amino acid substitution in the viral polymerase. This mutant exhibited a moderate resistance to lethal mutagenesis and assays for selectable markers indicated that this population had a lower mutation rate and it consequently displayed less genetic diversity. More recently, Vignuzzi *et al.*^[72] (2008) proposed that this attenuated high fidelity variant could be employed for vaccine development.

High mutation rates and quasispecies dynamics confer great adaptability to RNA viruses and represent one of the major obstacles for the control and prevention of RNA viral diseases^[15,73]. The great quasispecies variability of HCV has also therapeutic implications since, by means of generating and selecting fitter variants within the quasispecies cloud, viruses might escape control by antiviral drugs^[74]. The way HCV quasispecies evolves is highly dynamic, and for this reason, the complexity of the genetic information gathered from quasispecies populations cannot be accurately analysed

by a unique analytical tool^[75]. The three parameters most commonly used to determine the complexity of the quasispecies mutant spectrum are: mutation frequency (defined as the proportion of mutated nucleotides within a genome distribution relative to the consensus sequence), Shannon entropy (defined as the proportion of different genomes within a mutant distribution) and Hamming distance (defined as the number of mutations that differentiate two sequences within the mutant spectrum)^[27,64]. The average of all the comparisons between possible pairs reflects the genetic complexity of quasispecies^[62]. As stated previously, a fundamental feature of viral quasispecies, predicted from quasispecies theory, is that the target of selection is the mutant distribution as a whole rather than an individual genome. Selective transmission of predominant and minor HCV quasispecies has been shown in humans^[76-80] and in experimentally infected chimpanzees^[81,82]. Further understanding of quasispecies dynamics in infected individuals is necessary to gain knowledge on how to apply virus-specific drugs and to identify key parameters that are critical for the development of effective antiviral strategies^[55]. The genetic variability within quasispecies level has been frequently used as a predictor of the response to antiviral therapy^[83]. Several studies have reported that genetic diversity within different regions of HCV genome before combined therapy with INF/RBV was higher in non-responders than in responders^[53,83-86]. Nevertheless, Cristina *et al.*^[15] (2007) showed that the response to antiviral therapy is independent from genetic variability within quasispecies populations at the beginning of therapy. Ueda *et al.*^[86] (2004) reported that during combined therapy with INF/RBV, HCV quasispecies significantly decreased in non-responders. However, another study showed that populations fluctuate along therapy, in treated patients that achieved a sustained virological response as well as in those non-responders. This would indicate that these fluctuations are intrinsic to each patient and that HCV follows different evolution paths in different patients^[15]. The variations in the results obtained by the different research groups might be caused by different methodological approaches used to study the real variability within circulating quasispecies populations^[87]. Another explanation to this might be that in viral populations with a high degree of genetic variability, the probability of finding variants that would replicate effectively in the presence of antiviral drugs is high. Despite this, those populations with lower variability degree might also present these types of resistant variants, though in lower probability. Likewise, given the stochastic nature of this phenomenon, the opposite situation might as well occur in these two same cases^[88]. These correlations can probably mask the expected one between genetic variability and response to treatment, thus providing no conclusive results on these matters.

In addition to the multiplicity of viral genetic factors reported so far, host factors have also shown to be involved in the development of HCV infection. Since 2009, several single nucleotide polymorphisms (SNP)

have been reported near the interleukin 28B gene (*IL-28B*) that influence response to dual antiviral therapy^[89-94]. However, it was not until 2011 that the relationship between HCV quasispecies diversity and the host *IL-28B* genotype was investigated^[95]. Their results evidenced a clear association between *IL-28B* risk allele (SNP rs8099917 - G allele) and a lower NS3 protease amino acid quasispecies diversity in infected patients, hence suggesting that *IL-28B* risk allele carriers exert less positive selection pressure on the NS3/4 protease^[95]. However, it would be interesting to address whether the lower amino acid quasispecies diversification in patients with an *IL-28B* risk allele is restricted to the NS3 coding region or if it affects other viral genomic regions. Interestingly, also unfavourable rs8099917 genotypes were found linked to time-dependent changes in the core coding region, specifically the shift to residue 70Q associated with hepatocellular carcinoma^[96]. These results might indicate that the *IL-28B* genotype influences viral evolution and disease outcome in addition to the behaviour of the innate immune system. More recently, Yuan *et al.*^[94] (2012) found that, despite exhibiting similar baseline viral loads, more chronically-infected patients with the rs12979860-CC polymorphism had amino acid substitutions in NS5A compared to non-CC patients. This result suggests that patients with the CC genotype undergo early viral evolution probably as a consequence of the selective pressure exerted by the use of interferon at the beginning of treatment. These studies raise the question of whether host genetics shapes viral evolution in response to immunity, and if the differences observed in the evolution of HCV quasispecies are implicated in the mechanism by which the *IL-28B* genotype influences the outcome of acute HCV infection and treatment response^[97].

As previously mentioned, RNA virus populations exist as a cloud of sequence variants (continuously being generated by mutation) strongly related, therefore a better understanding of these populations within infected individuals is needed in order to apply antiviral strategies and to define critical parameters to the development of new and more effective antiviral therapies^[62]. Nevertheless, to date, our ability to know in depth the quasispecies cloud from the study of isolated clones is limited. The recent techniques of deep sequencing allow us, for the first time to overcome these obstacles and observe quasispecies as a whole. These techniques are already being used on clinical samples to study different viral models^[98-100].

NEXT GENERATION SEQUENCING IN HCV QUASISPECIES ANALYSIS

Since 2005, the development of high throughput, or so-called next generation sequencing technologies (NGS), has allowed a huge increase in capacity to sequence genomes at a reasonably low cost and in a short time frame^[101]. NGS comprises a set of high-throughput

Table 1 Representative next generation sequencing platforms and their characteristics

Platform	Run time (h)	Read length (bp)	Throughput per run (Mb)	Typical errors	Main biological applications	Company URL
Roche 454 FLX +	23	700, up to 1000	700	Insertions/deletions (indels) at homopolymer regions	Microbial genome sequencing, human genome sequencing, transcriptomics, metagenomics	http://www.my454.com/
Illumina HiSeq 1000 MySeq	8	2 × 100	400000	Indels, especially end of reads	Microbial genome sequencing, human genome sequencing, transcriptomics, metagenomics	http://www.illumina.com/systems/illumina
2000 V3	10	2 × 150	< 600000	End of read substitution errors	Microbial genome sequencing, human genome sequencing, transcriptomics, metagenomics	http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html
SOLID 4	12	50 × 35	71000	Indels at homopolymer regions	Microbial genome sequencing, human genome sequencing, transcriptomics, metagenomics	http://www.iontorrent.com/
Ion torrent PGM 318 Chip	3	200	1000	Random indel errors	Full-length transcriptomics, discovering large structural variants and haplotypes	http://www.pacificbiosciences.com/
Pacific Biosciences						

sequencing technologies, which make it possible to sequence several genomes from individual templates in a parallel fashion^[102]. The current NGS technologies are known as second generation technologies (Table 1), to distinguish them from the first generation (Sanger sequencing), and the third generation (based on single molecule sequencing)^[103].

As it is mentioned before, RNA viruses have very high mutation frequencies. The error rate of viral RNA-dependent RNA polymerases is estimated to be between 10⁻³ and 10⁻⁶ per nucleotide copied compared to 10⁻⁸-10⁻¹¹ for DNA polymerases^[72]. Consequently, an RNA virus population consists not of a single genotype but of an ensemble of closely related genotypes, termed as a quasispecies, centred on a master sequence. This genetic diversity creates a cloud of potentially beneficial mutations, which is thought to allow rapid adaptation to a constantly changing environment^[52]. Quasispecies theory makes a number of predictions about the behaviour of viral populations and the consequences of altering diversity.

NGS technologies have redefined the modus operandi in virus genetics research, allowing the unprecedented generation of very large sequencing datasets on a short time scale and at affordable costs^[101]. A significant technical challenge to address how we can measure viral diversity could be NGS technology. Ultra-deep sequencing has the sensitivity and quantitative nature required for this kind of investigations into viral genetic drift, natural selection and response to antiviral drugs. The analysis of viral quasispecies has been greatly enhanced by the recent emergence of these powerful technologies that allow the simultaneous sequencing of 400000-10000000 individual target sequences^[104].

As previously reported, drug-resistant variants may already exist previous to a particular antiviral treatment embedded in a predominantly wild-type virus quasispecies population. Consequently, as they may be present at different low-level frequencies, this may lead to varying degrees of viral response and therefore the mutant genome will become enriched upon treatment with HCV inhibitors. Hence, determining the natural levels of low frequency resistant variants before starting a treatment might be relevant to better predict viral response to HCV inhibitors^[105].

The classic method for detecting these drug-resistant variants in infected patients is population-based DNA sequencing, in other words: bacterial cloning. This method provides a good idea of the major sequences present, but unfortunately it cannot detect minor variants that are present at a frequency below 20%-25%^[106]. With the development of deep sequencing technologies, detection of drug-resistant variants became more sensitive allowing the identification of variants present at very low frequencies (about 0.1%-1%)^[107-109]. For HCV, the deep sequencing method was first used to detect emergence of NS3 mutants. This way it was clearly demonstrated that *de novo* telaprevir-resistant NS3 mutants arose in mice injected with wild-type HCV only 2 wk after the beginning of treatment^[108]. Deep sequencing was also used to confirm results of naturally occurring drug-resistant HCV mutants detected by a novel mismatch amplification mutation assay polymerase chain reaction^[107].

As can be noted, deep sequencing technology provided a comprehensive view of the viral population dynamics during monotherapy with NS3 protease inhibitors. It allowed the estimation of pre-treatment levels of NS3 drug resistant mutants, suggesting therefore a limitation of HCV viral suppression with NS3 protease inhibitor monotherapy caused by the pre-existence of drug resistant mutants. This finding strongly evidences the need for a combined therapy to durably treat HCV infection^[105].

In addition, NGS technology has already been implemented in order to study the transmission event of HCV among injection drug users. In this case NGS was used to determine intra-host viral genetic variation by deep sequencing the HCV hypervariable region, which allowed a detailed analysis of the structure of the viral quasispecies in the patients' population under study^[110].

NGS approaches are powerful methods that allow a rather comprehensive analysis of the intra-host viral genetic variation^[107]. Moreover, these technologies are becoming rapidly accessible all around the world which will likely revolutionise the field of molecular epidemiology^[110].

It is worth mentioning that these technologies offer, as already discussed, several advantages over conventional methods, such as consensus sequencing, bacterial cloning, and endpoint limiting dilution^[107]. Furthermore, as the development of a variety of software and algorithms capable of handling the massive amount of data generated by NGS platforms is increasing in parallel with the advances in these technologies, it will likely expedite the implementation of such approaches in a variety of settings in the near future^[110]. Taking this into consideration, the use of NGS in HCV outbreak investigations will presumably improve molecular epidemiology studies as well as provide a vast amount of information that will need to be handled appropriately both for the benefit of infected patients and the management of public health systems.

RECOMBINATION

In addition to mutations, it is widely accepted that recombination plays an important role in the evolution of RNA viruses by creating genetic variation through the exchange of nucleotide sequences between different genomic RNA molecules^[111]. Therefore it is considered as a key mechanism for the production of new genomes with selective growth advantage^[112]. Homologous recombination occurs, in some cases of RNA virus recombination, when the donor sequence neatly replaces a homologous region of the acceptor sequence leaving its structure unchanged. In these cases, not only the parental RNAs are homologous, but also crossovers occur at homologous sites^[112,113]. Nevertheless, hybrid sequences may originate as a result of aberrant homologous recombination (when similar viruses exchange sequence without maintaining strict alignment) and non-homologous recombination (recombination between unrelated RNA sequences)^[112,113]. RNA recombination involves replication of genomic RNA as a necessary component of the process. If in the middle of the replication process, the viral RNA-dependent RNA polymerase complex switches from one RNA parental strand to another, hybrid complementary RNA strands will be formed. Yet, if the replicase continues to copy the new strand at the same site where it left the parental one, this constitutes a homologous recombination event. On the

other hand, aberrant or non-homologous recombination will occur if the copying process is not as precise^[112]. This template strand exchange mechanism of recombination is known as "copy choice". The exact mechanism of exchange of strand is not known, but could be promoted by the pause of the polymerase during chain elongation. Thus far, nearly all studies on the mechanisms of recombination in RNA viruses support a copy-choice model, originally proposed for poliovirus^[114]. It is of note, that this template-switching mechanism greatly differs from the enzyme-driven breakage-rejoining mechanism of homologous recombination in DNA, mainly because it resorts to replication as an essential step of the process^[112].

Recombination in RNA virus was first discovered in poliovirus infected cells in which the frequent recovery of poliovirus that results from recombination has the potential to produce "escape mutants" in nature as well as in experiments^[115]. Subsequently, recombination was found to occur in other RNA viruses positive and negative-stranded and more recently, recombination between unrelated groups of RNA and DNA viruses was discovered in a novel virus genome isolated from an extreme environment^[116]. The presence of recombination in several members of the family *Flaviviridae* such as Pestivirus, Flavivirus and Hepacivirus has been demonstrated^[117-122].

Regarding HCV, recombination has been reported both inter and intragenotypic in populations in different geographic locations (Table 2). Some earlier reports described some HCV strains from Honduras in which the study of partial sequences from different regions of the viral genome resulted in HCV discordant genotype, providing first evidence for the possible existence of HCV recombination^[123]. However it was not until 2002 that the first convincing report of an intergenotypic HCV recombinant strain was published by Kalinina *et al.*^[124] (2002) in Saint Petersburg (Russia)^[49,124]. These authors described six different natural HCV strains that belonged to different subtypes, 2k and 1b. They found that the 5' untranslated region and the core coding region belonged to subtype 2k, whereas the NS5B region corresponded to subtype 1b^[124]. Sequencing the E2-p7-NS2 region, they were able to map the crossover point within the NS2 region, estimating it most likely between positions 3175 and 3176 (according to the numbering system for strain pj6CF). The reported recombinant was cautiously designated RF1_2k/1b, in agreement with the nomenclature used for human immunodeficiency virus (HIV) recombinants^[124]. This same recombinant strain has since then been isolated in other countries, like Ireland^[125], Uzbekistan^[126], Cyprus^[127], France^[128] and Estonia^[129] which would suggest that, although its generation might not be favoured by natural selection, it would also not be selected against^[49]. Additionally, at least ten other different intergenotypic recombinant forms (RFs) of HCV have been described and are totally or partially characterised (Table 1). Within this group of recombinants, we can observe the presence of recombinant forms between genotypes 2 and 6

Table 2 Main features of intergenotype, intersubtype and intrapatient recombination in hepatitis C virus published cases

Strain	Genotype	Country	Recombination breakpoint(s)	Ref.
Intergenotype				
RF1_2k/1b	2k/1b	Russia, Ireland, Uzbekistan, Georgia, France, Cyprus, Estonia	NS2, positions 3175-3176	[124-129]
D3	2i/6p	Viet Nam	NS2/NS3 junction, between positions 3405 and 3464	[130]
SE-03-07-1689	RF3_2b/1b	Philippines	NS3, positions 3466-3467	[137]
HC10-0804	2b/1b	Japan	NS2/NS3 junction, positions 3443-3444	[135]
B5808, M2123, M4430, M4416, M4414, M4431, M2777, M8774	2b/1b	Japan	NS2, putative position 3301	[136]
R1	2/5	France	NS2/NS3 junction, between residues 3420 and 3440	[132]
D177	RF_2b/6w	Taiwan	NS2/NS3 junction, position 3429	[131,133]
	RF_3a/1b	Taiwan, China	Undetermined	
	RF_2a/1a	Taiwan	Undetermined	
JF779679	2b/1a	United States	NS2/NS3 junction, positions 3405-3416	[134]
Intersubtype	Subtypes			
PE22	RF2_1b/1a	Peru	NS5B, position 8321	[141]
H23	1b/1a	Uruguay	Core, at position 387	[111]
HC-J1	1a/1c	Japan	2 sites in E1-E2, at positions 1407 and 2050	[142]
Khajal	1a/1c	India	5 sites, from core to NS3, at positions 801 1261, 2181, 3041 and 3781	[143]
R49	4a/4d	Portugal	Undetermined	[140]
EU246930	6a/6o	Viet Nam	NS5B, between positions 8345-9073	[144]
EU246932	6e/6o	Viet Nam	NS5B, between positions 8358-8977	[144]
EU246937	6n/6o	Thailand	NS5B, between positions 8372-9033	[144]
EU246931	6e/6h	Viet Nam	NS5B, between positions 8356-9019	[144]
Intrapatient	Subtype			
	1b	Spain	NS5B, at residue 286	[145]
	1a, 1b, 3a	Spain	1 or 2 sites within E1-E2 or NS5A	[146]
	4a	Ireland	E2 glycoprotein, HVR1 region	[147]

Modified from ref. [49].

described in Vietnam^[130] and Taiwan^[131], between genotypes 2 and 5 described in France^[132], between genotypes 3 and 1 in Taiwan^[131] and China^[133], and between genotypes 2 and 1 reported in Japan, the United States and the Philippines^[134-137]. It is interesting to note that recombinant forms found so far have a wide geographic distribution. Besides, all HCV genotypes except for genotype 4 and 7 have been found in them. Other interesting feature is that all these recombinants but one (RF_3a/1b) originated by the combination of a 5'-end of genotype 2 and a 3'-end of a different genotype. The 3'-end of subtype 1b seems to be the only one appearing in more than one recombinant form^[49]. Oddly enough, genotype 2 is present in the majority of the recombinants found to date, which might suggest a critical role in order for the process to take place^[138] or even for the stability and functionality of the resulting recombinant genome. The fact that some recombinants involving genotype 2 and subtype 1b have been frequently found in older patients and in cases not usually related to the epidemic spread associated to a higher use of intravenous drugs, makes it difficult to assess whether this pattern derives from adaptive selection or is simply due to chance^[1,49]. As we can observe in Table 2, another characteristic feature of intergenotypic recombination in HCV seems to be that the crossover points appear to be located within

either gene *NS2* or *NS3*^[49]. An apparent hotspot has been identified between amino acids 1022 and 1042 (corresponding to the vicinity of the NS2/NS3 junction). Considering how short this region seems to be, and despite the existence of only a few reports inquiring into RNA secondary structures involved in the recombination process^[130,139], all seems to indicate that a copy choice mechanism might be responsible for the generation of these recombinant forms^[49].

With respects to intragenotypic recombination, nine recombinant forms have been described. As we mentioned before, each of the six major genotypes of HCV (except for genotype 7 for which there is only one complete-genome sequence available) can be subdivided into closely related sub-types that differ from each other by at least 15% in nucleotide sequences^[24]. Therefore, the same methodological procedures based on phylogenetic incongruence used to detect intergenotypic recombinants are also applicable to detect intragenotype/intersubtype RFs. Only one of the intragenotype recombinants described involved genotype 4^[140], four involved different subtypes of genotype 1 and the remaining four involved different subtypes of genotype 6. Examples of recombinants (1a/1b) have been identified in Peru as well as in Uruguay^[111,141] and (1a/1c) in Japan and in India^[142,143]. Interestingly, although the recombinants reported in

Uruguay and Peru are (1a/1b), their recombination breakpoints were found in different regions of the genome as shown in Table 2. The same happens in the case of the recombinant forms described in India and in Japan. Therefore, unlike what it is observed in intergenotype recombination, where all shared a common genome region in which recombination occurs, in this case these points are highly variable in their location. Only two of the intragenotype 1 RFs have been fully sequenced^[142,143] and both involve the same subtypes (1a and 1c). Interestingly, they revealed the existence of more than one cross-over point, resulting in mosaic recombinant forms. In addition, the sequences showed a very dissimilar size, exhibiting relatively short segments of one subtype embedded within a genome of the other subtype^[49]. The most recent description of intersubtype recombinant forms involves genotype 6, and these were identified thanks to full-genome sequence analysis^[144]. The remaining three cases of intersubtypic RFs reported have only been partially characterised at the genome level^[49]. One of the cases was detected by discordant phylogenetic analysis of the regions coding for E1 and NS5B isolated from an intravenous drug user from Portugal^[140]. This case should be considered as a putative example since no recombination breakpoint has been mapped for this RF. The two remaining cases are different as they have been described only by sequencing one single portion of the HCV genome. Contrary to what occurred with the other example, the corresponding breakpoints for these two were identified within the core and NS5B genes each^[111,141], genes that are relatively conserved and are therefore suitable for phylogenetic typing and subtyping of HCV isolates^[49].

When we talk about recombination in HCV we can not forget to mention the existence of intrapatient or also called intra quasispecies recombination. With respect to this matter, three reports have been published thus far. Two of them involve intrapatient recombination in individual patients undergoing therapy^[145,146]. The most recent one involves quasispecies evolution from a chronically infected, treatment naïve individual^[147]. In the first report of intra-quasispecies recombination, analysed sequences were obtained from the NS5A gene of HCV quasispecies populations from six patients being treated with IFN + RBV combined therapy^[145]. Only one recombinant strain was detected in all patient quasispecies populations studied and its recombination crossover point was found within the protein kinase R (PKR)-binding region of NS5A^[145]. This region has a particular importance since previous work by Enomoto *et al.*^[148] (1995) suggested that the genetic heterogeneity of the interferon sensitivity determining region domain of HCV NS5A (IFN sensitivity-determining region), linked to response to therapy in Japanese patients^[148]. Although there seems not to be a consensus on this issue^[85], the published information supports the hypothesis that an association indeed exists between NS5A and response to therapy^[149-151]. Some reports suggest that HCV NS5A

protein can act *in vivo* repressing PKR function, and presumably allowing HCV to escape the antiviral effects of interferon^[1,3,152,153]. Analysing NS5A protein sequences of both the recombinant and putative parental-like virus provided evidence in favour of the possibility that the recombinant isolate might have acquired amino acids already known for being present in HCV strains resistant to interferon treatment^[145]. The results of these studies support the fact that recombination cannot be denied as an evolutionary mechanism for generating diversity in HCV *in vivo* in patients undergoing antiviral therapy^[145]. In spite of this fact, recombination does not seem to play a major role in the evolution of HCV quasispecies populations; at least this is what can be extrapolated from the study of NS5A genes, since only one recombinant isolate was found among all HCV quasispecies populations studied. Contrary to this finding, Sentandreu *et al.*^[146] (2008) identified a high frequency of intra-patient recombination events (18.01% of the 111 analysed patients) analysing a large data set of HCV sequences (around 17700) from intra-patient viral population^[146]. They retrospectively studied NS5A and E1-E2 coding regions from samples isolated from two different sets of groups: HCV mono-infected patients, both naïve and non-responders to antiviral treatment; and HCV/HIV co-infected patients, both treatment-naïve and under HAART^[146]. These authors found recombination within the E1-E2 region (9.1%), and within the NS5A region (9.6%), with specific areas being proposed as the crossover points. Although no structural analyses were performed in this study, these results are consistent with the implication of RNA secondary structure in favouring the hotspots or zones where recombination can occur within the HCV genome^[49]. As per these results, where recombination intra-patient was found in 18% of the HCV infected patients studied, intra-quasispecies recombination events seem relatively frequent. Moreover, this might be an underestimation of the real frequency of HCV recombination due to the difficulty in detecting recombination events if they occur between genetically very similar variants as is the case of variants within a quasispecies^[49,146]. More recently, Palmer *et al.*^[147] (2012) detected putative intra-subtype recombinants, as well as the likely ancestral parental donors. By retrospective clonal analysis they explored quasispecies evolution evaluated at the HVR1 region from serum samples isolated from the same chronically infected, treatment naïve individual which were collected over 9.6 years^[147]. Their detailed analysis clearly documents the emergence, maintenance and final removal of HCV variants, which in this case has been demonstrated in a patient who did not undergo antiviral therapy highlighting the importance of HCV quasispecies dynamics even in absence of a clear selective pressure.

Even though the regions apparently involved in the crossover events seem to be different when comparing intergenotype vs intraquasispecies recombination, they seem to be quite conserved within each of the different categories. This might represent another indication

of the importance of RNA secondary structure for recombination events to take place and might as well hint at a possible factor determining their occurrence.

Having detected so many recombinant strains (Table 2) proves that HCV is capable of successfully completing all the steps leading to this event: simultaneous infection of the same cell by different viral strains, simultaneous replication of both viral genomes, strand shift by the viral RNA polymerase without disturbing the correct reading frame, and encapsidation and release of the recombinant genomes as viable viral particles^[49]. The resulting products will then be subjected to the same population processes governing the maintenance, growth or disappearance of new variants in a heterogeneous viral population^[49,146].

If we analyse in depth the recombination events, we can consider that recombination in HCV may be underestimated. Why? Three different factors might account for this: Firstly, in recombination events between subtype viral strains, there is a trade-off between the capability of homologous recombination event to occur, and the intra-patient viral diversity, since homologous recombination requires a minimum length of sequence identity. Secondly, another trade-off occurs between the intra-patient viral diversity and the discrimination power to detect recombination with the different methods available. Finally, despite recombination events between different genotypes/subtypes co-infecting the same patient are probably easier to detect, they are less likely to occur, since the strains of different subtypes differ more between them than between those from the same subtype; this would imply a lower probability of template switching and moreover, if a recombination event does indeed happen, it will likely generate recombinant sequences less viable than the parental ones. Some or even all these factors acting in concert might explain why the frequency of recombinant HCV sequences reported to date is so low^[49,111,124-137,140-147].

How relevant recombination for HCV long term evolution and its incidence in HCV infection is, has not been thoroughly investigated yet, but these findings support a potentially significant role for recombination by creating genetic variation through the reshuffling of independent variants^[146]. Recombination may serve two opposite purposes: simply to explore a new genomic combination or to rescue viable genomes from debilitated parental ones^[29,154]. Considering that recombination may influence vaccine development, virus control programs, patient management as well as antiviral therapies, it is clearly important to determine the extent to which this mechanism plays a role in HCV evolution^[111].

CONCLUSION

RNA viruses exist as complex mutant distributions commonly known as viral quasispecies. This is the result of high mutation rates due to the lack of proofreading activities in their RNA-dependent RNA polymerases^[87].

The evolution of the HCV quasispecies is a highly dynamic process that has therapeutic implications due to the continuous generation and selection of fitter variants within the quasispecies spectrum which might allow viruses to escape control by antiviral drugs and treatment^[15,74]. Further studies on HCV quasispecies is needed in order to develop appropriate strategies for effective antiviral control^[55]. HCV utilizes all known genetic mechanisms, including mutation and recombination. NGS technologies may represent an important improvement to identify key parameters in our understanding of HCV evolution in relation to current and new therapies against HCV.

REFERENCES

- 1 **Simmonds P.** Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 2004; **85**: 3173-3188 [PMID: 15483230 DOI: 10.1099/vir.0.80401-0]
- 2 **Hoofnagle JH.** Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; **36**: S21-S29 [PMID: 12407573 DOI: 10.1053/jhep.2002.36227]
- 3 **Pawlotsky JM.** The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis* 2003; **16**: 587-592 [PMID: 14624110 DOI: 10.1097/01.qco.0000104300.87920.03]
- 4 **Simmonds P,** Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; **42**: 962-973 [PMID: 16149085 DOI: 10.1002/hep.20819]
- 5 **Rosen HR,** Gretch DR. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Mol Med Today* 1999; **5**: 393-399 [PMID: 10462751]
- 6 **Keyvani H,** Fazlalipour M, Monavari SH, Mollaie HR. Hepatitis C virus--proteins, diagnosis, treatment and new approaches for vaccine development. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; **13**: 5931-5949 [PMID: 23464383]
- 7 **Hu KQ,** Vierling JM, Redeker AG. Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001; **8**: 1-18 [PMID: 11155147]
- 8 **Ghany MG,** Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; **49**: 1335-1374 [PMID: 19330875 DOI: 10.1002/hep.22759]
- 9 **Kanda T,** Imazeki F, Yokosuka O. New antiviral therapies for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2010; **4**: 548-561 [PMID: 21063477 DOI: 10.1007/s12072-010-9193-3]
- 10 **European Association for the Study of the Liver.** EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; **55**: 245-264 [PMID: 21371579 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.023]
- 11 **Editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines: The Japan Society of Hepatology.** Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection: First edition, May 2012, The Japan Society of Hepatology. *Hepatol Res* 2013; **43**: 1-34 [PMID: 23332085 DOI: 10.1111/hepr.12020]
- 12 Available from: URL: <http://www.who.int>
- 13 **Lawitz EJ.** Diagnosis and management of telaprevir-associated rash. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2011; **7**: 469-471 [PMID: 22298982]
- 14 **Bartenschlager R,** Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011; **19**: 95-103 [PMID: 21146993 DOI: 10.1016/j.tim.2010.11.005]
- 15 **Cristina J,** del Pilar Moreno M, Moratorio G. Hepatitis C virus genetic variability in patients undergoing antiviral therapy. *Virus Res* 2007; **127**: 185-194 [PMID: 17449128 DOI: 10.1016/

- j.virusres.2007.02.023]
- 16 **Varaklioti A**, Vassilaki N, Georgopoulou U, Mavromara P. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 2002; **277**: 17713-17721 [PMID: 11884417 DOI: 10.1074/jbc.M201722200]
 - 17 **Xu Z**, Choi J, Lu W, Ou JH. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* 2003; **77**: 1578-1583 [PMID: 12502871]
 - 18 **Ma HC**, Lin TW, Li H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H, Chuang YL, Ou JH, Lo SY. Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *J Biomed Sci* 2008; **15**: 417-425 [PMID: 18398700 DOI: 10.1007/s11373-008-9248-9]
 - 19 **Shao SW**, Wu WB, Bian ZQ, Yu JG, Zhao P, Zhao LJ, Zhu SY, Qi ZT. Hepatitis C virus F protein inhibits cell apoptosis by activation of intracellular NF-kappaB pathway. *Hepatol Res* 2009; **39**: 282-289 [PMID: 19054148 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2008.00452.x]
 - 20 **Wu WB**, Shao SW, Zhao LJ, Luan J, Cao J, Gao J, Zhu SY, Qi ZT. Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology* 2007; **50**: 341-346 [PMID: 17700029 DOI: 10.1159/000107271]
 - 21 **Friebe P**, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002; **76**: 5326-5338 [PMID: 11991961]
 - 22 **Kieft JS**, Zhou K, Jubin R, Doudna JA. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 2001; **7**: 194-206 [PMID: 11233977]
 - 23 **Pestova TV**, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 1998; **12**: 67-83 [PMID: 9420332]
 - 24 **Smith DB**, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014; **59**: 318-327 [PMID: 24115039 DOI: 10.1002/hep.26744]
 - 25 **Bukh J**, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4942-4946 [PMID: 1317578]
 - 26 **Piñeiro D**, Martinez-Salas E. RNA structural elements of hepatitis C virus controlling viral RNA translation and the implications for viral pathogenesis. *Viruses* 2012; **4**: 2233-2250 [PMID: 23202462 DOI: 10.3390/v4102233]
 - 27 **Argentini C**, Genovese D, Dettori S, Rapicetta M. HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification. *Future Microbiol* 2009; **4**: 359-373 [PMID: 19327119 DOI: 10.2217/fmb.09.8]
 - 28 **Le Guillou-Guillemette H**, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel-Fabiani F. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 2416-2426 [PMID: 17552024]
 - 29 **Domingo E**, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997; **51**: 151-178 [PMID: 9343347 DOI: 10.1146/annurev.micro.51.1.151]
 - 30 **Davis GL**, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1493-1499 [PMID: 9819447 DOI: 10.1056/NEJM199811193392102]
 - 31 **McHutchison JG**, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1485-1492 [PMID: 9819446 DOI: 10.1056/NEJM199811193392101]
 - 32 **Poynard T**, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT) *Lancet* 1998; **352**: 1426-1432 [PMID: 9807989]
 - 33 **Ogata N**, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3392-3396 [PMID: 1849654]
 - 34 **Zeuzem S**. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 2004; **140**: 370-381 [PMID: 14996679]
 - 35 **Fried MW**, Hadziyannis SJ. Treatment of chronic hepatitis C infection with peginterferons plus ribavirin. *Semin Liver Dis* 2004; **24** Suppl 2: 47-54 [PMID: 15346246 DOI: 10.1055/s-2004-832928]
 - 36 **Ghany MG**, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011; **54**: 1433-1444 [PMID: 21898493 DOI: 10.1002/hep.24641]
 - 37 **Bacon BR**, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1207-1217 [PMID: 21449784 DOI: 10.1056/NEJMoa1009482]
 - 38 **Jacobson IM**, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R, George J, Rizzetto M, Shouval D, Sola R, Terg RA, Yoshida EM, Adda N, Bengtsson L, Sankoh AJ, Kieffer TL, George S, Kauffman RS, Zeuzem S. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; **364**: 2405-2416 [PMID: 21696307 DOI: 10.1056/NEJMoa1012912]
 - 39 **Poordad F**, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki JP. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1195-1206 [PMID: 21449783 DOI: 10.1056/NEJMoa1010494]
 - 40 **Zeuzem S**, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, Younossi Z, Foster GR, Horban A, Ferenci P, Nevens F, Müllhaupt B, Pockros P, Terg R, Shouval D, van Hoek B, Weiland O, Van Heeswijk R, De Meyer S, Luo D, Boogaerts G, Polo R, Picchio G, Beumont M. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011; **364**: 2417-2428 [PMID: 21696308 DOI: 10.1056/NEJMoa1013086]
 - 41 **Rosenquist Å**, Samuelsson B, Johansson PO, Cummings MD, Lenz O, Raboisson P, Simmen K, Vendeville S, de Kock H, Nilsson M, Horvath A, Kalmeijer R, de la Rosa G, Beumont-Mauviel M. Discovery and development of simeprevir (TMC435), a HCV NS3/4A protease inhibitor. *J Med Chem* 2014; **57**: 1673-1693 [PMID: 24446688 DOI: 10.1021/jm401507s]
 - 42 **Sofia MJ**, Bao D, Chang W, Du J, Nagarathnam D, Rachakonda S, Reddy PG, Ross BS, Wang P, Zhang HR, Bansal S, Espiritu C, Keilman M, Lam AM, Steuer HM, Niu C, Otto MJ, Furman PA. Discovery of a β -d-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem* 2010; **53**: 7202-7218 [PMID: 20845908 DOI: 10.1021/jm100863x]
 - 43 **Everson GT**, Sims KD, Rodriguez-Torres M, Hézode C, Lawitz E, Bourlière M, Loustaud-Ratti V, Rustgi V, Schwartz H, Tatum H, Marcellin P, Pol S, Thuluvath PJ, Eley T, Wang X, Huang SP, McPhee F, Wind-Rotolo M, Chung E, Pasquinelli C, Grasela DM, Gardiner DF. Efficacy of an interferon- and ribavirin-free regimen of daclatasvir, asunaprevir, and BMS-791325 in treatment-naïve patients with HCV genotype 1 infection. *Gastroenterology* 2014; **146**: 420-429 [PMID: 24184132 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.057]
 - 44 **Fontana RJ**, Hughes EA, Bifano M, Appelman H, Dimitrova D, Hindes R, Symonds WT. Sofosbuvir and daclatasvir combination therapy in a liver transplant recipient with severe recurrent cholestatic hepatitis C. *Am J Transplant* 2013; **13**: 1601-1605

- [PMID: 23593993 DOI: 10.1111/ajt.12209]
- 45 **Jacobson IM**, Gordon SC, Kowdley KV, Yoshida EM, Rodriguez-Torres M, Sulkowski MS, Shiffman ML, Lawitz E, Everson G, Bennett M, Schiff E, Al-Assi MT, Subramanian GM, An D, Lin M, McNally J, Brainard D, Symonds WT, McHutchison JG, Patel K, Feld J, Pianko S, Nelson DR. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. *N Engl J Med* 2013; **368**: 1867-1877 [PMID: 23607593 DOI: 10.1056/NEJMoa1214854]
 - 46 **Lawitz E**, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, Schultz M, Davis MN, Kayali Z, Reddy KR, Jacobson IM, Kowdley KV, Nyberg L, Subramanian GM, Hyland RH, Arterburn S, Jiang D, McNally J, Brainard D, Symonds WT, McHutchison JG, Sheikh AM, Younossi Z, Gane EJ. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2013; **368**: 1878-1887 [PMID: 23607594 DOI: 10.1056/NEJMoa1214853]
 - 47 **Sulkowski MS**, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, Jacobson I, Lawitz E, Lok AS, Hineostroza F, Thuluvath PJ, Schwartz H, Nelson DR, Everson GT, Eley T, Wind-Rotolo M, Huang SP, Gao M, Hernandez D, McPhee F, Sherman D, Hindes R, Symonds W, Pasquinelli C, Grasela DM. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2014; **370**: 211-221 [PMID: 24428467 DOI: 10.1056/NEJMoa1306218]
 - 48 **Cristina J**. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus in the Latin American region. *J Clin Virol* 2005; **34** Suppl 2: S1-S7 [PMID: 16461234]
 - 49 **González-Candelas F**, López-Labrador FX, Bracho MA. Recombination in hepatitis C virus. *Viruses* 2011; **3**: 2006-2024 [PMID: 22069526 DOI: 10.3390/v3102006]
 - 50 **Bartenschlager R**, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; **81**: 1631-1648 [PMID: 10859368]
 - 51 **Kim T**, Mudry RA, Rexrode CA, Pathak VK. Retroviral mutation rates and A-to-G hypermutations during different stages of retroviral replication. *J Virol* 1996; **70**: 7594-7602 [PMID: 8892879]
 - 52 **Biebricher CK**, Eigen M. The error threshold. *Virus Res* 2005; **107**: 117-127 [PMID: 15649558 DOI: 10.1016/j.virusres.2004.11.002]
 - 53 **Chambers TJ**, Fan X, Droll DA, Hembrador E, Slater T, Nickells MW, Dustin LB, Dibisceglie AM. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; **79**: 3071-3083 [PMID: 15709027 DOI: 10.1128/JVI.79.5.3071-3083.2005]
 - 54 **Domingo E**, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martín-Hernández AM, Sáiz JC, Escarmis C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 1998; **4**: 521-527 [PMID: 9866728 DOI: 10.3201/eid0404.980402]
 - 55 **Domingo E**, Escarmis C, Lázaro E, Manrubia SC. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res* 2005; **107**: 129-139 [PMID: 15649559 DOI: 10.1016/j.virusres.2004.11.003]
 - 56 **Feliu A**, Gay E, García-Retortillo M, Saiz JC, Forns X. Evolution of hepatitis C virus quasispecies immediately following liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; **10**: 1131-1139 [PMID: 15350003 DOI: 10.1002/lt.20206]
 - 57 **Laskus T**, Wilkinson J, Gallegos-Orozco JF, Radkowski M, Adair DM, Nowicki M, Operskalski E, Buskell Z, Seeff LB, Vargas H, Rakela J. Analysis of hepatitis C virus quasispecies transmission and evolution in patients infected through blood transfusion. *Gastroenterology* 2004; **127**: 764-776 [PMID: 15362033]
 - 58 **Martell M**, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; **66**: 3225-3229 [PMID: 1313927]
 - 59 **Eigen M**, Gardiner W, Schuster P, Winkler-Oswatitsch R. The origin of genetic information. *Sci Am* 1981; **244**: 88-92, 96, et passim [PMID: 6164094]
 - 60 **Eigen M**, Schuster P. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften* 1977; **64**: 541-565 [PMID: 593400]
 - 61 **Eigen M**. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 1971; **58**: 465-523 [PMID: 4942363]
 - 62 **Domingo E**, Martin V, Perales C, Grande-Pérez A, García-Arriaza J, Arias A. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; **299**: 51-82 [PMID: 16568896]
 - 63 **Pellerin M**, Lopez-Aguirre Y, Penin F, Dhumeaux D, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus quasispecies variability modulates nonstructural protein 5A transcriptional activation, pointing to cellular compartmentalization of virus-host interactions. *J Virol* 2004; **78**: 4617-4627 [PMID: 15078944]
 - 64 **Domingo E**, Gomez J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res* 2007; **127**: 131-150 [PMID: 17349710 DOI: 10.1016/j.virusres.2007.02.001]
 - 65 **Martín V**, Domingo E. Influence of the mutant spectrum in viral evolution: focused selection of antigenic variants in a reconstructed viral quasispecies. *Mol Biol Evol* 2008; **25**: 1544-1554 [PMID: 18436553 DOI: 10.1093/molbev/msn099]
 - 66 **Vignuzzi M**, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 2006; **439**: 344-348 [PMID: 16327776 DOI: 10.1038/nature04388]
 - 67 **Wilke CO**. Quasispecies theory in the context of population genetics. *BMC Evol Biol* 2005; **5**: 44 [PMID: 16107214 DOI: 10.1186/1471-2148-5-44]
 - 68 **Elena SF**, Sanjuán R. Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences. *J Virol* 2005; **79**: 11555-11558 [PMID: 16140732 DOI: 10.1128/JVI.79.18.11555-11558.2005]
 - 69 **Holmes EC**. Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 543-546 [PMID: 14659685]
 - 70 **Arnold JJ**, Vignuzzi M, Stone JK, Andino R, Cameron CE. Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 2005; **280**: 25706-25716 [PMID: 15878882 DOI: 10.1074/jbc.M503444200]
 - 71 **Pfeiffer JK**, Kirkegaard K. Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J Virol* 2005; **79**: 2346-2355 [PMID: 15681435 DOI: 10.1128/JVI.79.4.2346-2355.2005]
 - 72 **Vignuzzi M**, Stone JK, Andino R. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res* 2005; **107**: 173-181 [PMID: 15649563 DOI: 10.1016/j.virusres.2004.11.007]
 - 73 **Fint SJEL**, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology. Third ed. Washington, DC, United States of America: ASM Press, 2009: 569
 - 74 **Pawlotsky JM**. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; **299**: 261-284 [PMID: 16568902]
 - 75 **Baccam P**, Thompson RJ, Fedrigo O, Carpenter S, Cornette JL. PAQ: Partition Analysis of Quasispecies. *Bioinformatics* 2001; **17**: 16-22 [PMID: 11222259]
 - 76 **Cody SH**, Nainan OV, Garfein RS, Meyers H, Bell BP, Shapiro CN, Meeks EL, Pitt H, Mouzin E, Alter MJ, Margolis HS, Vugia DJ. Hepatitis C virus transmission from an anesthesiologist to a patient. *Arch Intern Med* 2002; **162**: 345-350 [PMID: 11822928]
 - 77 **Gretch DR**, Polyak SJ, Wilson JJ, Carithers RL, Perkins JD, Corey L. Tracking hepatitis C virus quasispecies major and minor variants in symptomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J Virol* 1996; **70**: 7622-7631 [PMID: 8892882]
 - 78 **Lin HJ**, Seeff LB, Barbosa L, Hollinger FB. Occurrence of identical hypervariable region 1 sequences of hepatitis C virus in transfusion recipients and their respective blood donors: divergence over time. *Hepatology* 2001; **34**: 424-429 [PMID: 11481629 DOI: 10.1053/jhep.2001.26635]
 - 79 **Manzin A**, Solfrosi L, Debiaggi M, Zara F, Tanzi E, Romanò L, Zanetti AR, Clementi M. Dominant role of host selective pressure in driving hepatitis C virus evolution in perinatal infection. *J Virol* 2000; **74**: 4327-4334 [PMID: 10756048]

- 80 **Weiner AJ**, Thaler MM, Crawford K, Ching K, Kansopon J, Chien DY, Hall JE, Hu F, Houghton M. A unique, predominant hepatitis C virus variant found in an infant born to a mother with multiple variants. *J Virol* 1993; **67**: 4365-4368 [PMID: 8389933]
- 81 **Hijikata M**, Mizuno K, Rikihisa T, Shimizu YK, Iwamoto A, Nakajima N, Yoshikura H. Selective transmission of hepatitis C virus in vivo and in vitro. *Arch Virol* 1995; **140**: 1623-1628 [PMID: 7487493]
- 82 **Kojima M**, Osuga T, Tsuda F, Tanaka T, Okamoto H. Influence of antibodies to the hypervariable region of E2/NS1 glycoprotein on the selective replication of hepatitis C virus in chimpanzees. *Virology* 1994; **204**: 665-672 [PMID: 7941335 DOI: 10.1006/viro.1994.1582]
- 83 **Cuevas JM**, Torres-Puente M, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, Carnicer F, Olmo JD, Ortega E, González-Candelas F, Moya A. Combined therapy of interferon plus ribavirin promotes multiple adaptive solutions in hepatitis C virus. *J Med Virol* 2009; **81**: 650-656 [PMID: 19235859 DOI: 10.1002/jmv.21460]
- 84 **Cuevas JM**, Gonzalez M, Torres-Puente M, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, González-Candelas F, Moya A. The role of positive selection in hepatitis C virus. *Infect Genet Evol* 2009; **9**: 860-866 [PMID: 19463971 DOI: 10.1016/j.meegid.2009.05.007]
- 85 **Puig-Basagoiti F**, Fornis X, Furcié I, Ampurdanés S, Giménez-Barcons M, Franco S, Sánchez-Tapias JM, Saiz JC. Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and non-responder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gen Virol* 2005; **86**: 1067-1075 [PMID: 15784900 DOI: 10.1099/vir.0.80526-0]
- 86 **Ueda E**, Enomoto N, Sakamoto N, Hamano K, Sato C, Izumi N, Watanabe M. Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. *Hepatology* 2004; **29**: 89-96 [PMID: 15163430 DOI: 10.1016/j.hepres.2004.02.014]
- 87 **Ojosnegros S**, Agudo R, Sierra M, Briones C, Sierra S, González-López C, Domingo E, Cristina J. Topology of evolving, mutagenized viral populations: quasispecies expansion, compression, and operation of negative selection. *BMC Evol Biol* 2008; **8**: 207 [PMID: 18637173 DOI: 10.1186/1471-2148-8-207]
- 88 **Torres-Puente M**, Cuevas JM, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, Wrobel B, Carnicer F, Del Olmo J, Ortega E, Moya A, González-Candelas F. Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J Viral Hepat* 2008; **15**: 188-199 [PMID: 18233992 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00929.x]
- 89 **Ge D**, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; **461**: 399-401 [PMID: 19684573 DOI: 10.1038/nature08309]
- 90 **Rallón NI**, Naggie S, Benito JM, Medrano J, Restrepo C, Goldstein D, Shianna KV, Vispo E, Thompson A, McHutchison J, Soriano V. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 2010; **24**: F23-F29 [PMID: 20389235 DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283391d6d]
- 91 **Suppiah V**, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; **41**: 1100-1104 [PMID: 19749758 DOI: 10.1038/ng.447]
- 92 **Tanaka Y**, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; **41**: 1105-1109 [PMID: 19749757 DOI: 10.1038/ng.449]
- 93 **Urban TJ**, Thompson AJ, Bradrick SS, Fellay J, Schuppan D, Cronin KD, Hong L, McKenzie A, Patel K, Shianna KV, McHutchison JG, Goldstein DB, Afdhal N. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; **52**: 1888-1896 [PMID: 20931559 DOI: 10.1002/hep.23912]
- 94 **Yuan H**, Adams-Huet B, Petersen T, Attar N, Lee WM, Jain MK. A single nucleotide polymorphism in IL28B affects viral evolution of hepatitis C quasispecies after pegylated interferon and ribavirin therapy. *J Med Virol* 2012; **84**: 1913-1919 [PMID: 23080496 DOI: 10.1002/jmv.23407]
- 95 **Aparicio E**, Franco S, Parera M, Andrés C, Tural C, Clotet B, Martínez MA. Complexity and catalytic efficiency of hepatitis C virus (HCV) NS3 and NS4A protease quasispecies influence responsiveness to treatment with pegylated interferon plus ribavirin in HCV/HIV-coinfected patients. *J Virol* 2011; **85**: 5961-5969 [PMID: 21471227 DOI: 10.1128/JVI.00308-11]
- 96 **Miura M**, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2011; Epub ahead of print [PMID: 22020823 DOI: 10.1007/s12072-011-9307-6]
- 97 **Valenti L**, Pulixi E, La Spina S. IL28B, HCV core mutations, and hepatocellular carcinoma: does host genetic make-up shape viral evolution in response to immunity? *Hepa Inter* 2012; **6**: 356-359 [DOI: 10.1007/s12072-011-9327-2]
- 98 **Bushman FD**, Hoffmann C, Ronen K, Malani N, Minkah N, Rose HM, Tebas P, Wang GP. Massively parallel pyrosequencing in HIV research. *AIDS* 2008; **22**: 1411-1415 [PMID: 18614863 DOI: 10.1097/QAD.0b013e32828fc972e]
- 99 **Eriksson N**, Pachter L, Mitsuya Y, Rhee SY, Wang C, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW, Beerenwinkel N. Viral population estimation using pyrosequencing. *PLoS Comput Biol* 2008; **4**: e1000074 [PMID: 18437230 DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000074]
- 100 **Margeridon-Thermet S**, Shulman NS, Ahmed A, Shahrir R, Liu T, Wang C, Holmes SP, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Hanczaruk B, Simen BB, Egholm M, Shafer RW. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naïve patients. *J Infect Dis* 2009; **199**: 1275-1285 [PMID: 19301976 DOI: 10.1086/597808]
- 101 **Luciani F**, Bull RA, Lloyd AR. Next generation deep sequencing and vaccine design: today and tomorrow. *Trends Biotechnol* 2012; **30**: 443-452 [PMID: 22721705 DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.05.005]
- 102 **Metzker ML**. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; **11**: 31-46 [PMID: 19997069 DOI: 10.1038/nrg2626]
- 103 **Schadt EE**, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: R227-R240 [PMID: 20858600 DOI: 10.1093/hmg/ddq416]
- 104 **Kelleher RJ**, Geigenmüller U, Hovhannisyann H, Trautman E, Pinard R, Rathmell B, Carpenter R, Margulies D. High-throughput sequencing of mGluR signaling pathway genes reveals enrichment of rare variants in autism. *PLoS One* 2012; **7**: e35003 [PMID: 22558107 DOI: 10.1371/journal.pone.0035003]
- 105 **Svarovskaia ES**, Martin R, McHutchison JG, Miller MD, Mo H. Abundant drug-resistant NS3 mutants detected by deep sequencing in hepatitis C virus-infected patients undergoing NS3 protease inhibitor monotherapy. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3267-3274 [PMID: 22837328 DOI: 10.1128/JCM.00838-12]
- 106 **Leitner T**, Halapi E, Scarlatti G, Rossi P, Albert J, Fenyö EM, Uhlén M. Analysis of heterogeneous viral populations by direct DNA sequencing. *Biotechniques* 1993; **15**: 120-127 [PMID: 8363827]
- 107 **Fonseca-Coronado S**, Escobar-Gutiérrez A, Ruiz-Tovar K, Cruz-Rivera MY, Rivera-Osorio P, Vazquez-Pichardo M, Carpio-Pedroza JC, Ruiz-Pacheco JA, Cazares F, Vaughan G. Specific detection

- of naturally occurring hepatitis C virus mutants with resistance to telaprevir and boceprevir (protease inhibitors) among treatment-naïve infected individuals. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 281-287 [PMID: 22116161 DOI: 10.1128/JCM.05842-11]
- 108 **Hiraga N**, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology* 2011; **54**: 764-771 [PMID: 21618576 DOI: 10.1002/hep.24453]
- 109 **Ninomiya M**, Ueno Y, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Kimura O, Nakayama K, Shimosegawa T. Use of illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 857-866 [PMID: 22205816 DOI: 10.1128/JCM.05715-11]
- 110 **Escobar-Gutiérrez A**, Vazquez-Pichardo M, Cruz-Rivera M, Rivera-Osorio P, Carpio-Pedroza JC, Ruiz-Pacheco JA, Ruiz-Tovar K, Vaughan G. Identification of hepatitis C virus transmission using a next-generation sequencing approach. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 1461-1463 [PMID: 22301026 DOI: 10.1128/JCM.00005-12]
- 111 **Moreno P**, Alvarez M, López L, Moratorio G, Casane D, Castells M, Castro S, Cristina J, Colina R. Evidence of recombination in Hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virology* 2009; **6**: 203 [PMID: 19922637 DOI: 10.1186/1743-422X-6-203]
- 112 **Worobey M**, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 1999; **80** (Pt 10): 2535-2543 [PMID: 10573145]
- 113 **Lai MM**. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* 1992; **56**: 61-79 [PMID: 1579113]
- 114 **Copper PD**, Steiner-Pryor A, Scotti PD, DeLong D. On the nature of poliovirus genetic recombinants. *J Gen Virol* 1974; **23**: 41-49 [PMID: 4364875]
- 115 **Kew O**, Nottay B. Evolution of the oral polio vaccine strains in humans occurs by both mutation and intra-molecular recombination. In: Chanock RM LR, editor. Modern approaches to vaccines. Molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1984: 457
- 116 **Diemer GS**, Stedman KM. A novel virus genome discovered in an extreme environment suggests recombination between unrelated groups of RNA and DNA viruses. *Biol Direct* 2012; **7**: 13 [PMID: 22515485 DOI: 10.1186/1745-6150-7-13]
- 117 **Becher P**, Orlich M, Thiel HJ. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol* 2001; **75**: 6256-6264 [PMID: 11413291 DOI: 10.1128/JVI.75.14.6256-6264.2001]
- 118 **Holmes EC**, Worobey M, Rambaut A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol* 1999; **16**: 405-409 [PMID: 10331266]
- 119 **Tolou HJ**, Couissinier-Paris P, Durand JP, Mercier V, de Pina JJ, de Micco P, Billoir F, Charrel RN, de Lamballerie X. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *J Gen Virol* 2001; **82**: 1283-1290 [PMID: 11369871]
- 120 **Twiddy SS**, Holmes EC. The extent of homologous recombination in members of the genus Flavivirus. *J Gen Virol* 2003; **84**: 429-440 [PMID: 12560576]
- 121 **Uzcategui NY**, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* 2001; **82**: 2945-2953 [PMID: 11714970]
- 122 **Worobey M**, Holmes EC. Homologous recombination in GB virus C/hepatitis G virus. *Mol Biol Evol* 2001; **18**: 254-261 [PMID: 11158384]
- 123 **Yun Z**, Lara C, Johansson B, Lorenzana de Rivera I, Sönnberg A. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J Med Virol* 1996; **49**: 155-160 [PMID: 8818959 DOI: 10.1002/(SICI)1096-9071(199607)49:3<155::AID-JMV1>3.0.CO;2-3]
- 124 **Kalinina O**, Norder H, Mukomolov S, Magnius LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002; **76**: 4034-4043 [PMID: 11907242]
- 125 **Moreau I**, Hegarty S, Levis J, Sheehy P, Crosbie O, Kenny-Walsh E, Fanning LJ. Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland. *Virology* 2006; **3**: 95 [PMID: 17107614 DOI: 10.1186/1743-422X-3-95]
- 126 **Kurbanov F**, Tanaka Y, Avazova D, Khan A, Sugauchi F, Kan N, Kurbanova-Khudayberganova D, Khikmatullaeva A, Musabaev E, Mizokami M. Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. *Hepatol Res* 2008; **38**: 457-464 [PMID: 18034826 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00293.x]
- 127 **Demetriou VL**, Kyriakou E, Kostrikis LG. Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates. *Adv Virol* 2011; **2011**: 710438 [PMID: 22315602 DOI: 10.1155/2011/710438]
- 128 **Morel V**, Descamps V, François C, Fournier C, Brochet E, Capron D, Duverlie G, Castelain S. Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed Hepatitis C infection: a case report. *J Clin Virol* 2010; **47**: 382-386 [PMID: 20153975 DOI: 10.1016/j.jcv.2010.01.011]
- 129 **Tallo T**, Norder H, Tefanova V, Krispin T, Schmidt J, Ilmoja M, Orgulas K, Pruunsild K, Priimägi L, Magnius LO. Genetic characterization of hepatitis C virus strains in Estonia: fluctuations in the predominating subtype with time. *J Med Virol* 2007; **79**: 374-382 [PMID: 17311333 DOI: 10.1002/jmv.20828]
- 130 **Noppornpanth S**, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol* 2006; **80**: 7569-7577 [PMID: 16840336 DOI: 10.1128/JVI.00312-06]
- 131 **Lee YM**, Lin HJ, Chen YJ, Lee CM, Wang SF, Chang KY, Chen TL, Liu HF, Chen YM. Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: Full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form 2b6w. *J Med Virol* 2010; **82**: 57-68 [PMID: 19950240 DOI: 10.1002/jmv.21658]
- 132 **Legrand-Abrevanel F**, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, Pasquier C, Izopet J. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol* 2007; **81**: 4357-4362 [PMID: 17267503 DOI: 10.1128/JVI.02639-06]
- 133 **Du H**, Qi Y, Hao F, Huang Y, Mao L, Ji S, Huang M, Qin C, Yan R, Zhu X, Zhang C. Complex patterns of HCV epidemic in Suzhou: evidence for dual infection and HCV recombination in East China. *J Clin Virol* 2012; **54**: 207-212 [PMID: 22595306 DOI: 10.1016/j.jcv.2012.04.017]
- 134 **Bhattacharya D**, Accola MA, Ansari IH, Striker R, Rehrauer WM. Naturally occurring genotype 2b/1a hepatitis C virus in the United States. *Virology* 2011; **8**: 458 [PMID: 21967740 DOI: 10.1186/1743-422X-8-458]
- 135 **Yokoyama K**, Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Yotsumoto S, Okamoto H, Momoi MY. Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan. *Arch Virol* 2011; **156**: 1591-1601 [PMID: 21643787 DOI: 10.1007/s00705-011-1038-4]
- 136 **Hoshino H**, Hino K, Miyakawa H, Takahashi K, Akbar SM, Mishiro S. Inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noted by discrepancies between immunoassay and sequencing. *J Med Virol* 2012; **84**: 1018-1024 [PMID: 22585717 DOI: 10.1002/jmv.23300]
- 137 **Kageyama S**, Agdamag DM, Alesna ET, Leaño PS, Heredia AM, Abellanosa-Tac-An IP, Jereza LD, Tanimoto T, Yamamura J, Ichimura H. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol* 2006; **78**: 1423-1428 [PMID: 16998890 DOI: 10.1002/jmv.20714]
- 138 **Morel V**, Fournier C, François C, Brochet E, Helle F, Duverlie G, Castelain S. Genetic recombination of the hepatitis C virus: clinical implications. *J Viral Hepat* 2011; **18**: 77-83 [PMID: 21235686 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2010.01367.x]
- 139 **Kalinina O**, Norder H, Magnius LO. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg:

- proposed mechanism for its formation. *J Gen Virol* 2004; **85**: 1853-1857 [PMID: 15218169 DOI: 10.1099/vir.0.79984-0]
- 140 **Calado RA**, Rocha MR, Parreira R, Piedade J, Venenno T, Esteves A. Hepatitis C virus subtypes circulating among intravenous drug users in Lisbon, Portugal. *J Med Virol* 2011; **83**: 608-615 [PMID: 21328374 DOI: 10.1002/jmv.21955]
- 141 **Colina R**, Casane D, Vasquez S, García-Aguirre L, Chunga A, Romero H, Khan B, Cristina J. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2004; **85**: 31-37 [PMID: 14718617]
- 142 **Cristina J**, Colina R. Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. *Virology* 2006; **3**: 53 [PMID: 16813646 DOI: 10.1186/1743-422X-3-53]
- 143 **Ross RS**, Verbeeck J, Viazov S, Lemey P, Van Ranst M, Roggendorf M. Evidence for a complex mosaic genome pattern in a full-length hepatitis C virus sequence. *Evol Bioinform Online* 2008; **4**: 249-254 [PMID: 19204822]
- 144 **Shi W**, Freitas IT, Zhu C, Zheng W, Hall WW, Higgins DG. Recombination in hepatitis C virus: identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. *PLoS One* 2012; **7**: e41997 [PMID: 22911872 DOI: 10.1371/journal.pone.0041997]
- 145 **Moreno MP**, Casane D, López L, Cristina J. Evidence of recombination in quasispecies populations of a Hepatitis C Virus patient undergoing anti-viral therapy. *Virology* 2006; **3**: 87 [PMID: 17062150 DOI: 10.1186/1743-422X-3-87]
- 146 **Sentandreu V**, Jiménez-Hernández N, Torres-Puente M, Bracho MA, Valero A, Gosalbes MJ, Ortega E, Moya A, González-Candelas F. Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PLoS One* 2008; **3**: e3239 [PMID: 18800167 DOI: 10.1371/journal.pone.0003239]
- 147 **Palmer BA**, Moreau I, Levis J, Harty C, Crosbie O, Kenny-Walsh E, Fanning LJ. Insertion and recombination events at hypervariable region 1 over 9.6 years of hepatitis C virus chronic infection. *J Gen Virol* 2012; **93**: 2614-2624 [PMID: 22971825 DOI: 10.1099/vir.0.045344-0]
- 148 **Enomoto N**, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995; **96**: 224-230 [PMID: 7542279 DOI: 10.1172/JCI118025]
- 149 **Gale MJ**, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997; **230**: 217-227 [PMID: 9143277 DOI: 10.1006/viro.1997.8493]
- 150 **Giménez-Barcons M**, Franco S, Suárez Y, Fornis X, Ampurdanès S, Puig-Basagoiti F, Sánchez-Fueyo A, Barrera JM, Llovet JM, Bruix J, Sánchez-Tapias JM, Rodés J, Saiz JC. High amino acid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b-related cirrhosis. *Hepatology* 2001; **34**: 158-167 [PMID: 11431747 DOI: 10.1053/jhep.2001.25512]
- 151 **Witherell GW**, Beineke P. Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J Med Virol* 2001; **63**: 8-16 [PMID: 11130893]
- 152 **Gale M**, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 5208-5218 [PMID: 9710605]
- 153 **Pawlotsky JM**, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 1998; **72**: 2795-2805 [PMID: 9525599]
- 154 **Costa-Mattioli M**, Ferré V, Casane D, Perez-Bercoff R, Coste-Burel M, Imbert-Marcille BM, Andre EC, Bressollette-Bodin C, Billaudel S, Cristina J. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. *Virology* 2003; **311**: 51-59 [PMID: 12832202]
- 155 **Yusim K**, Richardson R, Tao N, Dalwani A, Agrawal A, Szinger J, Funkhouser R, Korber B, Kuiken C. Los alamos hepatitis C immunology database. *Appl Bioinformatics* 2005; **4**: 217-225 [PMID: 16309340]

P- Reviewer: Bare P, Sayiner AA **S- Editor:** Ji FF

L- Editor: A **E- Editor:** Liu SQ



Human Endogenous Retrovirus: Their Relationship with Hematological Diseases

Sabrina Fischer, Natalia Echeverria, Juan Cristina and Pilar Moreno*

Laboratorio de Virologia Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay

*Corresponding author: Pilar Moreno, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Virologia Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Universidad de la Republica, Matajojo 2055, 11400 Montevideo, Uruguay, Tel: +598 2 2525 08 00; Fax: +598 2525 0895; E-mail: pmoreno@cin.edu.uy

Received date: Aug 05, 2016; Accepted date: Sep 08, 2016; Published date: Sep 15, 2016

Copyright: © 2016 Fischer S et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Human endogenous retrovirus (HERVs) integrated in the human genome millions of years ago and became a stable part of the inherited genetic material. Most of these HERVs are dysfunctional due to numerous mutations and thus making it impossible to generate a full, infectious retrovirus particle from a single genetic locus. However, many HERVs are still exceptionally well preserved and maintain Open Reading Frames encoding functional viral proteins. The permanence of HERV's genes along evolution suggests that these elements have proven beneficial to human survival. In this regard, the expression of certain HERV proteins is implicated in important physiological functions, such as placental development. Nevertheless, reactivation of HERVs has frequently been observed in a variety of human tumors suggesting their potential to contribute to malignant progression. Considering the role of HERVs in the carcinogenesis process, the purpose of this mini review is to deepen into HERVs expression and its possible implication in hemato-oncologic disease development.

Keywords: Retroviruses; Exogenous; Mutations

Introduction

Human endogenous retroviruses (HERVs) are genetic remnants of ancient retroviral infections of the germ line which occurred along primate evolution. During the infection process, an exogenous retrovirus infected germ-line cells and its viral genome integrated as a provirus into the cell's chromosomal DNA [1-3]. Provided that the integration process and replication of the inserted virus does not prevent fertilization, the fetus will then carry the retroviral element in all its somatic and germ-line cells, thus, the provirus becomes part of the human genome and it is transmitted to the following generations. To date, approximately 8% of the human genome is composed of such retroviral sequences [4,5].

Intact HERV sequences share the canonical structure of exogenous retroviruses consisting of an internal region of four essential viral genes (gag, pro, pol, and env); flanked by two Long Terminal Repeats (LTRs) elements. The open reading frames (ORFs) encode viral polyproteins which, after post-translational modification, become the critical structural and functional proteins, such as the reverse transcriptase or the transmembrane envelope, while the LTRs specify promoter, enhancer and polyadenylation signals. Many HERVs also express accessory proteins with potentially important cellular functions that may be relevant to disease development. However, most HERVs are dysfunctional due to numerous mutations such as stop codons or frameshifts, inhibiting the translation of functional proteins and thus making it impossible to generate a full, infectious retrovirus particle from a single genetic locus. In addition, internal viral genes have been removed by recombination of the 5' and 3' LTRs, creating an important amount of "solo HERV-LTRs" [6-9].

However, many HERVs are still exceptionally well preserved and maintain ORFs encoding functional viral proteins as well. HERV-K family belongs to the latter and its members not only contain sequences which maintain complete, or near-complete ORFs for all

viral polyproteins, but they have also been shown to be transcriptionally active [10-12]. The HML-2 group of HERV-Ks is the most recently acquired in the human genome, having integrated 200.000 to 5 million years ago and because of this, they are the only HERVs specific to the human lineage, and therefore the most conserved ones. Approximately 91 full-length copies of HERV-K (HML-2) have been found per haploid genome and ~950 solo-LTRs [11,13].

Many HERVs are transcribed and translated under normal physiological conditions. Nevertheless, reactivation of HERVs has frequently been observed in a variety of human tumors suggesting their potential to contribute to malignant progression.

HERVs in Health and Disease

The permanence of HERV's genes along evolution suggests that these elements have proven beneficial to human survival. In this regard, the expression of certain HERV proteins is implicated in important physiological functions, such as placental development. The envelope gene product of members of the HERV-W and HERV-FD families, named Syncitin 1 and 2 respectively, are highly fusogenic glycoproteins that are specifically expressed in the placenta mediating the fusion of trophoblast cells [14,15]. Endogenous retroviral elements are also involved in physiological functions regulating the transcription of various genes (such as INSL 4, 1,3-GT, endothelin B receptor tissue-specific salivary amylase [16-20]) as well as providing or enhancing protection mechanisms against exogenous virus infections [21-23].

In addition to their physiological roles, HERVs have been proposed as possible cofactors in the etiology of various autoimmune diseases, neurological disorders and cancer [24]. In reference to autoimmune diseases, there are many reports that indicate a possible role of HERVs in the development of multiple sclerosis (MS) [25-27], rheumatoid arthritis (RA) [28,29] and systemic lupus erythematosus (SLE) [30]. A role for HERVs has also been proposed in neurological and

neuropsychiatric diseases as diverse as Autistic Spectrum Disorder (ASD), Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), and schizophrenia (SCZ). For SCZ, ASD and ADHD indications are accumulating for involvement of the HERV-W and HERV-H families [31-35]. Further studies of HERVs and their pathogenic role both in autoimmune and neurologic diseases are essential to draw proper conclusions and prove a functional link between them. In contrast to the situation with autoimmune diseases and neurological disorders, the picture concerning HERVs expression in malignant diseases is much clearer. Many reports indicate that some HERVs encoding loci are transcriptionally silent in normal cells, becoming active after malignant transformation. In malignant tissues and cell lines, HERVs expression as RNA, protein, and even viral particles are commonly seen [36-38]. The first clear association of HERV-K expression with human disease came from the discovery of HERV-K (HML-2) encoded viral particles observed to bud from germ cell tumors (GCTs) [39,40]. To date, transcripts of HERVs have been detected by many independent investigators in different tumors: breast cancer [41-46], ovarian cancer [47], lymphoma [42], melanoma [48-50], germ line tumors [51,52], hematological neoplasms [53-55], bladder and prostate cancer [56], primary skin tumors and lymphatic metastases [57,58]. Many cancers exhibit a general state of hypomethylation, thus, HERVs activation during tumorigenesis may also be the result of this epigenetic state [56,59,60].

There are different molecular mechanisms by which HERVs may contribute to the promotion of unhealthy processes:

- Given that HERVs sequences are retro transposons, they have the ability to mobilize and be integrated next to cellular genes whose expression could be consequently altered.
- Through HERVs gene activation and overexpression leading to the production of HERVs proteins that could trigger an autoimmune response or may initiate or maintain carcinogenesis by transcriptional activation of various cellular oncogenes [61,62].
- Through the over-production of potential viral oncogenes such as Rec and Np9 proteins. It is known that both proteins have different binding domains to cellular proteins promoting modifications of different cell signaling pathways [63].
- Through the regulatory sequences of LTRs which can promote the regulation of nearby (proto-) oncogenes or growth factors [18,64,65].

These HERVs mechanisms may be triggered by:

- Epigenetic factors such as DNA hypo methylation which can promote a general or more specific (re)activation of HERV sequences [66,67]. The epigenetic changes observed in pathological conditions such as SLE or cancer could be translated into an effect on the activation of some of the retro elements present in our genome, which could have a direct or indirect role in the initiation and clinical evolution of certain chronic diseases [29,64].
- Environmental factors (both exogenous and endogenous) which can facilitate HERV's expression. Exogenous factors are associated with chemicals [68]. UV radiation [69-71] and smoking [72]. Viral interactions such as with Epstein-Barr virus (EBV) [73] or Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) [74,75] were also reported. It has been shown that infection of humans with HIV-1 has profound effects upon the resident HERVs by up regulating transcripts and proteins from diverse classes of endogenous retroviruses [76]. Endogenous factors are associated with the

expression of estrogen [77], cytokines [78] and also some transcriptional factors [79-81] (Figure 1).

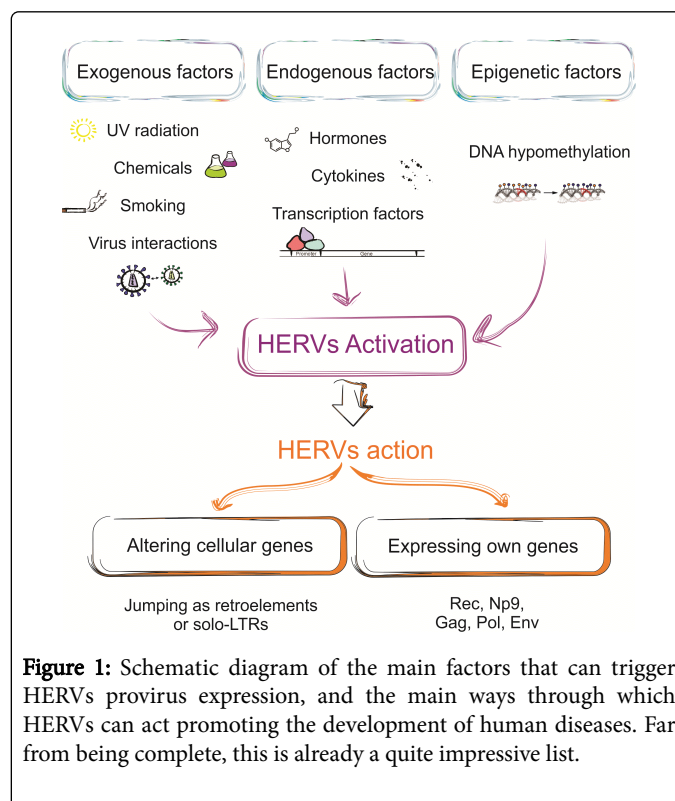


Figure 1: Schematic diagram of the main factors that can trigger HERVs provirus expression, and the main ways through which HERVs can act promoting the development of human diseases. Far from being complete, this is already a quite impressive list.

HERVs and Hemato-oncological Diseases

With regards to blood-oncological processes, much work has been undertaken to decipher the implications of HERVs expression in the development of different types of blood cancers (Table 1). Many HERVs types as well as many HERVs genes (gag, pol, env, np9) have been associated to a variety of hemato-oncological process and some of them might be related to specific cellular pathways involved in the course of the disease.

The first study that evidenced a relation between the activation of endogenous retroviral sequences and leukemia was performed by McClain and Wilkowski in 1985 [82]. In their work the authors showed for the first time that RNA from HERVs were expressed at higher levels in human lymphoid leukemia cells than in normal lymphocytes. In addition, antibody response against HERV-K peptides has also been reported in leukemia patients suggesting that members of the HERV-K family may be overexpressed in leukemic cells [83].

In the late twentieth century Brodsky and colleagues reported a potential role of HERV-K in both chronic myeloid leukemia (CML) and acute myeloid leukemia (AML) [84]. They found that HERV-K pol gene is expressed in the white blood cells of patients with CML and AML. Consistent with that suggestion, Depil and colleagues found a relative overexpression of HERV-K gag sequences in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from six out of eight leukemia samples, that included CML, AML, Chronic Lymphoid Leukemia (CLL) and acute lymphoid leukemia (ALL), when compared with healthy PBMCs [53]. Recently it was also reported HERV-K np9 gene overexpression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from CLL patients compared to PBMCs from healthy donors, suggesting a significant

relationship between this pathology and an HERV-K oncoprotein expression [85]. In reference to childhood leukemias, HERVs RNA overexpression was detected in cells from children with ALL as well as HERV-K env gene overexpression in childhood AML [54,86]. In lymphoma patients, extremely high titers of HERV-K viral RNA have been detected in their blood, that fall precipitously when patients are treated. Additionally the presence of HERV-K (HML-2) virus-like particles has been observed [42]. In reference to non-Hodgkin lymphoma (NHL) and in Hodgkin Disease (HD), high levels of HERV-K (HML2) RNA in the plasma of patients with HIV positive and HIV negative, but not in normal individuals were detected [87] (Table 1).

Hemato-oncological disease	HERV gene Involved	Reference
Chronic myeloid leukemia	HERV-K pol	[84]
Acute myeloid leukemia	HERV-K pol HERV-K env	[86]
Lymphatic leukemias	HERV-K LTRs	[88]
Chronic lymphocytic leukemia	HERV-K gag	[53]
Chronic myeloid leukemia		
Acute myeloid leukemia		
Human leukemia stem/progenitor cells	HERV-K np9	[90]
Chronic lymphocytic leukemia	HERV-K np9	[85]

Table 1: Research studies of HERVs specific mRNA overexpression associated with leukemia.

Taking up the important regulatory role of the solo HERV-K LTRs sequences, their transcripts have been detected in patients with lymphatic leukemias, whereas they have not been found in patients with myelogenous leukemia's or in healthy persons [88].

The HERV-K family is not the only candidate to be involved in the progression of different hemato-oncological diseases. There are other HERVs families, like HERV-F/H, which suggest a cancer-specific expression pattern. An association between HERV-F/H mRNA expression and hematopoietic cancer cell lines, including B and Myeloid lineage leukemia cell lines, has been reported, whereas no expression was observed in normal human tissues [89].

In reference to the pathway altered by HERVs proteins, a recent study identifies Np9 as a potent viral oncogene in human leukemia. Silencing Np9 inhibited the growth of myeloid and lymphoblastic leukemia cells, whereas its expression promoted the growth of leukemia cells in vitro and in vivo. This work proved that Np9 acts as a critical molecular switch of multiple signaling pathways (ERK, AKT, Notch 1 and β -catenin) promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells [90]. This may be one of the ways which HERVs can contribute to the leukemization process but probably other cellular pathways may be affecting by HERV proteins.

Conclusion

All this information evidences a relationship between HERVs expression and leukemia. Further studies on the functional roles of HERVs expression in different cellular pathways would be essential to understand the link between HERVs and disease development, and

opens new perspective to unravel the etiology of human leukemia. This would not only help us to understand the involvement of these retroviruses in the development of different diseases, but would as well provide useful data on new molecules that could possibly be used as leukemia markers and as potential therapeutic targets.

Acknowledgment

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) [project FCE_6569], PEDECIBA, Comisión Académica de Posgrados, Universidad de la República (UdelAR) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelAR, Uruguay.

References

1. Martin MA, Bryan T, Rasheed S, Khan AS (1981) Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4892-4896.
2. Singh SK (2007) Endogenous retroviruses: suspects in the disease world. *Future Microbiol* 2: 269-275.
3. Feschotte C, Gilbert C (2012) Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat Rev Genet* 13: 283-296.
4. Weiss RA (2006) The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 3: 67.
5. Balestrieri E, Pica F, Matteucci C, Zenobi R, Sorrentino R, et al. (2015) Transcriptional activity of human endogenous retroviruses in human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Res Int*.
6. Griffiths DJ (2001) Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol* 2: 1017.
7. Bannert N, Kurth R (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14572-14579.
8. Downey RF, Sullivan FJ, Wang-Johanning F, Ambs S, Giles FJ, et al. (2015) Human endogenous retrovirus K and cancer: Innocent bystander or tumorigenic accomplice? *Int J Cancer* 137: 1249-1257.
9. Hughes JE, Coffin JM (2004) Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1668-1672.
10. Bannert N, Kurth R (2006) The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 149-173.
11. Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM (2011) Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology* 8: 90.
12. Berkhout B, Jebbink M, Zsiros J (1999) Identification of an Active Reverse Transcriptase Enzyme Encoded by a Human Endogenous HERV-K Retrovirus. *J Virol* 73: 2365-2375.
13. Barbulescu M, Turner G, Seaman MI, Deinard AS, Kidd KK, et al. (1999) Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol* 9: 861-868.
14. Blaise S, Ruggieri A, Dewannieux M, Cosset FL, Heidmann T (2004) Identification of an envelope protein from the FRD family of human endogenous retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity and functional conservation among simians. *J Virol* 78: 1050-1054.
15. Mi S, Lee X, Li XP, Veldman GM, Finnerty H, et al. (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403: 785-789.
16. Bieche I, Laurent A, Laurendeau I, Duret L, Giovangrandi Y, et al. (2003) Placenta-specific INSL4 expression is mediated by a human endogenous retrovirus element. *Biol Reprod* 68: 1422-1429.
17. Jern P, Coffin JM (2008) Effects of retroviruses on host genome function. *Annu Rev Genet* 42: 709-732.

18. Dunn CA, Medstrand P, Mager DL (2003) An endogenous retroviral long terminal repeat is the dominant promoter for human beta1,3-galactosyltransferase 5 in the colon. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12841-12846.
19. Medstrand P, Landry JR, Mager DL (2001) Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *J Biol Chem* 276: 1896-1903.
20. Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH, et al. (1992) Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev* 6: 1457-1465.
21. Garrison KE, Jones RB, Meiklejohn DA, Anwar N, Ndhlovu LC, et al. (2007) T cell responses to human endogenous retroviruses in HIV-1 infection. *PLoS Pathog* 3: 1617-1627.
22. Gonzalez-Hernandez MJ, Swanson MD, Galindo CR, Cookinham S, King SR, et al. (2012) Expression of Human Endogenous Retrovirus Type-K (HML-2) is activated by the Tat protein of HIV-1. *J Virol* 86: 7790-7805.
23. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C (2016) Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science* 351: 1083-1087.
24. Moyes D, Griffiths DJ, Venables PJ (2007) Insertional polymorphisms: a new lease of life for endogenous retroviruses in human disease. *Trends Genet* 23: 326-333.
25. Christensen T (2005) Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* 15: 179-211.
26. Rasmussen HB, Geny C, Deforges L, Perron H, Tourtelotte W, et al. (1995) Expression of endogenous retroviruses in blood mononuclear cells and brain tissue from multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 1: 82-87.
27. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez A, de las Heras V, et al. (2013) The DNA Copy Number of Human Endogenous Retrovirus-W (MSRV-Type) Is Increased in Multiple Sclerosis Patients and Is Influenced by Gender and Disease Severity. *PLoS One*.
28. Nakagawa K, Brusica V, McColl G, Harrison L (1997) Direct evidence for the expression of multiple ERVs in the synovial compartment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40: 627-638.
29. Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M (2009) Molecular mechanisms mediated by Human Endogenous Retroviruses (HERVs) in autoimmunity. *Rev Med Virol* 19: 273-286.
30. Blomberg J, Nived O, Pipkorn R, Bengtsson A, Erlinge D, et al. (1994) Increased antiretroviral antibody reactivity in sera from a defined population of patients with systemic lupus erythematosus: Correlation with autoantibodies and clinical manifestations. *Arthritis Rheum* 37: 57-66.
31. Christensen T (2016) Human endogenous retroviruses in neurologic disease. *Apmis* 124: 116-126.
32. Balestrieri E, Arpino C, Matteucci C, Sorrentino R, Pica F, et al. (2012) HERVs Expression in Autism Spectrum Disorders.
33. Balestrieri E, Pitzianti M, Matteucci C, D'Agati E, Sorrentino R, et al. (2013) Human endogenous retroviruses and ADHD. *World J Biol Psychiatry* 1-6.
34. Karlsson H, Bachmann S, Schroder J, McArthur J, Torrey EF, et al. (2001) Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci* 98: 4634-4639.
35. Slokar G, Hasler G (2016) Human endogenous retroviruses as pathogenic factors in the development of schizophrenia. *Front Psychiatry*.
36. Kassiotis G (2014) Endogenous retroviruses and the development of cancer. *J Immunol* 192: 1343-1349.
37. Bhardwaj N, Coffin JM (2014) Endogenous retroviruses and human cancer: Is there anything to the rumors? *Cell Host Microbe* 15: 255-259.
38. Lower R (1999) The pathogenic potential of endogenous retroviruses: Facts and fantasies. *Trends Microbiol* 7: 350-356.
39. Ruprecht K, Mayer J, Sauter M, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2008) Endogenous retroviruses. *Cell Mol Life Sci* 65: 3366-3382.
40. Flockerzi A, Ruggieri A, Frank O, Sauter M, Maldener E, et al. (2008) Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project. *BMC Genomics* 9: 354.
41. Ejthadi HD, Martin JH, Junying J, Roden DA, Lahiri M, et al. (2005) A novel multiplex RT-PCR system detects human endogenous retrovirus-K in breast cancer. *Arch Virol* 150: 177-184.
42. Contreras-Galindo R, Kaplan MH, Leissner P, Verjat T, Ferlenghi I, et al. (2008) Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J Virol* 82: 9329-9336.
43. Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL, Khazaeli MB, LoBuglio AF, et al. (2001) Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 7: 1553-1560.
44. Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Epp L, Lu DW, et al. (2003) Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* 22: 1528-1535.
45. Wang-Johanning F, Radvanyi L, Rycak J, Plummer JB, Yan P, et al. (2008) Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer Res* 68: 5869-5877.
46. Wang-Johanning F, Rycak K, Plummer JB, Li M, Yin B, et al. (2012) Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-k envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 104: 189-210
47. Wang-Johanning F, Liu J, Rycak K, Huang M, Tsai K, et al. (2007) Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer* 120: 81-90.
48. Schiavetti F, Thonnard J, Colau D, Boon T, Coulie PG (2002) A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* 62: 5510-5516.
49. Serafino A, Balestrieri E, Pierimarchi P, Matteucci C, Moroni G, et al. (2009) The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp Cell Res* 315: 849-862.
50. Singh S, Kaye S, Gore ME, McClure MO, Bunker CB, et al. (2009) The role of human endogenous retroviruses in melanoma. *Br J Dermatol* 161: 1225-1231.
51. Kleiman A, Senyuta N, Tryakin A, Sauter M, Karseladze A, et al. (2004) HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. *Int J Cancer* 110: 459-461.
52. Herbst H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N (1996) Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Pathol* 149: 1727-1735.
53. Depil S, Roche C, Dussart P, Prin L (2002) Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients. *Leukemia* 16: 254-259.
54. Iwabuchi H, Kakiyama T, Kobayashi T, Imai C, Tanaka A, et al. (2004) A gene homologous to human endogenous retrovirus overexpressed in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 45: 2303-2306.
55. Boyd MT, Foley B, Brodsky I (1997) Evidence for copurification of HERV-K-related transcripts and a reverse transcriptase activity in human platelets from patients with essential thrombocythemia. *Blood* 90: 4022-4030.
56. Goering W, Ribarska T, Schulz WA (2011) Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer. *Carcinogenesis* 32: 1484-1492.
57. Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, et al. (2003) An Endogenous Retrovirus Derived from Human Melanoma Cells. *Cancer Res* 63: 8735-8741.
58. Buscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, et al. (2005) Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res* 65: 4172-4180.
59. Stengel S, Fiebig U, Kurth R, Denner J (2010) Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation. *Genes Chromosom Cancer* 49: 401-411.

60. Iramaneerat K, Rattananunyong P, Khemapech N, Triratanachat S, Mutirangura A (2011) HERV-K hypomethylation in ovarian clear cell carcinoma is associated with a poor prognosis and platinum resistance. *Int J Gynecol Cancer* 21: 51-57.
61. Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, Simon KC, Munger KL, et al. (2008) Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14: 1175-1180.
62. Romanish MT, Cohen CJ, Mager DL (2010) Potential mechanisms of endogenous retroviral-mediated genomic instability in human cancer. *Semin Cancer Biol* 20: 246-253.
63. Denne M, Sauter M, Armbruster V, Licht JD, Roemer K, et al. (2007) Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol* 81: 5607-5616.
64. Mullins CS, Linnebacher M (2012) Human endogenous retroviruses and cancer: Causality and therapeutic possibilities. *World J Gastroenterol* 18: 6027-6035.
65. Lamprecht B, Walter K, Kreher S, Kumar R, Hummel M, et al. (2010) Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med* 16: 571-579.
66. Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR (2006) Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 310: 211-250.
67. Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428.
68. Khan AS, Muller J, Sears JF (2001) Early detection of endogenous retroviruses in chemically induced mouse cells. *Virus Res* 79: 39-45.
69. Hohenadl C, Germaier H, Walchner M, Hagenhofer M, Herrmann M, et al. (1999) Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 113: 587-594.
70. Schanab O, Humer J, Gleiss A, Mikula M, Sturlan S, et al. (2011) Expression of human endogenous retrovirus K is stimulated by ultraviolet radiation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 656-665.
71. Reiche J, Pauli G, Ellerbrok H (2010) Differential expression of human endogenous retrovirus K transcripts in primary human melanocytes and melanoma cell lines after UV irradiation. *Melanoma Res* 20: 435-440.
72. Gabriel U, Steidler A, Trojan L, Michel MS, Seifarth W, et al. (2010) Smoking increases transcription of human endogenous retroviruses in a newly established in vitro cell model and in normal urothelium. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 883-888.
73. Sutkowski N, Chen G, Calderon G, Huber BT (2004) Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen. *J Virol* 78: 7852-7860.
74. Contreras-Galindo R, Lopez P, Velez R, Yamamura Y (2007) HIV-1 infection increases the expression of human endogenous retroviruses type K (HERV-K) in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 116-122.
75. Contreras-Galindo R, Kaplan MH, Contreras-Galindo AC, Gonzalez-Hernandez MJ, Ferlenghi I, et al. (2012) Characterization of Human Endogenous Retroviral Elements in the Blood of HIV-1-Infected Individuals. *J Virol* 86: 262-276.
76. Van der Kuyl AC (2012) HIV infection and HERV expression: a review. *Retrovirology* 9: 6.
77. Ono M, Kawakami M, Ushikubo H (1987) Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol* 61: 2059-2062.
78. Katsumata K, Ikeda H, Sato M, Ishizu A, Kawarada Y, et al. (1999) Cytokine regulation of env gene expression of human endogenous retrovirus-R in human vascular endothelial cells. *Clin Immunol Orlando Fla* 93: 75-80.
79. Katoh I, Mirova A, Kurata S, Murakami Y, Horikawa K, et al. (2011) Activation of the long terminal repeat of human endogenous retrovirus K by melanoma-specific transcription factor MITF-M. *Neoplasia* 13: 1081-1092.
80. Fuchs NV, Kraft M, Tondera C, Hanschmann KM, Lower J, et al. (2011) Expression of the Human Endogenous Retrovirus (HERV) Group HML-2/HERV-K Does Not Depend on Canonical Promoter Elements but Is Regulated by Transcription Factors Sp1 and Sp3. *J Virol* 85: 3436-3448.
81. Knossel M, Lower R, Löwer J (1999) Expression of the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K is enhanced by cellular transcription factor YY1. *J Virol* 73: 1254-1261.
82. McClain K, Wilkowski C (1985) Activation of endogenous retroviral sequences in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 133: 945-950.
83. Denner J, Phelps R, Lower R, Lower J, Kurth R, et al. (1995) Expression of the human endogenous retrovirus HERV-K in tumor and normal tissues and antibody response of pregnant women, tumor and AIDS patients against HERV-K Gag and Env peptides. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 103-107.
84. Brodsky I, Foley B, Gillespie D (1993) Expression of human endogenous retrovirus (HERV-K) in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 1: 119-123.
85. Fischer S, Echeverria N, Moratorio G, Landoni AI, Dighiero G, et al. (2014) Human endogenous retrovirus np9 gene is over expressed in chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Res reports* 3: 70-72.
86. Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowicka K, Rembowska J, Fichna M, Zurawek M, et al. (2013) Env gene expression of human endogenous retrovirus-k and human endogenous retrovirus-W in childhood acute leukemia cells. *Acta Haematol* 129: 232-237.
87. Gitlin SD, Contreras-Galindo R, Kaplan MH, Markovitz DM (2008) Role of Human Endogenous Retroviruses in Lymphoma Pathogenesis and a Possible Biomarker of Disease. *Blood* 112: 3751.
88. Simon M, Haltmeier M, Papakonstantinou G, Werner T, Hehlmann R, et al. (1994) Transcription of HERV-K-related LTRs in human placenta and leukemic cells. *Leukemia* 8 Suppl 1: S12-S17.
89. Patzke S, Lindeskog M, Munthe E, Aasheim HC (2002) Characterization of a Novel Human Endogenous Retrovirus, HERV-H/E, Expressed in Human Leukemia Cell Lines. *Virology* 303: 164-173.
90. Chen T, Meng Z, Gan Y, Wang X, Xu F, et al. (2013) The viral oncogene Np9 acts as a critical molecular switch for co-activating β -catenin, ERK, Akt and Notch1 and promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund* 27: 1469-1478.

RESEARCH ARTICLE

miRNA independent hepacivirus variants suggest a strong evolutionary pressure to maintain miR-122 dependence

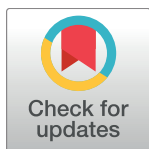
Yingpu Yu¹, Troels K. H. Scheel^{1,2}, Joseph M. Luna¹, Hachung Chung¹, Eiko Nishiuchi¹, Margaret A. Scull¹, Natalia Echeverría^{1,3}, Inna Ricardo-Lax¹, Amit Kapoor^{4,5}, Ian W. Lipkin⁶, Thomas J. Divers⁷, Douglas F. Antczak⁸, Bud C. Tennant^{7†}, Charles M. Rice^{1*}

1 Laboratory of Virology and Infectious Disease, Center for the Study of Hepatitis C, The Rockefeller University, New York, NY, United States of America, **2** Copenhagen Hepatitis C Program, Department of Infectious Diseases, Hvidovre Hospital, and Department of Immunology and Microbiology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, **3** Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, **4** Department of Pediatrics, College of Medicine, The Ohio State University, Columbus, OH, United States of America, **5** Center for Vaccines and Immunity, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, United States of America, **6** Center for Infection and Immunity, Mailman School of Public Health and College of Physicians & Surgeons, Columbia University, New York, NY, United States of America, **7** Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, United States of America, **8** Baker Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, United States of America

† Deceased.
* ricec@rockefeller.edu

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) requires the liver specific micro-RNA (miRNA), miR-122, to replicate. This was considered unique among RNA viruses until recent discoveries of HCV-related hepaciviruses prompting the question of a more general miR-122 dependence. Among hepaciviruses, the closest known HCV relative is the equine non-primate hepacivirus (NPHV). Here, we used Argonaute cross-linking immunoprecipitation (AGO-CLIP) to confirm AGO binding to the single predicted miR-122 site in the NPHV 5'UTR *in vivo*. To study miR-122 requirements in the absence of NPHV-permissive cell culture systems, we generated infectious NPHV/HCV chimeric viruses with the 5' end of NPHV replacing orthologous HCV sequences. These chimeras were viable even in cells lacking miR-122, although miR-122 presence enhanced virus production. No other miRNAs bound this region. By random mutagenesis, we isolated HCV variants partially dependent on miR-122 as well as robustly replicating NPHV/HCV variants completely independent of any miRNAs. These miRNA independent variants even replicate and produce infectious particles in non-hepatic cells after exogenous delivery of apolipoprotein E (ApoE). Our findings suggest that miR-122 independent HCV and NPHV variants have arisen and been sampled during evolution, yet miR-122 dependence has prevailed. We propose that hepaciviruses may use this mechanism to guarantee liver tropism and exploit the tolerogenic liver environment to avoid clearance and promote chronicity.



OPEN ACCESS

Citation: Yu Y, Scheel TKH, Luna JM, Chung H, Nishiuchi E, Scull MA, et al. (2017) miRNA independent hepacivirus variants suggest a strong evolutionary pressure to maintain miR-122 dependence. *PLoS Pathog* 13(10): e1006694. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006694>

Editor: Aleem Siddiqui, University of California, San Diego, UNITED STATES

Received: April 8, 2017

Accepted: October 14, 2017

Published: October 30, 2017

Copyright: © 2017 Yu et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This project was supported by grants from the Agriculture and Food Research initiative Competitive Grant no. 2016-67015-24765 from the USDA National Institute of Food and Agriculture, NIH, NIAID (A116943 to CMR), The Danish Council for Independent Research (0602-02148, 6110-00595 and 6111-00314 to TKHS), The Novo Nordisk Foundation (NNF15OC0017404 to TKHS),

The Lundbeck Foundation (R192-2015-1154 to TKHS) and The Weimann Foundation (TKHS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

It has been known for more than 10 years that the hepatitis C virus (HCV) genome binds two copies of the liver-specific microRNA (miRNA), miR-122. But until recently, it was unknown whether this interaction was unique to HCV or also conserved among other hepaciviruses. Now, due to our expanded view of the hepacivirus family, we know that most, if not all, hepaciviruses have at least one predicted miR-122 binding site in their 5' untranslated region (5'UTR). In this study, we aimed to obtain a broader understanding of hepacivirus/miR-122 interactions and determine how miR-122 dependence influences tissue tropism. To do this, we chose to study the equine non-primate hepacivirus (NPHV), the closest relative of HCV. NPHV has one predicted miR-122 site in its 5'UTR. We show that minor changes in the 5'UTR of HCV and NPHV/HCV chimeras weaken or obviate the need for miR-122 for virus replication. Overall, our data suggest that miR-122-independent hepaciviruses have likely been sampled during evolution, but hepaciviruses may have been selected to utilize miR-122 to restrict replication to the tolerogenic liver environment to help avoid immune clearance.

Introduction

Chronic HCV infection is one of the most common liver diseases with ~71 million people persistently infected globally; a significant number of those will develop cirrhosis or liver cancer [1]. The binding of liver specific miR-122 to HCV RNA is essential for viral replication [2]. This interaction is unusual in that two molecules of miR-122 bind to the 5' untranslated region (5'UTR) of HCV using both seed and auxiliary pairing [3,4]. It is well established that HCV viral load can be dramatically decreased by inhibiting miR-122 in cell culture, chimpanzees or patients, making antagonists of miR-122 a first-in-class antiviral strategy [5–7]. Several functions have been suggested for the HCV/miR-122 interaction: (i) Binding of the AGO/miR-122 complex can protect the uncapped HCV RNA from degradation by cellular exonuclease XRN1 and/or XRN2 [8–10]. (ii) AGO/miR-122 binding can increase HCV internal ribosome entry site (IRES)-driven translation, thus promoting the HCV replication [11]. This process possibly works by switching the IRES from “closed” to “open” conformation [12,13]. (iii) Competition between miR-122 and poly(rC)-binding protein (PCBP2) that binds and circularizes HCV RNA may act as a switch between translation and replication [14]. (iv) In addition, using AGO-CLIP and RNA-seq, we recently showed that HCV RNA can act as a miR-122 “sponge” in a positive feed-back loop to de-repress cellular mRNAs normally targeted by miR-122, thereby indirectly regulating hundreds of genes [15].

Until recently, the miRNA dependence of HCV was considered unique among viruses, even for viruses possessing similar IRESs. However, we recently demonstrated that pestiviruses, such as the important veterinary pathogens bovine viral diarrhea virus (BVDV) and classical swine fever virus (CSFV), similarly are dependent on the cellular miR-17 family, although binding occurs on the viral 3'UTR [16].

The unique GB virus B (GBV-B) isolate was the only known HCV-related hepacivirus until 2011. Using replicon systems, GBV-B appears to be only partially dependent on miR-122 [17]. However, recent discoveries have identified a plethora of HCV-related viruses in horses, rodents, bats, monkeys, and cows [18–25], most if not all of which contain miR-122 seed sites in the 5'UTR. However, the miR-122 requirement has not been investigated for these viruses, as no cell culture systems have been established [24,26].

The equine non-primate hepacivirus (NPHV) shares the highest sequence homology to HCV [18,27]. The genome structure of NPHV resembles HCV, with a long open reading frame (ORF) that can be translated into a 2942 amino acid long polypeptide. The polypeptide is predicted to be cleaved into the ten viral proteins C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B. An IRES structure similar to that for HCV was predicted for the NPHV 5'UTR, but with a much longer stem loop 1 (SL1) structure and only one predicted miR-122 binding site. Using NPHV IRES reporter systems, we previously showed a pro-translational role for miR-122 [28].

Here, we aimed to obtain a broader understanding of hepacivirus miRNA dependence and how this might influence tissue tropism. To understand miR-122 requirements for NPHV, we used AGO-CLIP *in vivo* to pinpoint the miRNA interactome on viral RNA, and developed viable NPHV/HCV 5'UTR chimeras. This approach suggested that NPHV is only partially dependent on miR-122. Encouraged by this result and to determine whether miRNA independent hepaciviruses are viable, we randomized the miRNA seed site of these chimeras and HCV in an attempt to develop miRNA independent viruses. Our results indicated that hepaciviruses have the potential to escape miRNA requirements and break the liver-specific tissue tropism barrier. It appears that such variants must have been sampled during hepacivirus evolution. Interestingly, miR-122 dependence still has been strongly selected, possibly to leverage the tolerogenic liver environment to establish and maintain chronic infection.

Results

NPHV interacts with miRNAs at conserved miR-122 sites *in vivo*

To investigate putative NPHV/miR-122 interactions, we performed AGO-CLIP on liver biopsies from two NPHV infected horses. Although sequence coverage on viral RNA was much lower compared to highly infected HCV cell cultures [15] negating our ability to unambiguously identify interacting miRNAs [16] (Fig 1A), this assay identified regions with AGO/miRNA interactions across the NPHV genome. Interestingly, all significant peaks perfectly overlapped the four conserved miR-122 sites; one in the 5'UTR, one in NS5A and two in NS5B (Fig 1B). These data strongly suggest interaction with miR-122 during NPHV infection *in vivo*.

NPHV/HCV chimeras containing regions of the NPHV 5'UTR can establish replication and virus production in Huh-7.5 cells

To functionally characterize NPHV miR-122 requirements in the absence of a cell culture system supporting NPHV replication, we set out to establish NPHV/HCV chimeras based on the HCV genotype 2a recombinant J6/JFH Clone2 [29]. We constructed four different NPHV/HCV chimeras to test regions of the HCV 5'UTR that could be replaced by NPHV (Fig 2A). Following transfection of these chimeric genomes into Huh-7.5 cells, we assayed viral replication by staining for NS5A positive cells and measured virus production by limiting dilution (TCID₅₀; Fig 2B and 2C). Replacement of the entire 5'UTR or IRES region (NPHV-5'UTR and NPHV-IRES) abolished replication completely, even when followed for 29 days. In contrast, NPHV-SL1 infection spread similarly to the parental HCV construct, although virus production was slightly delayed (Fig 2B and 2C). This indicated that exchange of SL1 had only limited effect on replication efficiency. Although NPHV-SL1/miRBR (microRNA Binding Region) was attenuated, it spread to the majority of cells on day 4 with virus production ~10-fold lower than the parental HCV recombinant (Fig 2B and 2C). Since NPHV-SL1/miRBR contains the miR-122 binding site of NPHV, this chimera was of particular interest

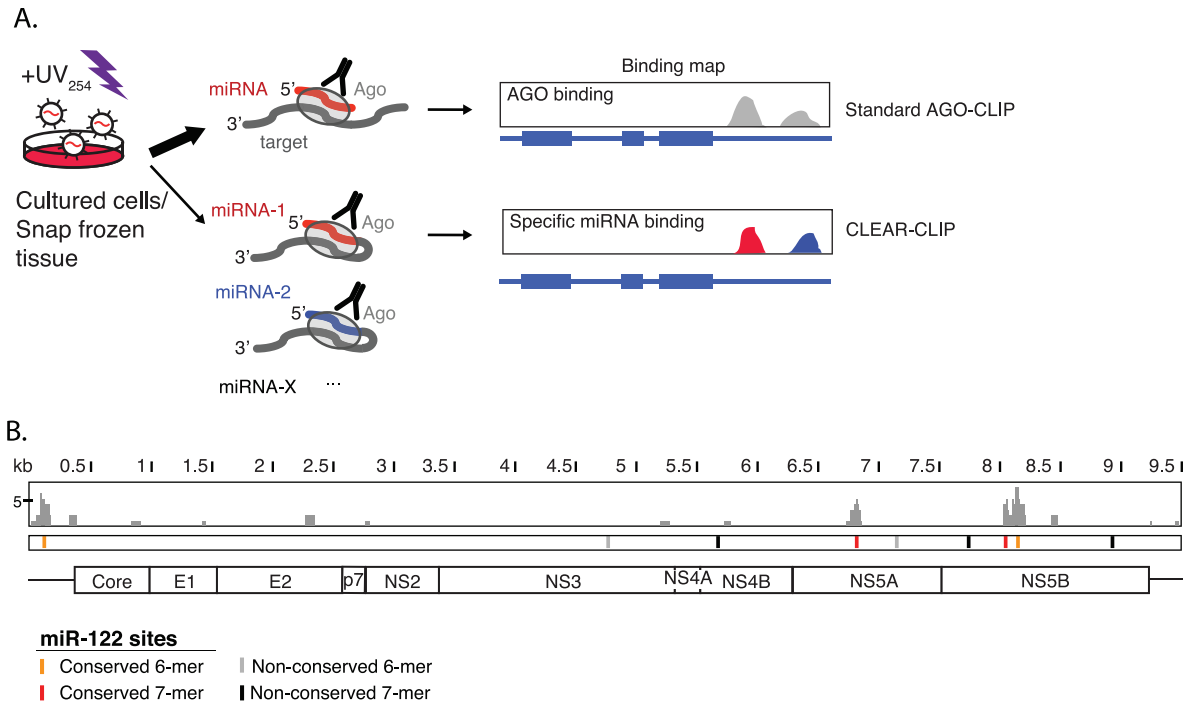


Fig 1. AGO-CLIP provides a miRNA binding map for NPHV *in vivo*. (A) Schematic of standard AGO-CLIP. After UV-induced cross-linking of RNA-protein complexes, precipitation of the AGO complex and RNA library preparation, standard AGO-CLIP provides a map of AGO/miRNA interactions across the transcriptome. In CLEAR-CLIP, chimeras of miRNAs with cellular or viral RNAs are induced. Analysis of these allows unambiguous detection of specific miRNA interactions. (B) *In vivo* AGO/miRNA binding across the NPHV genome from horse liver. Binding is observed across the four miR-122 seed sites conserved among all published isolates. Non-conserved sites present in the NZP1 isolate are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006694.g001>

for studying NPHV miR-122 dependence. We tested the IRES activity of NPHV-5'UTR and NPHV-IRES to distinguish whether the absence of NS5A positive cells was due to block of replication or translation. Compared to HCV, the luciferase signal driven by the NPHV-5'UTR and NPHV-IRES variants was about 3-fold lower, but still much higher than the background (S1 Fig). This suggests that the failure of these viruses to replicate is not due to a block in translation.

A point mutation in the single stranded region of NPHV-SL1/miRBR increases both replication efficiency and virus production

To determine whether the NPHV-SL1/miRBR recombinant could be further adapted, we took supernatant on day 6 after transfection and infected naïve Huh-7.5 cells. Supernatant from newly infected cells was then harvested on day 6 and the 5' end of the viral genome was sequenced. This analysis revealed a C83A mutation in NPHV-SL1/miRBR upstream of the miR-122 site (including putative auxiliary pairing) (Fig 2D). This change did not facilitate binding of a second miR-122 molecule; rather, it changed this region further from mirroring the HCV seed site 1. To confirm the impact of the C83A mutation, we introduced this nucleotide change into the original NPHV-SL1/miRBR genome and again transfected Huh-7.5 cells. The mutant exhibited superior replication and virus production compared to the original NPHV-SL1/miRBR, and was now only slightly attenuated compared to the HCV parent (J6/JFH1-Clone2), as judged by spread of infection and virus yield (Fig 2E and 2F).

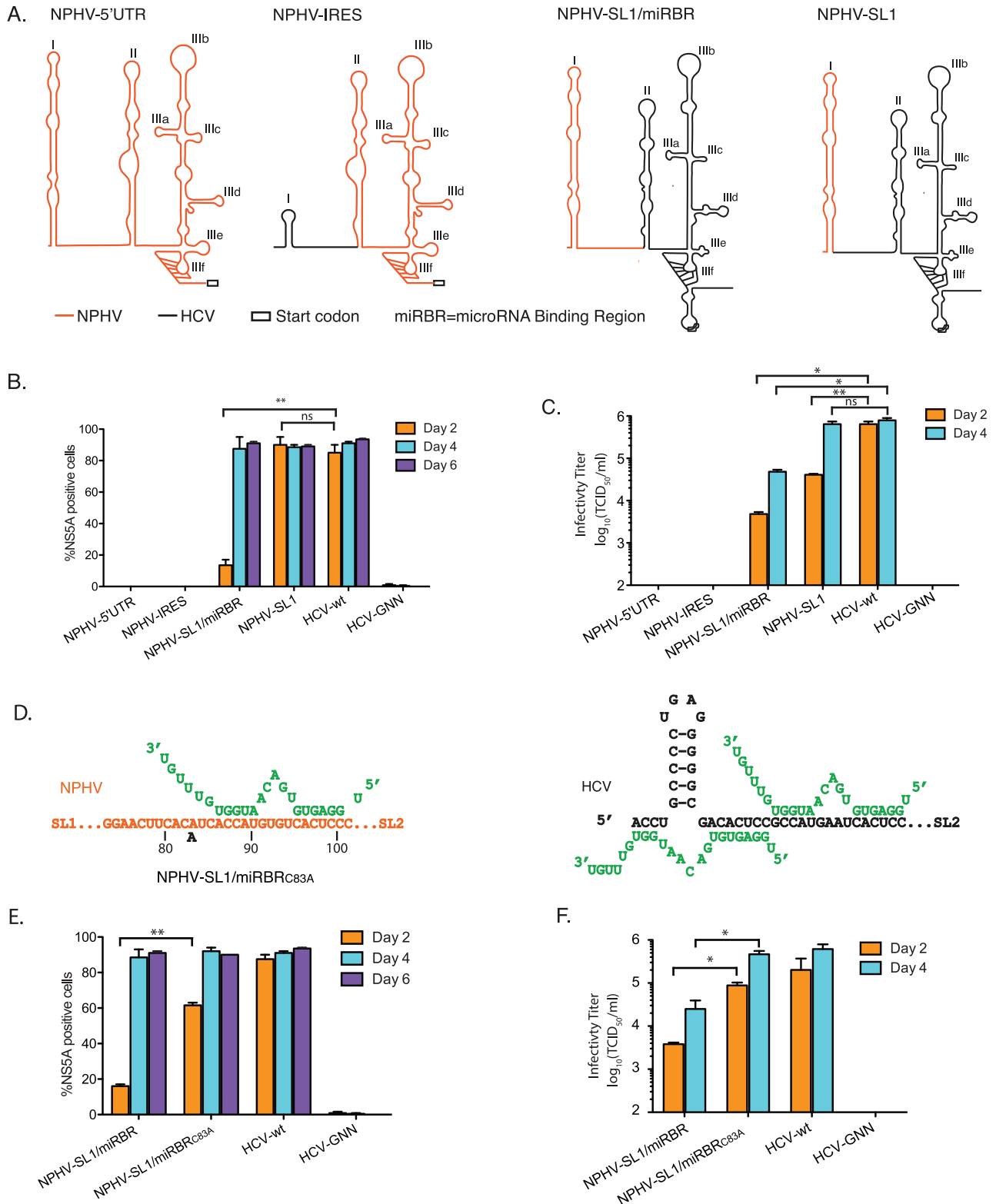


Fig 2. Identification of NPHV/HCV chimeras capable of replication and infectious virus production in Huh-7.5 cells. (A) Schematic showing the secondary structures of 5'UTR regions of HCV/NPHV chimeras that contain the NPHV entire 5'UTR (NPHV-5'UTR), IRES (NPHV-IRES), Stem Loop 1 with microRNA Binding Region (miRBR) (NPHV-SL1/miRBR), or only SL1 (NPHV-SL1). All chimeras were constructed on the HCV J6/JFH Clone 2 backbone. (B,E) NS5A positive cells post transfection of Huh-7.5 cells. Results represent mean

±SEM from 3 independent transfections. (C,F) Infectious virus production quantified by limiting dilution assay on naïve Huh-7.5 cells post transfection (n = 3). (D) Schematic of predicted miR-122 binding modes to NPHV and HCV. The adaptive mutation of NPHV-SL1/miRBR at C83A site is indicated. Asterisks, *p < 0.05, **p < 0.01, Student's t test.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006694.g002>

miR-122 is only partially required for replication and virus production of NPHV/HCV chimeras

Using a CRISPR engineered miR-122 knockout (KO) cell line, we next examined the ability of NPHV-SL1/miRBR to replicate in the complete absence of miR-122. As shown before, HCV replication was dramatically impaired in the miR-122 KO cell line (Fig 3A and 3B; [15]). The number of NS5A positive cells and viral infectivity titers of NPHV-SL1, NPHV-SL1/miRBR and NPHV-SL1/miRBR_{C83A} were also reduced. Nonetheless, replication and virus production for the NPHV/HCV chimeras was evident in cells lacking miR-122 (Fig 3A and 3B). These results indicated that the loss of miR-122 decreased NPHV replication efficiency, but that replication could still occur in complete absence of miR-122.

miR-122 is the sole miRNA that binds to the miRBR in the NPHV 5'UTR

Next, we asked whether miRNAs other than miR-122 bind the NPHV miRBR. To this end, we first replaced the miR-122 binding site of NPHV-SL1/miRBR with a miR-15/16-binding

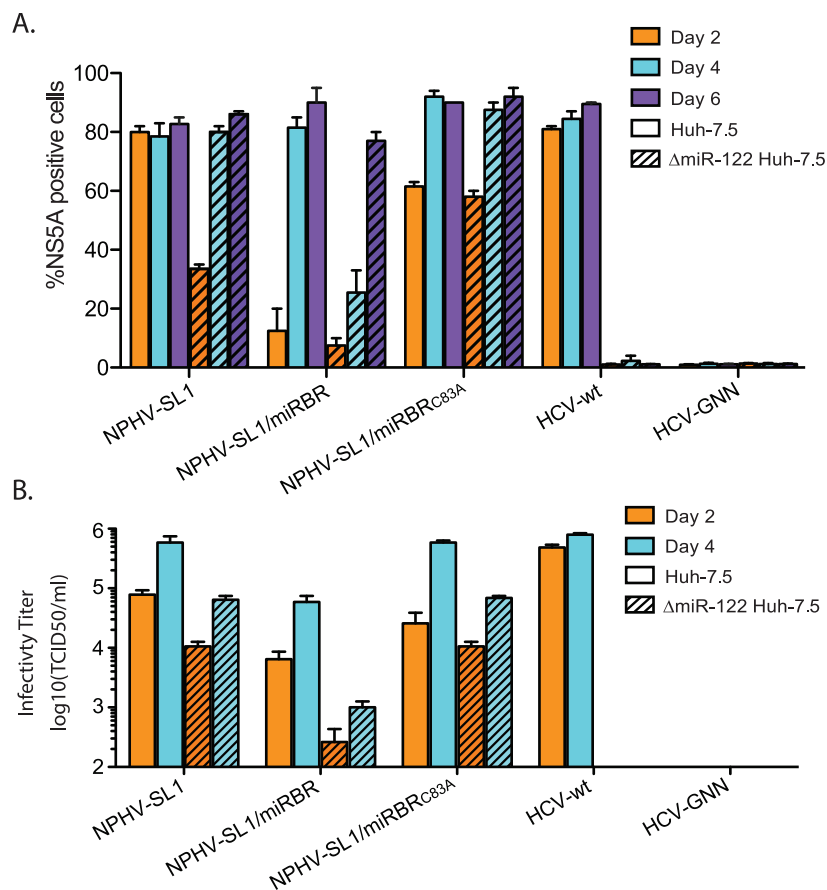


Fig 3. Growth kinetics of wild type HCV and NPHV/HCV chimeras in ΔmiR-122 Huh-7.5 cells. (A) NS5A positive cells post transfection in Huh-7.5 (open bars) and ΔmiR-122 Huh-7.5 cells (hatched bars). Results represent mean±SEM from 3 independent transfections. **(B)** Infectious virus production of supernatants from transfected ΔmiR-122 Huh-7.5 and Huh-7.5 cells. Virus titers were quantified by limiting dilution assay on naïve Huh-7.5 cells (n = 3).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006694.g003>

sequence. Similar to an HCV variant with both miR-122 sites replaced by miR-15 sites [15], this virus was viable (Fig 4A). As expected, the HCV and NPHV-SL1/miRBR miR-15 variants were unaffected by the absence of miR-122 (Fig 4A). We then used AGO-CLIP and miRNA-target chimeras [16,30] to unambiguously identify interacting miRNAs in wt Huh-7.5 cells. For NPHV-SL1/miRBR and NPHV-SL1/miRBR-15, miR-122 and miR-15/16, respectively, were the only interacting miRNA species (Fig 4B). This confirmed that no other functional miR-122 site than the single canonical site exists in the NPHV miRBR, and that no other miRNA is binding this region.

Isolation of miR-122 independent HCV and NPHV/HCV variants

Given the only partial NPHV miR-122 dependence, we next probed whether miRNA independent hepaciviruses with extrahepatic replication potential could be selected. We exploited the rapid evolutionary capacity of RNA viruses to select for variants with high fitness in the presence (Huh-7.5) or absence (Δ miR-122 Huh-7.5) of miR-122. To increase input diversity, we randomized the miR-122 binding site of NPHV-SL1/miRBR to create NPHV-Rand. In parallel, we randomized the corresponding seed site 2 of HCV to create HCV-Rand (Fig 5A). To enrich for the most efficient variants, we took the supernatant of transfected cells when at least 50% of cells were NS5A positive to inoculate naïve cells (Fig 5A and 5B). After three passages, we sequenced the 5'UTR of the selected viruses in the supernatant. For HCV-Rand in Huh-7.5 cells, the majority (67%) contained the wildtype miR-122 binding site, whereas the rest (33%) contained the miR-15 binding site. Interestingly, the latter variant was identical to a synthetic miR-122/15 construct we previously showed to be viable [15]. In Δ miR-122 Huh-7.5 cells, most recovered variants contained a G-rich region; among them 66% had the sequence GGCGNG. Similarly, most recovered NPHV-Rand variants from wild type cells contained the wild type miR-122 binding site. These had also acquired the previously described C83A mutation. Surprisingly, 30% of the recovered strains had a 15-nucleotide deletion in the miRBR region (NPHV-delta-UUGGCG). In Δ miR-122 Huh-7.5 cells, 73% of the recovered NPHV variants had another G-rich GGYAGG motif. One variant from each group was selected for further characterization (Fig 5C, boxed names).

Randomized, selected HCV and NPHV/HCV chimeras replicate in the absence of any miRNAs

We next engineered the selected sequences into the original viral genomes and tested their replicative fitness in Huh-7.5 and Δ miR-122 Huh-7.5 cells. For comparison, we also included HCV-U3 in our analysis since this virus, which contains a fraction of the cellular U3 snoRNA sequence in place of the SL1 region, replicates in the absence of miR-122 [31]. Similar to HCV-U3, the selected variants HCV-S2-GGCGUG, NPHV-delta-UUGGCG and NPHV-GGCAGG all replicated comparably in the presence or absence of miR-122 (Fig 6A). The NPHV-based variants, however, were the most fit. HCV-122/15 replicated and spread comparably to parental HCV in Huh-7.5 cells, but was attenuated in the absence of miR-122. Thus, it appears that the selected NPHV-Rand variants in particular, could replicate with equal efficiency in the absence or presence of miR-122.

The sequences of the selected G-rich random variants did not correspond to known canonical miRNA seed sites. We therefore examined the ability of these variants to replicate in the complete absence of miRNAs. Using CRISPR mutagenesis we ablated DICER to produce Δ DICER Huh-7.5 cells. Given the critical role for DICER in cleaving pre-miRNAs [32,33], no mature miRNAs are produced in these cells. As expected, parental HCV and HCV-122/15 were not viable in Δ DICER Huh-7.5 cells (Fig 6B). Co-transfection of a synthetic miR-122

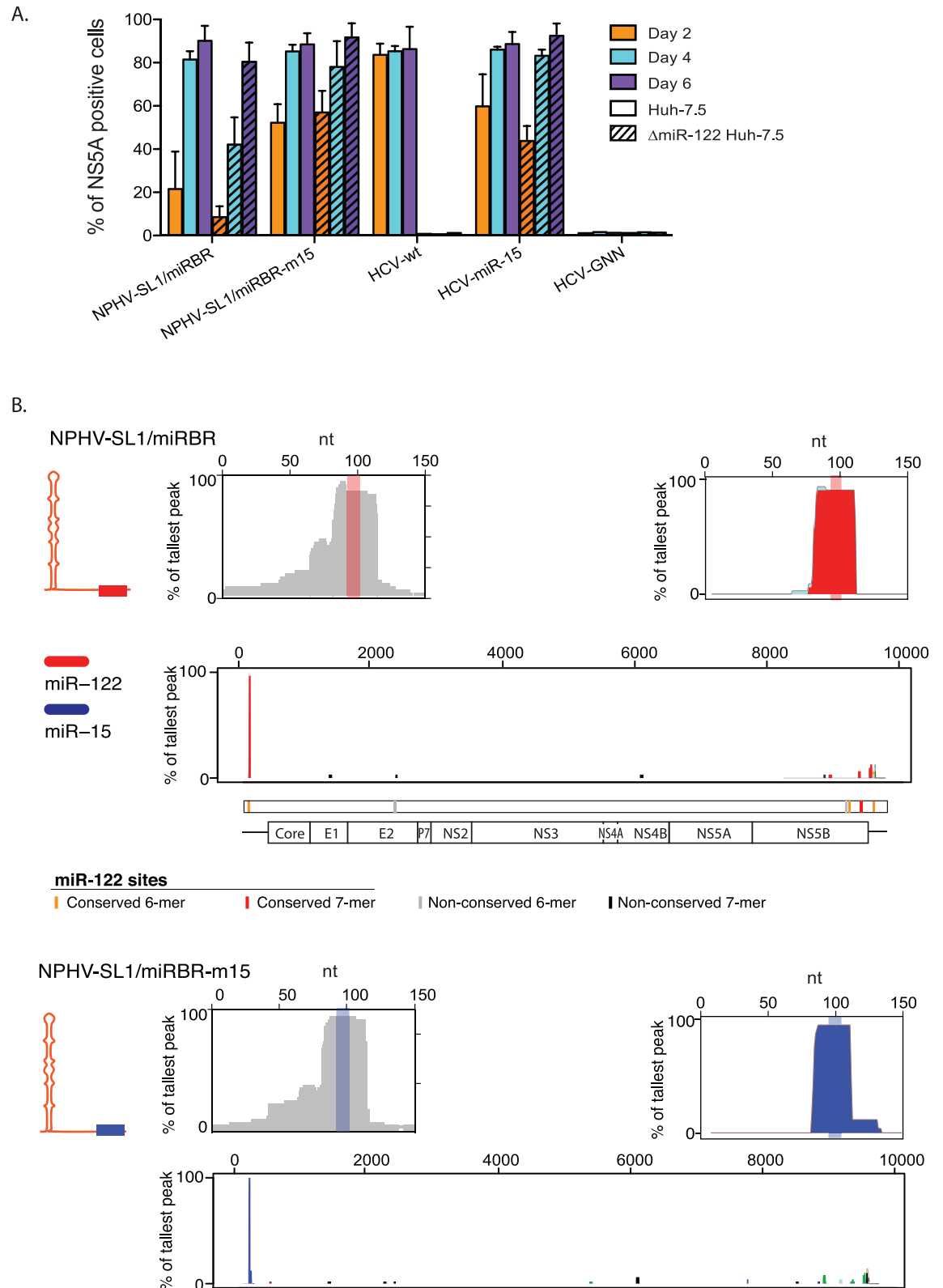


Fig 4. miR-122 but not other miRNAs binds the NPHV 5'UTR. (A) Percentage of NS5A positive Δ miR-122 Huh-7.5 or Huh-7.5 cells post-transfection with the indicated virus constructs. Results represent mean \pm SEM from 3 independent transfections. (B) Standard AGO (left) and miRNA-specific chimera-derived (right) binding maps on the 5' end of NPHV-SL1/miRBR (top) and NPHV-SL1/miRBR-m15 (bottom) in Huh-7.5 cells four days post-transfection. Chimera-

supported specific miRNA binding across the entire viral genome is shown below for both panels. The binding site and chimera-supported interactions for miR-122 are shown in red and those of miR-15 in blue.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006694.g004>

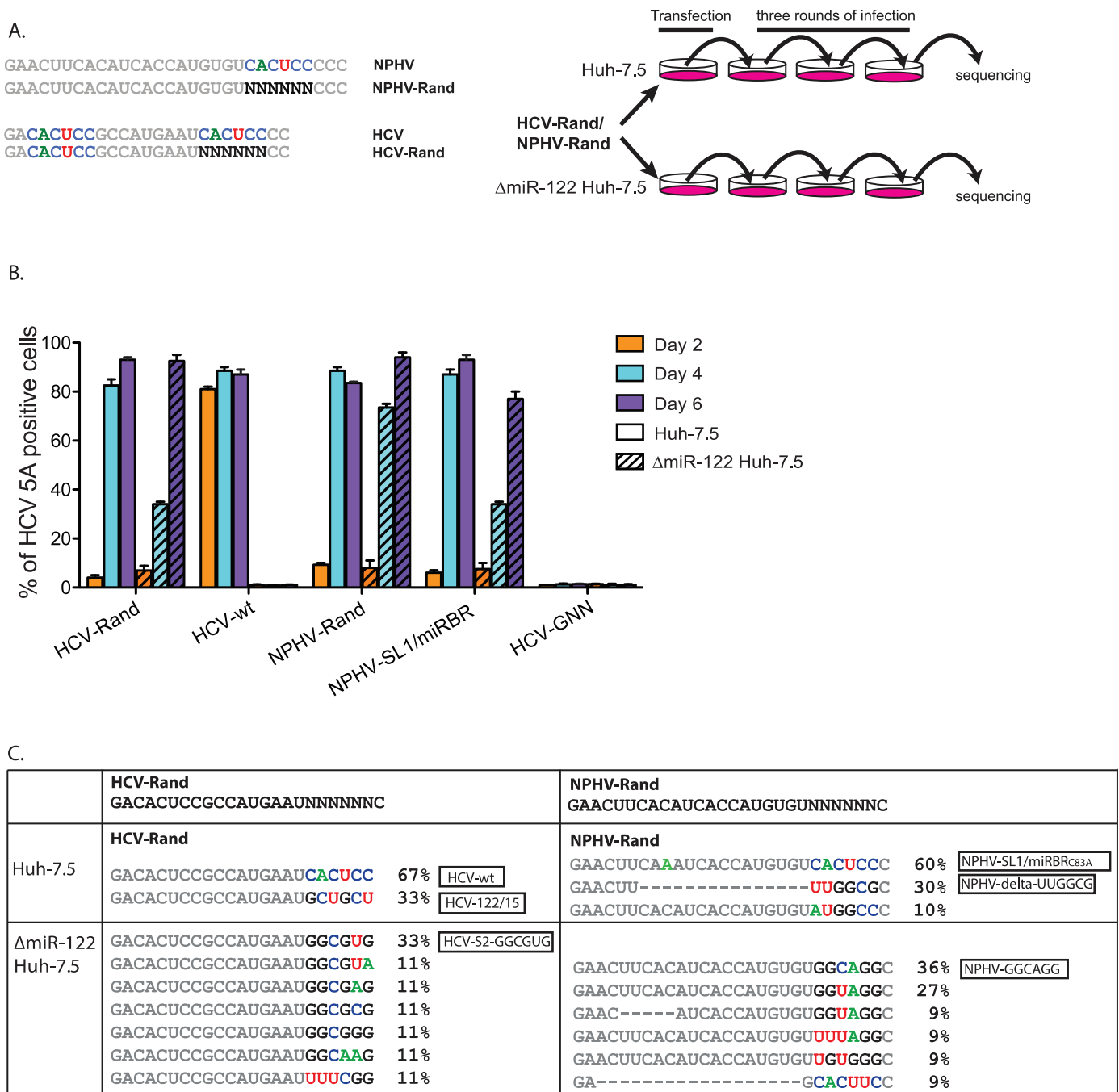


Fig 5. Evolutionary selection of seed site-randomized HCV and NPHV/HCV chimeras. (A) Schematic of the saturated mutagenesis approach. Left panel: comparison of NPHV-Rand and HCV-Rand sequence with the parental strains. miRNA binding sites are shown in color. Right panel: ΔmiR-122 Huh-7.5 cells and Huh-7.5 cells were transfected by NPHV-Rand or HCV-Rand, supernatants were collected and used to inoculate naïve cells of the same type. After three rounds of infection, the miRBR sites of enriched strains were sequenced. (B) Percentage of NS5A positive cells post-transfection in ΔmiR-122 Huh-7.5 and Huh-7.5 cells. Results represent mean±SEM from 3 independent transfections. (C) Summary of miRBR region sequences for NPHV-Rand and HCV-Rand enriched in ΔmiR-122 Huh-7.5 cells or Huh-7.5 cells. Residues of NPHV-SL1-miRBR and HCV corresponding to the miR-122 seed site are shown in color (C is shown in blue, A in green, G in black, and U in red). The isolates selected for follow-up reverse genetic studies are highlighted by boxed names.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006694.g005>

mimic (Fig 6B) rescued HCV and partially rescued HCV-122/15. In contrast, NPHV-SL1/miRBR_{C83A} and HCV-S2-GGCGUG replication was only slightly enhanced by miR-122 addition and NPHV-delta-UUGGCG and NPHV-GGCAGG spread with similar efficiency with or without miR-122.

To further confirm the absence of miRNA binding for these viruses, we performed AGO-CLIP of NPHV-delta-UUGGCG in ΔDICER Huh-7.5 cells compared to HCV and NPHV-SL1/miRBR_{C83A}. As expected, replication and miRNA binding was observed for HCV only after addition of miR-122 (Fig 6C). The same result was found for NPHV-SL1/miRBR_{C83A} despite replication in miRNA deficient cells. No AGO/miRNA binding was observed for NPHV-delta-UUGGCG. These data prove that these selected NPHV/HCV variants can replicate in the complete absence of mature miRNAs. To determine whether miR-122 independent NPHV variants depend on miR-122 for RNA 5' end protection, we measured the RNA stability of HCV, NPHV-SL1/miRBR, NPHV-SL1/miRBR_{C83A}, and NPHV-GGCAGG in ΔmiR-122 Huh-7.5 cells. miR-122 but not miR-430 supplementation enhanced RNA stability, but only for miR-122 dependent variants (Fig 6D). Thus, although NPHV has a much larger SL1 structure, NPHV may still utilize miR-122 to enhance protection of the RNA from degradation. NPHV-GGCAGG, however, apparently does not need miRNA binding to protect its RNA against 5' degradation.

miR-122 independent NPHV/HCV variants but not those of HCV can replicate in extrahepatic cells

miR-122 is expressed in Huh-7.5 cells [2], and reports showed that exogenous expression of miR-122 can facilitate efficient replication of HCV in other hepatic cell lines such as Hep3B and HepG2. Low-level replication was also observed in non-hepatic cells, including 293T kidney cells or engineered immortalized mouse fibroblasts (iMEF) [34–37]. We therefore tested whether the selected miR-122 independent strains could replicate in non-hepatic cells. As expected, HCV did not replicate in 293T cells (Fig 7A). In contrast, NS5A positive cells were observed for NPHV-SL1, NPHV-SL1/miRBR_{C83A} and HCV-S2-GGCGUG, although at very low frequencies. NPHV-delta-UUGGCG and NPHV-GGCAGG infected 2–5% of the cells similar to the frequency of HCV replication in these cells upon miR-122 addition. NPHV-delta-UUGGCG replication in 293T cells was completely abolished after addition of Daclatasvir, a potent NS5A inhibitor [38], thus confirming its authentic replication in 293T cells (Fig 7B).

ApoE is an essential factor for infectious HCV production, including in miR-122-supplemented 293T cells [39]. We therefore asked whether infectious particles could be produced in the presence of exogenous ApoE. In 293T cells transduced with a lentivirus expressing RFP-ApoE, low levels of infectious particles were produced by NPHV-delta-UUGGCG, but not by HCV, HCV-S2-GGCGUG or NPHV-GGCAGG, transfected cells (Fig 7C). No virus production was observed without ApoE expression. Despite the highly attenuated particle production in 293T-ApoE compared to Huh-7.5 cells, this proved that miRNA independent NPHV/HCV chimeras could replicate and produce infectious progeny in non-hepatic cells.

Discussion

miR-122 has attracted great interest as a host requirement for HCV replication and hence a potential antiviral target. Blocking miR-122 leads to prolonged viral inhibition in cell culture, chimpanzees, and patients [5–7]. In addition, due to their long-lasting effects, miR-122 inhibitors are currently being considered for special patient populations where adherence to strict daily therapeutic regimens is problematic [40]. Therefore, it remains important to understand the miR-122 requirement of HCV and to study resistant variants that can replicate in miR-122 depleted environments. Furthermore, both the requirement of a host miRNA for an RNA

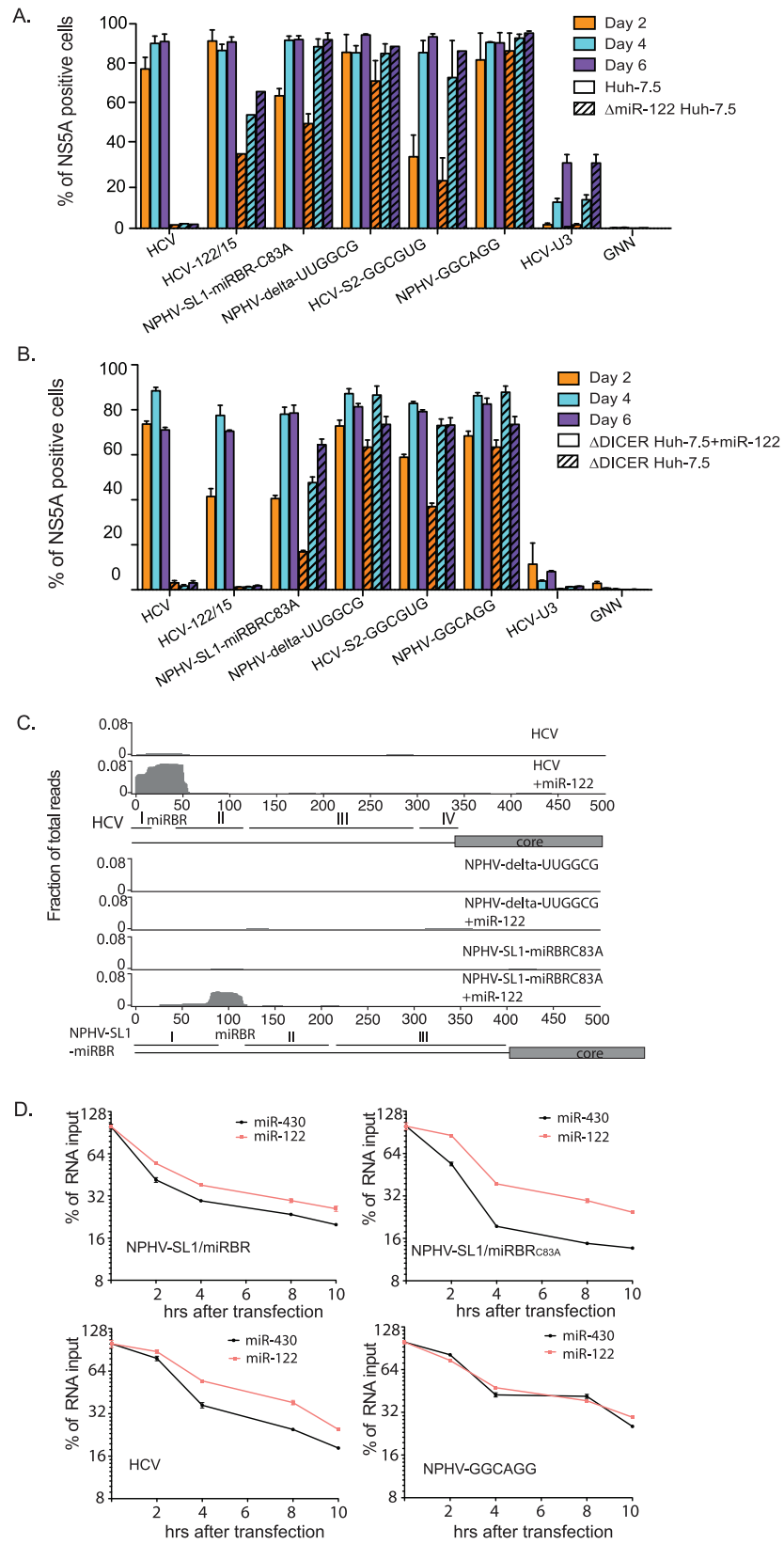


Fig 6. Evolutionary-selected NPHV/HCV variants replicate in the absence of any miRNA. (A)

Percentage of NS5A positive Δ miR-122 Huh-7.5 or Huh-7.5 cells post-transfection with the indicated viral constructs. Results represent mean \pm SEM from 3 independent transfections. **(B)** Percentage of NS5A positive Δ DICER Huh-7.5 cells post-transfection with the indicated viral constructs with (open bars) or without (hatched bars) co-transfection of miR-122. Results represent mean \pm SEM from 3 independent transfections. **(C)** AGO-CLIP binding maps for HCV (top), NPHV-delta-UUGGCG (middle) and NPHV-SL1/miRBR_{C83A} (bottom) in Δ DICER Huh-7.5 cells 72hrs post-transfection with and without co-transfection of miR-122. Schematics of the 5'UTRs and initial core regions of HCV and NPHV are shown below. **(D)** Effect of miR-122 on HCV and NPHV/HCV RNA stability. RNA decay in Δ DICER Huh-7.5 cells was measured at the indicated times post-transfection in the presence of either miR-122 or miR-430 (50 μ M each). RNA copy number at each time point was normalized to RNA copy number at 0hr (after transfection). The data is representative of 2 independent biological experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006694.g006>

virus, and the non-classical binding of miR-122 to the HCV 5'UTR are unique. We still have an incomplete understanding of how this interaction evolved and its biological importance.

NPHV is the closest homolog of HCV, making it an interesting comparative model. Understanding NPHV is also relevant given its possible association with equine liver disease [26,41]. Whereas all HCV genotypes have two conserved miR-122 binding sites, both being essential for replication [2,3], only one binding site was predicted for NPHV [18,19]. The length of the NPHV miRBR is comparable to that of HCV, raising the question whether a second miR-122 molecule binds in a non-canonical manner or, alternatively, a different miRNA binds this region. Our *in vivo* NPHV AGO-CLIP studies confirmed miRNA binding across the miR-122 site. We therefore took advantage of replication-competent NPHV/HCV chimeras engineered to contain parts of the NPHV 5'UTR. NPHV-SL1/miRBR was of particular interest, since it contains the NPHV miR-122 binding site. Although NPHV-SL1/miRBR had partially attenuated kinetics of viral protein accumulation and infectious virus production, more fit variants including NPHV-SL1/miRBR_{C83A}, NPHV-delta-UUGGCG, and NPHV-GGCAGG could be readily selected in cell culture.

In our previous studies, we demonstrated that HCV miR-122 tropism could be replaced by other miRNAs, such as miR-15 [15]. It was therefore possible that the increased fitness of NPHV-SL1/miRBR_{C83A}, NPHV-delta-UUGGCG, and NPHV-GGCAGG was acquired by binding to alternative miRNAs. However, we found that NPHV-SL1/miRBR_{C83A} bound only one molecule of miR-122, and neither NPHV-delta-UUGGCG nor NPHV-GGCAGG bound any miRNA. This was based on two observations: First, in contrast to HCV-m15, which could not replicate in Δ Drosha Huh-7.5 cells supplemented with miR-122 [15], NPHV-SL1/miRBR_{C83A} was not attenuated in Δ DICER Huh-7.5 cells supplemented with miR-122 compared to wt Huh-7.5 cells. The NPHV-delta-UUGGCG and NPHV-GGCAGG variants were not attenuated in Δ DICER Huh-7.5 cells or in Δ miR-122 Huh-7.5 cells (Fig 6A and 6B). Second, miR-122 and miR-15, respectively, were the only miRNAs identified from AGO-CLIP chimeras at the miRBR region of NPHV-SL1/miRBR_{C83A} and NPHV-SL1/miRBR-m15. This was in contrast to the identification of two independent peaks for miR-15 and miR-122 for HCV122/15 and HCV15/122 [16]. Furthermore, no miRNA peak could be observed for NPHV-delta-UUGGCG, even after addition of miR-122 (Fig 6C). Taken together these results strongly suggest that newly adapted NPHV/HCV variants do not bind any other miRNA. The cell culture selected HCV-U3 variant, which is resistant to miR-122 inhibition [31], contains a large extended SL1 and only one miR-122 site. This 5'UTR is therefore structurally similar to NPHV. A larger 5'-terminal SL1 may at least partially compensate for miR-122 binding, possibly by preventing degradation by exonucleases. This suggests that it is possible to replace one miR-122 seed site and obviate miR-122 dependence (at least in part) by combining a larger SL1 with sequence changes in the miRBR region.

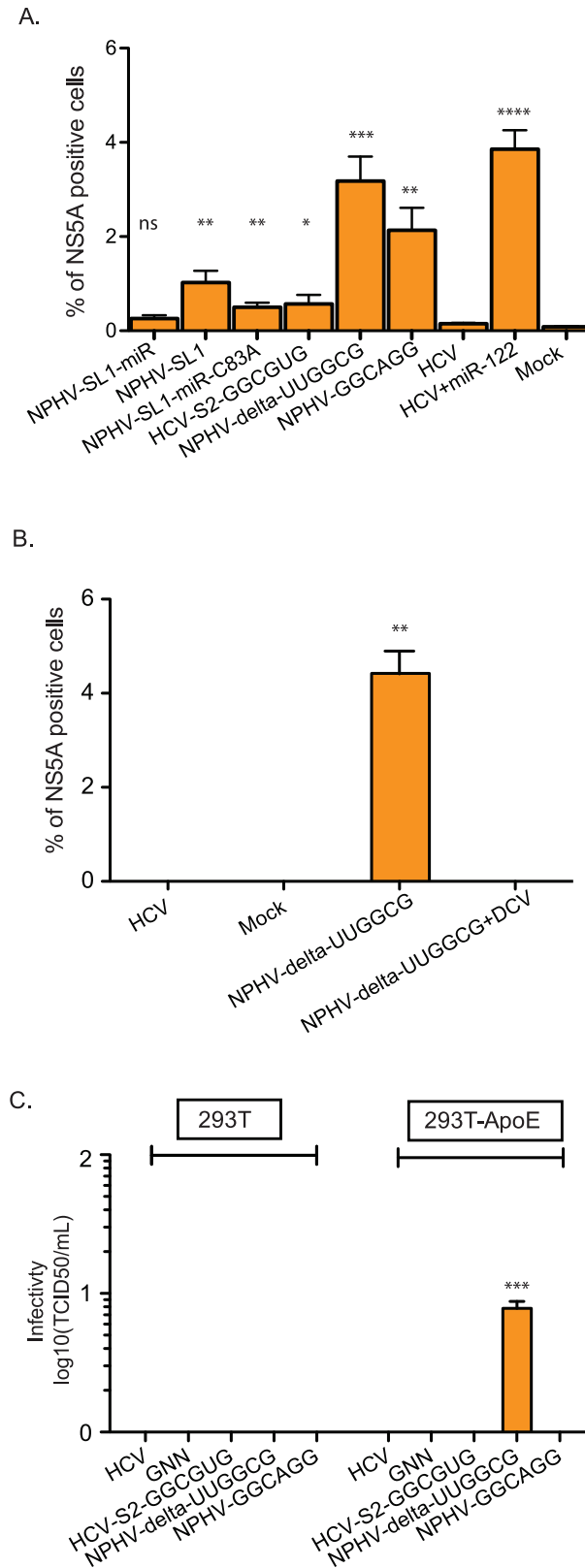


Fig 7. Evolutionary selected NPHV/HCV variants can replicate and produce infectious particles in non-hepatic cells. (A) Quantification of NS5A positive cells on day 2 post-transfection of 293T cells with HCV

and NPHV/HCV variants. **(B)** Quantification of NS5A positive 293T cells post-transfection as in (A) but compared to a daclatasvir (DCV) treated culture. **(C)** Infectious virus production from 293T cells with or without exogenous ApoE expression. Virus titers were quantified by limiting dilution assay on naïve Huh-7.5 cells. In (A)-(C), results represent mean±SEM from 3–6 independent experiments. Asterisks, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, ******p* < 0.00001, Student's *t* test.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006694.g007>

It is interesting to speculate why HCV requires two molecules of miR-122, whereas related hepaciviruses such as NPHV, require only one. From the current and previous studies, it is evident that HCV replication is attenuated if only one copy of miR-122 is bound. This includes mutants of individual seed sites [2,4,11,15,42] and the current study of HCV-S2-GGCGUG in Huh-7.5 cells and HCV-122/15 in ΔmiR-122 Huh-7.5 cells. Interestingly, the C83A mutation of NPHV-SL1/miRBR may induce a conformational change in the miRBR region to a more relaxed structure (S2A and S2B Fig). Although it is tempting to speculate that this more relaxed RNA structure might facilitate miR-122 access to the miRBR region, e.g. by providing access to auxiliary pairing with the ACC motif at nt 87–89, the C83A mutation also facilitated more efficient infection kinetics in the absence of miR-122 (Fig 3A and 3B), indicating that mechanisms beyond miR-122 engagement may be at play. HCV, HCV_{G28A} from a previous study [42], NHPV-delta-UUGGCG, (S1D–S1F Fig), but not NPHV-GGCAGGG or HCV-S2-GGCGUG (S1C and S1G Fig) have similar relaxed structures, suggesting that these predicted secondary structures of miRBR do not necessarily correlate with miR-122 dependency. We identified NPHV-SL1/miRBR variants that are either partially or completely independent of miR-122 yet we could not identify any completely independent HCV-based variants, presumably because seed site 1 of HCV was still intact (Fig 6A). Interestingly, NPHV-delta-UUGGCG, but not HCV variants, could produce infectious viruses in 293T kidney cells expressing ApoE (Fig 7C). Since miR-122 is liver specific and remains an important factor for HCV tropism, the fact that NPHV only requires one molecule of miR-122 could lower the threshold for NPHV to infect other organs. However, except for sporadic evidence of extrahepatic presence of NPHV [18,41], it remains to be determined if replication occurs in other tissues *in vivo*. Still it remains feasible that low-level replication outside the liver could occur and influence the course of disease or transmission between hosts.

It was striking, but not surprising, that the fittest HCV variant emerging from our saturation mutagenesis library in wild type Huh-7.5 cells carried the wild type seed sites. This confirms that in the Huh-7.5 environment miR-122 binding HCV is indeed the optimal variant (Fig 5C). Another interesting finding was that HCV-122/15, which we previously predicted and confirmed to be viable, was also selected in Huh-7.5 cells. HCV therefore appears to function most efficiently with two miRNA seed sites. While miR-122 could be substituted by other miRNAs, HCV with two miR-122 sites remains superior. In contrast, NPHV either acquired the wild type miR-122 site in combination with an adaptive mutation (NPHV-SL1/miRBR_{C83A}) or carried a 15-nt truncation (NPHV-delta-UUGGCG) in the miRBR. Thus, miR-122 binding NPHV variants were also selected as long as miR-122 was available.

We were able to isolate NPHV and HCV variants in the ΔmiR-122 Huh-7.5 cells with similar efficiency (Fig 6A). This makes it likely that during hepacivirus evolution miR-122-independent variants have emerged. It is therefore curious why most hepaciviruses isolated thus far retain at least one miR-122 binding site and hence hepatocyte tropism. Clearly, basic replicative functions can ensue in the absence of miR-122 using alternative 5'UTR structures and/or binding sites for different miRNAs. We therefore speculate that sampling of hepaciviruses in nature has been biased to those that can establish chronic infection in their animal hosts. Retaining miR-122 dependence and restricting replication to hepatocytes may allow these viruses to take advantage of the tolerogenic liver environment [43,44] to establish and

maintain chronicity. Variants with the ability to replicate in other cell types might be selected against if they elicit an adaptive immune response that eliminates infection and prevents chronicity. Consequently, we posit that there may be hepaciviruses in nature that are not strictly hepatotropic and that these viruses will be more likely to cause acute resolving infections with different modes of transmission to ensure their survival.

Besides the interaction of miR-122 with the 5'UTR of NPHV, our *in vivo* AGO-CLIP studies demonstrated miRNA binding at all three other conserved miR-122 sites in the NPHV polyprotein coding region (Fig 1B). Unfortunately, we lack the cell culture systems needed to assess the potential contributions of miRNA binding at these NS5A/5B sites. Thus, it remains possible that these sites also contribute towards NPHV miR-122 dependence. For HCV, however, miR-122 sites in the ORF and 3'UTR do not appear to influence viral replication and/or production [15,45]. It will be interesting to explore this further using infectious clones *in vivo*, or after the development of tractable NPHV culture systems [28].

In conclusion, using a panel of NPHV/HCV chimeras, we were able to test the miRNA dependence of NPHV in cell culture. We demonstrate that one molecule of miR-122 is the only miRNA that binds the NPHV miRBR region, consistent with our *in vivo* data. Using NPHV/HCV chimeras, miR-122 independent variants could be selected that were capable of extra-hepatic replication. This indicates that the interaction of one molecule of miR-122 with the NPHV miRBR does contribute to its hepatic tropism but that subtle changes in the NPHV 5'UTR have higher potential to break the tissue tropism barrier as compared to HCV. Given that most hepaciviruses observed in nature contain at least one miR-122 binding site despite the fact that minor changes in the miRBR can weaken or even obviate miR-122 dependence indicates a strong selective pressure to maintain hepatotropism. We suggest that this selective force is not for basic hepacivirus replicative functions but rather to exploit the tolerogenic liver environment to orchestrate chronicity.

Materials and methods

Ethics statement

We used NPHV infected liver biopsies from two horses. This did not require euthanasia of any animal. Ultrasound-guided percutaneous biopsies were taken from horses, using standard procedures at the College of Veterinary Medicine, Cornell University and adhered to the Institutional Animal Care and Use Committee protocol at this institution.

Construction of NPHV plasmids

NPHV-5'UTR, NPHV-IRES, NPHV-SL1/miRBR, and NPHV-SL1 were constructed in the HCV J6/JFH Clone2 backbone [29], by replacing the 5'UTR (nt 1–341), IRES (43–341), SL1-miRBR (1–42), or SL1 (1–20) of HCV by the corresponding sequence of the 5'UTR (1–384), IRES(103–384), SL1-miRBR (1–102) or SL1(1–74) of the NZP1 NPHV isolate [28]. HCV-122/15 and HCV-S2-GGCGUG were constructed by replacing seed site 2 of HCV (37–42) with the miR-15 binding site (GCTGCT) or GGCGTG, respectively. SL1-miRBR_{C83A}, NPHV-GGCAGG, and NPHV-delta-UUGGCG were constructed from NPHV-SL1/miRBR by introducing single mutations or exchanging the miRBR site (also see Fig 5C). NPHV-SL1/miRBR-m15 was constructed by replacing the miR-122 binding site at position of 96–101 of NPHV-SL1/miRBR with the miR-15 binding site (GCTGCT). For TRIP-hApoE3shres-TagRPF, the cDNA clone of human apolipoprotein E (NM_001302691) was amplified from Huh-7.5 cDNA using the primers RU-O-19451 and RU-O-19452 that contains MluI and BamHI sites. This was then cloned into pDONOR221 (Fisher Scientific), which was linearized by the same pair of endonucleases. All primer sequences are listed in S1 Table.

Cell culture

Huh-7.5 [46] and Δ miR-122 Huh-7.5 hepatoma cells [15], derived previously in our laboratory, were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 0.1 mM nonessential amino acids (Invitrogen) and 5% fetal bovine serum (FBS). 293T cells (ATCC) were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 0.1 mM NEAA as described [47]. Δ DICER Huh-7.5 hepatoma cells were generated as described below and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 0.1 mM NEAA. To produce 293T-ApoE, 293T cells were transduced with lentiviruses produced from pTRIP-hApoE3shres-TagRFP in a 293T producer culture, as previously described [37]. Efficiency of transduction was confirmed by the percentage of RFP positive cells before further analysis. Three different 293T cell lines derived from single colonies of 293T cells were tested to confirm the consistent observation of NS5A positive cells with NPHV-delta-UUGGCG. For Daclatasvir (DCV) treatment, 293T cells were pre-incubated with 10 nM of DCV (100-fold EC_{50} [48]) one day before transfection with viral RNA.

CRISPR mediated deletion of DICER in Huh-7.5 cells

To make Δ DICER Huh-7.5 cells, we deleted exons 2 and 19 in the DICER gene in Huh-7.5 cells described above. Guide sequence pairings were as follows: Dicer.sgRNAEX2.1a with Dicer.sgRNAEX2.1b, Dicer.sgRNAEX2.2a with Dicer.sgRNAEX2.2b, Dicer.sgRNAEX19.1a with Dicer.sgRNAEX19.1b, and Dicer.sgRNAEX19.2a with Dicer.sgRNAEX19.2b. Guide RNAs were cloned into pX458-SpCas9-(BB)-2A-GFP (Addgene, #48138). After sequence confirmation, transfection and single cell dilution, cloning proceeded as previously described [15]. To genotype single cell clones and to approximate editing efficiency in bulk cells, DNA was extracted using QuickExtract (Epicenter) and DICER exon 2 and 19 loci were PCR amplified using primers DicerEX2_GenomicF with DicerEX2_GenomicR, and DicerEX19_GenomicF with DicerEX19_GenomicR, respectively. The resulting PCR products underwent gel electrophoresis. The sole surviving homozygous deletion clone was expanded.

In vitro transcription and RNA transfection

NPHV/HCV and HCV recombinant RNAs were *in vitro* transcribed from *Xba*I linearized DNA plasmids using T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega). RNA was treated with RQ1 DNase (Promega) at 37°C for 15 min and purified on RNeasy columns (Qiagen).

For transfection of Huh-7.5 based cell lines, 1 μ g RNA was mixed with 5 μ L Lipofectamine 2000 (Life Technologies) in 500 μ L OptiMEM, incubated 10 min and added to 3.5×10^5 cells in 6-well plates where media was changed to DMEM containing 1.5% FBS and 1% NEAA before transfection. For transfection of 293T-based cell lines, transfection was performed with 5×10^5 cells. 10 pmol of miR-122 was co-transfected with viral RNAs where indicated. To increase the transfection efficiency, cells were then spinoculated for 30 min at 37°C with 1000 g. Cells were split every 2 days, 1/3 of cells were seeded for the next time point, 2/3 of cells were pelleted, fixed with 2% PFA, and used for flow cytometry detection of HCV NS5A expression by staining with the 9E10 antibody conjugated with Alexa 647. Supernatant aliquots were stored at -80°C for virus titration assays ($TCID_{50}$). HCV infectious titers were determined by a limiting dilution assay on naïve Huh-7.5 cells as previously described [49].

Saturated mutagenesis assay

To generate saturated libraries of NPHV-Rand and HCV-Rand containing all possible combinations of nucleotides in the randomized region, we constructed bacterial transformation

libraries with at least 10 times more colonies than the combination of all possible nucleotides ($4^6 = 4096$). Briefly, we introduced randomized seed sites into NPHV-SL1/miRBR and HCV by PCR with RU-O-21135 and RU-O-17131 or RU-O-21134 and RU-O-17131, respectively. After restriction digest with *NotI* and *KpnI*, the PCR product was ligated into the parental plasmid and transformed into DH10B with electroporation transformation. After transformation, cells were revived in 500 μ l SOC medium. 2 μ l were spread on P10 LB medium to count colonies. To minimize potential bias of bacterial growth, bacteria were spread onto 2xP500 LB plates. After overnight incubation, cells were scraped into 20 ml LB medium and plasmids were purified with Plasmid Maxi-prep kit (Qiagen) without further expansion.

Sequencing of viral RNA from supernatants

For selected viruses, as indicated in the main text and figures, the 5'UTRs of viruses present in the supernatant was sequenced using 5'RACE according to manufacturers protocol (Invitrogen). The primer RU-O-17102 was used for reverse transcription and RU-17104 and RU-18654 for the subsequent 1st and 2nd PCRs, respectively. PCR products were then cloned into TOPO-TA vectors (Invitrogen) for sequencing. Corresponding plasmids were included in the same procedure as negative control.

CLIP assay

Standard AGO-CLIP was done as described [50]. To enable cost-effective multiplexing, we added sequencing adapters and 5' indices in the 2nd PCR step using the primers listed in [S1 Table](#). This strategy uses the DP5 and DP3 sequences of the 1st PCR product as priming sites to add 5' indices and 3' adapters for a short (6–16 cycles) 2nd PCR step.

CLEAR-CLIP is based on standard AGO-CLIP with modifications to enrich for miRNA-target chimeras [30]. Briefly, the following procedures replace the post-immunoprecipitation steps of standard AGO-CLIP: (i) 5'-end phosphorylation using PNK (3' phosphatase minus), (ii) Over-night chimera ligation using T4 RNA ligase 1, (iii) Alkaline phosphatase treatment to remove 3' phosphate groups, (iv) 3'-linker ligation using truncated T4 RNA ligase 2 and pre-adenylated linker (using a pre-adenylated linker and omitting the enzyme in step ii allows negative controls to distinguish cellular vs. on-bead ligation events), and (v) Radio labeling using T4 PNK and [γ -³²P]-ATP. Here, the ligase-free controls used to establish the method [30] were not needed, and the 3' linker ligation was therefore done with T4 RNA ligase 1 and a radioactively labeled phosphorylated RNA linker according to the standard AGO-CLIP protocol [50], and not using truncated T4 RNA ligase 2 and a pre-adenylated linker. Accordingly, the subsequent PNK treatment was done with non-radioactive ATP.

For *in vivo* experiments, NPHV infected liver biopsies from two horses were taken and snap-frozen at the College of Veterinary Medicine, Cornell University adhering to Institutional Animal Care and Use Committee protocols as previously described [28]. Samples were powderized in liquid nitrogen followed by cross-linking with UV 254nm 3x at 400mJ/cm². Results were combined from a 54mg biopsy from day 23 of an acutely infected horse (by intrahepatic RNA inoculation, NZP1 strain) with a serum titer of 10^{6.7} GE/mL and a 137mg biopsy of a chronically NPHV infected horse with a serum titer of 10⁵ GE/mL. Cultured Huh-7.5 cells for CLIP were transfected with NPHV-SL1/miRBR or NPHV-SL1/miRB-m15 and cross-linked 4 days post transfection; HCV, NPHV-SL1/miRBR_{C83A}, HCV-S2-GGCGUG, and NPHV-delta-UUGGCG, either in the absence or presence of miR-122 in Δ DICER Huh-7.5 cells were cross-linked 3 days post transfection.

RNA degradation assay

1 μ g of HCV-p7ns2Gluc-GNN or NPHV-p7ns2Gluc-GNN RNA, synthesized as previously described [51], was co-transfected in the presence of miR-122 or miR-430 mimic (Dharmacon) using the transfection protocol described above for Δ DICER Huh-7.5 cells in 6-well plates. At each time point, cells were washed with PBS 5 times and detached using trypsin. Cells were pelleted at 500 g, 4°C for 5 min and washed once with 1 mL of cold PBS. Cells were then pelleted under the same conditions and resuspended in 200 μ L PBS. Cells were stored at -80°C or processed immediately by adding 1 mL Trizol. Samples were then mixed and 200 μ L of chloroform were added and processed as described. After phase separation, the upper phase (approximately 600 μ L) was transferred to another RNase free tube, mixed 1:1 with ethanol (100%) and loaded on RNeasy mini kit column (Qiagen). RNA was further purified as described and quantified by a two-step procedure using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) for cDNA synthesis followed by a qPCR using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec and 72°C for 15 sec using primers RU-O-17104 and RU-O-21903. Standard curves were generated from the same RNAs.

Luciferase reporter assays

RNA transfection was done as described above using NPHV-p7ns2Gluc-GNN and the indicated derivative RNAs. At 6hr post transfection, the supernatant of each well was collected to assay for *Renilla* luciferase as described [15] and read on a FLUOstar Omega (BMG Labtech).

Supporting information

S1 Fig. IRES activity of HCV and NPHV variants. Huh-7.5 cells were transfected with replication-deficient HCV-p7ns2Gluc-GNN and NPHV-p7ns2Gluc-GNN variant RNAs, as indicated. At 6hr post transfection, the supernatant of each well was collected to assay for *Renilla* activity. All values were normalized to the HCV control. Data represent the mean (\pm SEM) of three independent experiments.

(EPS)

S2 Fig. Comparison of predicted secondary structures of miRBR region within HCV and NPHV constructs. The nucleotides corresponding to stem loop 1 (SL1) and microRNA binding region (miRBR) of NPHV (A-D) and HCV (E-G) are shown and folded using Mfold [52] (available at <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>). Mutagenized sites (A,B,E,F) and altered microRNA-122 binding sites (C,D,G) are boxed.

(EPS)

S1 Table. Sequence of oligonucleotides.

(XLSX)

Acknowledgments

We thank members of the Rice laboratory, especially William M. Schneider, for thoughtful insights and critical reading of the manuscript, and Daniel Blanco Melo and Gisa Gerold for their input and participation at the inception of the project.

Author Contributions

Conceptualization: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Joseph M. Luna, Amit Kapoor, Charles M. Rice.

Data curation: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Joseph M. Luna, Hachung Chung, Eiko Nishiuchi, Margaret A. Scull, Natalia Echeverría, Inna Ricardo-Lax, Charles M. Rice.

Formal analysis: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Joseph M. Luna, Charles M. Rice.

Funding acquisition: Troels K. H. Scheel, Charles M. Rice.

Investigation: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Joseph M. Luna, Charles M. Rice.

Methodology: Yingpu Yu, Joseph M. Luna, Charles M. Rice.

Project administration: Charles M. Rice.

Resources: Troels K. H. Scheel, Amit Kapoor, Ian W. Lipkin, Thomas J. Divers, Douglas F. Antczak, Bud C. Tennant, Charles M. Rice.

Software: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Joseph M. Luna.

Supervision: Charles M. Rice.

Validation: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Charles M. Rice.

Visualization: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Joseph M. Luna, Charles M. Rice.

Writing – original draft: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Joseph M. Luna, Hachung Chung, Charles M. Rice.

Writing – review & editing: Yingpu Yu, Troels K. H. Scheel, Joseph M. Luna, Charles M. Rice.

References

1. GLOBAL HEPATITIS REPORT, 2017 (n.d.). Available: <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
2. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309: 1577–1581. <https://doi.org/10.1126/science.1113329> PMID: 16141076
3. Jopling CL, Schütz S, Sarnow P (2008) Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 4: 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.013> PMID: 18621012
4. Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM (2011) Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3193–3198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012464108> PMID: 21220300
5. Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, et al. (2008) LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452: 896–899. <https://doi.org/10.1038/nature06783> PMID: 18368051
6. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, et al. (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327: 198–201. <https://doi.org/10.1126/science.1178178> PMID: 19965718
7. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, et al. (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368: 1685–1694. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209026> PMID: 23534542
8. Li Y, Masaki T, Yamane D, McGivern DR, Lemon SM (2013) Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1881–1886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213515110> PMID: 23248316
9. Sedano CD, Sarnow P (2014) Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2. *Cell Host Microbe* 16: 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.006> PMID: 25121753
10. Li Y, Yamane D, Lemon SM (2015) Dissecting the roles of the 5' exoribonucleases Xrn1 and Xrn2 in restricting hepatitis C virus replication. *J Virol* 89: 4857–4865. <https://doi.org/10.1128/JVI.03692-14> PMID: 25673723
11. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, et al. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27: 3300–3310. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.244> PMID: 19020517

12. Díaz-Toledano R, Ariza-Mateos A, Birk A, Martínez-García B, Gómez J (2009) In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. *Nucleic Acids Res* 37: 5498–5510. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp553> PMID: 19578061
13. García-Sacristán A, Moreno M, Ariza-Mateos A, López-Camacho E, Jáudenes RM, et al. (2015) A magnesium-induced RNA conformational switch at the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genome visualized by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* 43: 565–580. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1299> PMID: 25510496
14. Masaki T, Arend KC, Li Y, Yamane D, McGivern DR, et al. (2015) miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation. *Cell Host Microbe* 17: 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.014> PMID: 25662750
15. Luna JM, Scheel TK, Danino T, Shaw KS, Mele A, et al. (2015) Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell* 160: 1099–1110. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.025> PMID: 25768906
16. Scheel TK, Luna JM, Liniger M, Nishiuchi E, Rozen-Gagnon K, et al. (2016) A Broad RNA Virus Survey Reveals Both miRNA Dependence and Functional Sequestration. *Cell Host Microbe* 19: 409–423. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.007> PMID: 26962949
17. Sagan SM, Sarnow P, Wilson JA (2013) Modulation of GB virus B RNA abundance by microRNA-122: dependence on and escape from microRNA-122 restriction. *J Virol* 87: 7338–7347. <https://doi.org/10.1128/JVI.00378-13> PMID: 23616647
18. Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, et al. (2011) Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11608–11613. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101794108> PMID: 21610165
19. Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henriquez JA, et al. (2012) Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J Virol* 86: 6171–6178. <https://doi.org/10.1128/JVI.00250-12> PMID: 22491452
20. Kapoor A, Simmonds P, Scheel TK, Hjelle B, Cullen JM, et al. (2013) Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *MBio* 4: e00216–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00216-13> PMID: 23572554
21. Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, et al. (2013) Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 16151–16156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308049110> PMID: 24043818
22. Quan PL, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, et al. (2013) Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 8194–8199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303037110> PMID: 23610427
23. Corman VM, Grundhoff A, Baechlein C, Fischer N, Gmyl A, et al. (2015) Highly divergent hepaciviruses from African cattle. *J Virol* 89: 5876–5882. <https://doi.org/10.1128/JVI.00393-15> PMID: 25787289
24. Baechlein C, Fischer N, Grundhoff A, Alawi M, Indenbirken D, et al. (2015) Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. *J Virol* 89: 7007–7015. <https://doi.org/10.1128/JVI.00534-15> PMID: 25926652
25. Lauck M, Sibley SD, Lara J, Purdy MA, Khudyakov Y, et al. (2013) A novel hepacivirus with an unusually long and intrinsically disordered NS5A protein in a wild Old World primate. *J Virol* 87: 8971–8981. <https://doi.org/10.1128/JVI.00888-13> PMID: 23740998
26. Scheel TK, Simmonds P, Kapoor A (2015) Surveying the global virome: identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. *Antiviral Res* 115: 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.014> PMID: 25545071
27. Thézé J, Lowes S, Parker J, Pybus OG (2015) Evolutionary and Phylogenetic Analysis of the Hepaciviruses and Pegiviruses. *Genome Biol Evol* 7: 2996–3008. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv202> PMID: 26494702
28. Scheel TK, Kapoor A, Nishiuchi E, Brock KV, Yu Y, et al. (2015) Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 2192–2197. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500265112> PMID: 25646476
29. Catanese MT, Loureiro J, Jones CT, Dorner M, Hahn T von, et al. (2013) Different requirements for scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus cell-free versus cell-to-cell transmission. *J Virol* 87: 8282–8293. <https://doi.org/10.1128/JVI.01102-13> PMID: 23698298
30. Moore MJ, Scheel TK, Luna JM, Park CY, Fak JJ, et al. (2015) miRNA-target chimeras reveal miRNA 3'-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nat Commun* 6: 8864. <https://doi.org/10.1038/ncomms9864> PMID: 26602609
31. Li YP, Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Bukh J (2011) MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1–6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 4991–4996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016606108> PMID: 21383155

32. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110> PMID: [11201747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11201747/)
33. Merritt WM, Bar-Eli M, Sood AK (2010) The dicey role of Dicer: implications for RNAi therapy. *Cancer Res* 70: 2571–2574. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2536> PMID: [20179193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20179193/)
34. Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, et al. (2012) Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122. *J Virol* 86: 1382–1393. <https://doi.org/10.1128/JVI.06242-11> PMID: [22114337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22114337/)
35. Narbus CM, Israelow B, Sourisseau M, Michta ML, Hopcraft SE, et al. (2011) HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *J Virol* 85: 12087–12092. <https://doi.org/10.1128/JVI.05843-11> PMID: [21917968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21917968/)
36. Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, et al. (2012) Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol* 86: 7918–7933. <https://doi.org/10.1128/JVI.00567-12> PMID: [22593164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593164/)
37. Vogt A, Scull MA, Friling T, Horwitz JA, Donovan BM, et al. (2013) Recapitulation of the hepatitis C virus life-cycle in engineered murine cell lines. *Virology* 444: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.036> PMID: [23777661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23777661/)
38. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, et al. (2010) Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 465: 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature08960> PMID: [20410884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20410884/)
39. Da Costa D, Turek M, Felmlee DJ, Girardi E, Pfeffer S, et al. (2012) Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J Virol* 86: 11919–11925. <https://doi.org/10.1128/JVI.01066-12> PMID: [22896615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22896615/)
40. van der Ree MH, de Vree JM, Stelma F, Willemsse S, van der Valk M, et al. (2017) Safety, tolerability, and antiviral effect of RG-101 in patients with chronic hepatitis C: a phase 1B, double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31715-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31715-9)
41. Pfaender S, Brown RJ, Pietschmann T, Steinmann E (2014) Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerging microbes & infections* 3: e21. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.19> PMID: [26038514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26038514/)
42. Israelow B, Mullokandov G, Agudo J, Sourisseau M, Bashir A, et al. (2014) Hepatitis C virus genetics affects miR-122 requirements and response to miR-122 inhibitors. *Nat Commun* 5: 5408. <https://doi.org/10.1038/ncomms6408> PMID: [25403145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25403145/)
43. Thomson AW, Knolle PA (2010) Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* 10: 753–766. <https://doi.org/10.1038/nri2858> PMID: [20972472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20972472/)
44. Gao B (2016) Basic liver immunology. *Cell Mol Immunol* 13: 265–266. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.09> PMID: [27041634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27041634/)
45. Naseri N, Singaravelu R, Goodmurphy M, Lyn RK, Pezacki JP (2011) Competing roles of microRNA-122 recognition elements in hepatitis C virus RNA. *Virology* 410: 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.11.015> PMID: [21185047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21185047/)
46. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76: 13001–13014. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.13001-13014.2002> PMID: [12438626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12438626/)
47. Yi Z, Sperzel L, Nürnberger C, Bredenbeek PJ, Lubick KJ, et al. (2011) Identification and characterization of the host protein DNAJC14 as a broadly active flavivirus replication modulator. *PLoS Pathog* 7: e1001255. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001255> PMID: [21249176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21249176/)
48. Scheel TKH, Gottwein JM, Mikkelsen LS, Jensen TB, Bukh J (2011) Recombinant HCV variants with NS5A from genotypes 1–7 have different sensitivities to an NS5A inhibitor but not interferon- α . *Gastroenterology* 140: 1032–1042. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.036> PMID: [21111742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111742/)
49. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, et al. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623–626. <https://doi.org/10.1126/science.1114016> PMID: [15947137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15947137/)
50. Moore MJ, Zhang C, Gantman EC, Mele A, Darnell JC, et al. (2014) Mapping Argonaute and conventional RNA-binding protein interactions with RNA at single-nucleotide resolution using HITS-CLIP and CIMS analysis. *Nat Protoc* 9: 263–293. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.012> PMID: [24407355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24407355/)
51. Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM (2007) Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 81: 8374–8383. <https://doi.org/10.1128/JVI.00690-07> PMID: [17537845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17537845/)
52. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595> PMID: [12824337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12824337/)

Chapter 17

Molecular Evolution of Hepatitis C Virus: From Epidemiology to Antiviral Therapy (Current Research in Latin America)

Natalia Echeverría, Pilar Moreno, and Juan Cristina

1 Introduction

Hepatitis C infection is globally widespread, and to date, there is an estimate of 130–150 million people worldwide living with chronic and progressive liver disease as a result of infection by hepatitis C virus (HCV) [196]. The development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) are long-term complications in 15% to 30% of chronically infected patients, which is the reason why HCV infection is one of the most common indications for liver transplantation [81, 143].

Despite the urgent need to prevent dissemination of its etiological agent, there is currently no prophylactic vaccine against HCV [93]. However, significant advances have been made in relation to drug development in the past decade, leading to the approval of many direct antiviral agents (DAAs), which have greatly contributed to achieve higher sustained virological response (SVR) rates [67, 92, 129, 182]. Until 2010, the standard of care (SOC) therapy involved pegylated interferon- α (IFN- α -PEG) and ribavirin (RBV) [35, 110], administered for 24 or 48 weeks depending on the infecting viral genotype. Yet, since 2011 a new standard of care (NSOC) therapy has been approved for patients infected with HCV genotype 1, by including one or more DAAs in combination with IFN- α -PEG and/or RBV [67, 92, 129, 182]. Unfortunately, therapies including interferon present several drawbacks resulting from IFN inaccessibility in some countries, its tolerability, and patient response to treatment (some genotypes of HCV respond better than others) [36]. In addition, adverse effects such as rash have also been associated with the NSOC [171], but even more worrying is the high cost of the newly approved DAAs, particularly for Latin American countries [140, 177].

N. Echeverría • P. Moreno • J. Cristina (✉)

Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay
e-mail: necheverria@cin.edu.uy; pmoreno@cin.edu.uy; cristina@cin.edu.uy

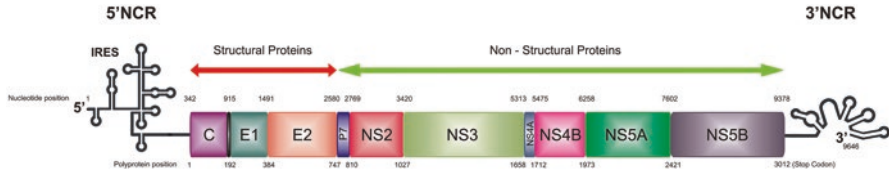


Fig. 17.1 Organization of hepatitis C virus (HCV) genome and hepatitis C virus polyprotein processing. Schematic representation of the 9.6-kb positive-stranded RNA genome. The 5'- and 3'-non-coding regions (NCRs) are shown as well as the internal ribosomal entry site (IRES)-driven translated polyprotein precursor, which is processed into the mature structural and nonstructural proteins. Nucleotide and amino acid positions are shown by *numbers* on the upper and lower part of the scheme, respectively. (Modified from Echeverría et al. 2015 [52])

As a blood-borne pathogen, the main route of HCV transmission is direct or indirect exposure to any source of contaminated blood: transfusion of unscreened blood or blood products, intravenous drug use, use of poorly sterilized surgical aids, organ transplants, and work-related accidents in healthcare centers, as well as vertical transmission from mother to child, although the latter is much less common [174, 195, 196].

HCV belongs to the family *Flaviviridae* and is classified as a member of the *Hepacivirus* genus, mainly because of specific genome features [174]. HCV is a single-stranded, positive-sense RNA virus with a genome approximately 9600 nucleotides in length. Most of the genome is composed of a single open reading frame (ORF) that encodes three structural (core, E1, E2) and seven nonstructural (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) proteins (Fig. 17.1) [15, 52]. Functionally important short noncoding regions at each end of the genome (5'-NCR and 3'-NCR) are required for its translation and replication [62, 95]. Differing from the canonical eukaryotic mechanism of translation initiation (cap-dependent), this virus utilizes a different mechanism which is dependent on an internal ribosomal entry site (IRES) located within the 5'-untranslated region (5'-UTR), which interacts directly with the 40S ribosomal subunit [148].

Because of the self-encoded and error-prone RNA-dependent RNA polymerase and to the selective pressure exerted by the host immune system, HCV has diversified into seven major genetic lineages (genotypes 1–7) (Fig. 17.2) [52, 176] which differ in 31–33% of nucleotide sites along the complete genome [174]. Genotypes 1–6 of HCV contain a series of more closely related subtypes that typically differ from each other by at least 15% in nucleotide positions within the coding region [176]. Subtypes 1a, 1b, and 3a are widely distributed and account for most of the infections in Western countries, including in Latin America [195].

HCV genetic variability is not evenly distributed across the viral genome. The regions of the genome involved in translation and replication are the most conserved. The 5'-NCR and the core region exhibit 90% and 81–88% sequence identity between distant strains, respectively [23, 149]. The regions coding for the membrane glycoproteins E1 and E2 are the most variable [9]. The hypervariable regions 1 and 2 (HVR1 and HVR2) of the E2 gene are the least conserved, with a sequence

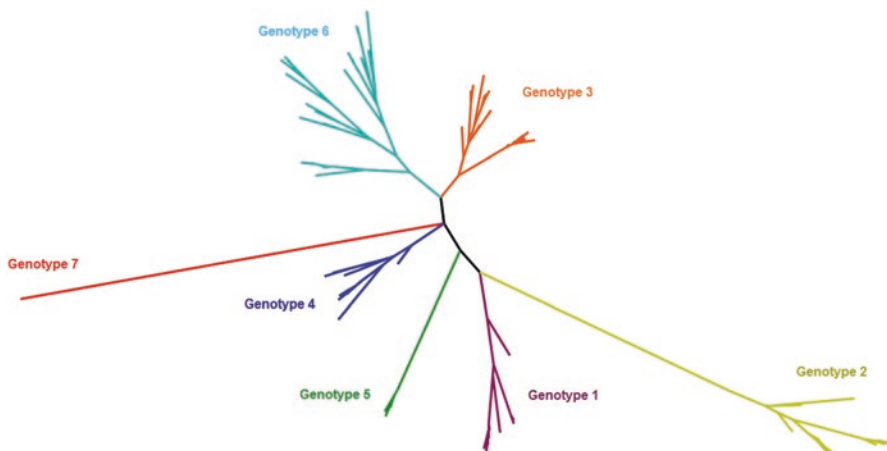


Fig. 17.2 Evolutionary tree of the seven genotypes and all known subtypes of the hepatitis C virus. The tree was constructed with the maximum-likelihood method using GTR + I + G based on a 307-nucleotide sequence from the NS5B-coding region. Sequences were extracted. (From Yusim et al. 2005 [204]; modified from Echeverría et al. 2015 [52])

homology of only 50% between different isolates [75]. As many other RNA viruses, HCV has large population sizes, short generation times, and high replication rates [48], all well-known factors that contribute to its high genetic variability.

2 Prevalence of HCV Infection in Latin America

HCV prevalence data among the different countries in Latin America are difficult to gather. As the prevalence describes the proportion of a particular population that is infected with this virus at a certain time point, it is therefore needed to have precise data on the infected patients in each country to correctly assess this matter. Many efforts have been made to address this issue, in particular in risk populations as well as blood bank donors; however, quantifying HCV infection prevalence among the general population has proven to be the most difficult task. Nevertheless, the World Health Organization has been able to collect comprehensive information regarding HCV seroprevalence as well as viremic HCV prevalence in different regions [135, 197] (Table 17.1); the former has been estimated around 1% and the latter around 0.8%, with subtle variations depending on the specific region considered.

Specific information for each country has relied upon varied studies, all of which have their limitations, particularly regarding the population being recruited for the study and the methods used for screening HCV infections. Regarding HCV prevalence in the general population, there have only been a few complete studies in Argentina [151], Brazil [145], and Mexico [76, 108] reporting an overall lower prevalence than for Latin American regions together (0.32% between years 2000

Table 17.1 Estimated prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection by 2013 [74, 197] in different regions in Latin America

Region	Anti-HCV prevalence (CI) ^a (%)	Viremic HCV prevalence (CI) ^b (%)
Caribbean	0.8 (0.2–1.3)	0.6 (0.1–0.9)
Andean region	0.9 (0.4–1.3)	0.6 (0.3–0.9)
Central region	1.0 (0.8–1.4)	0.8 (0.6–1.1)
Southern region	1.2 (0.5–2.1)	0.9 (0.4–1.6)
Tropical region	1.2 (0.9–1.2)	1.0 (0.7–1.0)

CI confidence interval

^aExposure to HCV indicated by the presence of antibodies against the virus

^bChronic HCV infection indicated by the presence of viral RNA

and 2007, 1.38% between years 2005 and 2009, 0.27–0.35% in 2012 and 2010, respectively), which may indicate an overestimation of the figures by the World Health Organization or an underestimation by these studies due to the selected population. Some other works report the HCV prevalence in specific locations within different countries, but this cannot be considered as the prevalence for the whole country as the population studied was restricted to a particular area, city, or characteristics: 0.4% among the Belize Defence Force by 1993 [37], 0.8% in Amerindian populations in Venezuela in 2002 [120], 0.66–5.68% in different Colombian regions before 2011 [6], and to 5.8% in the Brazilian Eastern Amazonas Region in 2010 [108]. Unexpectedly, a much higher seroprevalence (11.7%) was found in Lima, Peru, in 1994 [165].

Some countries have also attempted to report incidence rates or number of cases for a particular time period; for example, Brazil reported that of a total of 151,056 hepatitis cases recorded between 2001 and 2012, 30.3% corresponded to hepatitis C infections [78]; in Uruguay, 904 new HCV infections were reported to the Ministry of Health between years 2009 and 2012 [10], accounting for 0.026% of the country population.

Exhaustive studies have been performed to address HCV seroprevalence in blood donor banks. These studies have shown lower prevalence rates in this group than in the general population [17, 30, 107, 127, 137, 165, 189]. The Pan-American Health Organization has, additionally, gathered data on anti-HCV screening in blood banks all over Latin America [135], and by 2011, the Latin American country with the highest HCV prevalence was Guatemala (0.65%) whereas the lowest, 0.03%, was registered in Chile.

In contrast, among high-risk populations such as multi-transfused patients, drug users, commercial sex workers, and HIV-coinfected patients, HCV prevalence rates tend to be higher (see Alonso et al. 2015 for a detailed review); 12.7% of multi-transfused patients in Uruguay [106] and more than 50% of hemophiliacs and patients undergoing hemodialysis in Peru [165] exhibited HCV antibodies; despite these intermediate prevalence rates, the lowest found in hemodialysis patients was reported in Argentina, 3.6% [112], and the highest in Chile, 83.9% [109]. Lower ranges in seroprevalence were reported for commercial sex workers, ranging from 0% to 8.2% in female sex workers from Panama [77] and Argentina [138], respectively. HCV

prevalence among drug users seems to be higher in injection drug users (IDU) [5], as much as 95% in two cities in Mexico [63] and lower in non-injection drug users, being mostly in the range 0% to 14% [5]. For HIV-coinfected patients, most of the studies focus on genotyping HCV and analyzing response to treatment; however, one study in Venezuela reported a seemingly low prevalence of coinfection with HCV, 0.7% [87].

In summary, all these data suggest an estimate of 4.9 million persons infected with HCV in 2013 in all Latin America [197].

3 Molecular Epidemiology and Evolutionary History

Epidemiology is defined as the study of the distribution and determinants of health-related states and the application of this study to the control of diseases and other health problems. This field has been one of the most studied for hepatitis C infection in many countries in Latin America, and, therefore, there is a great deal of information concerning HCV genotype distribution. In addition, bioinformatics has allowed researchers to investigate the evolutionary history of this virus in our region, being able to identify different introductions in different countries, the dynamics of the population dispersal, and the approximate time of the most recent common ancestor (MRCA).

Historically, 5'-NCR and NS5B regions have been those most frequently used to genotype and subtype HCV isolates, respectively. Until the early 2000s, the preferential genotyping method involved partially amplifying the 5'-NCR by polymerase chain reaction (PCR) and subsequently performing restriction fragment-length polymorphism analysis (RFLP), allowing us to determine mainly the genotypes (and for genotype 1 also the subtypes). However, researchers in Uruguay, Argentina, and Colombia started reporting a mutation within that region (G107A) that seems to incorporate a new restriction site for the *RsaI* enzyme and therefore prevents the correct subtyping of genotype 1 isolates bearing this change [31, 32, 58, 68, 70, 122]. This finding was regarded as a regional diversification of HCV, although this specific mutation has also been found in isolates from other parts of the world [68]. These findings, together with the advent of affordable sequencing technologies, have caused a shift from this RFLP methodology, to direct sequencing of the regions of interest followed by phylogenetic studies to genotype (5'-NCR) and subtype (NS5B) HCV isolates.

Genotype distribution is similar for some neighboring countries; however, subtle differences can be found in subtype distribution.

In Chile, the most widespread subtype is 1b, accounting for at least 72.71% of the infections, followed by 3a (16.53%) and 1a (7.87%). In lesser proportion, minor lineages have also been detected (genotype 2, 1.98%; genotype 4, 0.6%; genotype 5a, 0.28%; genotype 6, 0.06%) in a cohort of 1766 HCV-infected patients from different Chilean regions [191]. However, it is important to note that the genotyping method was PCR-RFLP of the 5'-NCR region. Another study, with fewer patients ($n = 57$) and genotyping by direct sequencing of the NS5B region, detected a higher

proportion of genotype 1b (82.4%) [103]. Although the difference can be attributable to the method used, the sampling number may have also influenced these results. Subtype 1b also seems to be the most widespread in the Caribbean Island of Martinique in mono-infected patients (78.7%), followed by subtype 1a (18%) and genotype 2 (6.8%) [114]. Similar genotype distributions have been found in different studies in Colombia and Cuba, indicating once again that the most widespread subtype is 1b, followed by 1a, and to a lesser extent 2, 3a, and 4 [58, 121, 164, 200]. In Mexico, different authors have found conflicting results concerning the most prevalent subtype, 1b [108] or 1a [139]. Although detection of genotype 3 seems to be increasing over time, there is no doubt that genotype 1 is predominant in the country [128], as it is also in Peru [165].

In contrast, most Brazilian and Uruguayan reports indicate 1a as the most prevalent subtype, followed by 3a, and then by 1b, which suggests a different evolutionary history of HCV in these countries [27, 31, 99, 105, 119, 173]. Also, few cases of genotype 2, 4, and 5a have been reported in Brazil [99, 119, 159, 205].

A different situation is seen in Venezuela, where subtypes 1a, 1b, and genotype 2 are almost equally distributed [87, 154]; the rest of the genotypes are found in less than 5% of the infected patients.

Finally, Argentina reflects a distinct scenario, where the distribution of each genotype varies significantly between different regions and provinces, 2c being as prevalent as genotype 1 in central Argentina [102, 158], 1a the most widespread subtype in the touristic city of Mar del Plata (76%) [44], or similar prevalence rates between 1a, 1b, and 2c (25% each) when analyzing the general population from 12 provinces representing all Argentinean regions [151].

By means of phylogenetic analyses, the evolutionary history of HCV in different countries has been addressed. This approach has also allowed characterizing the variability of different strains and how related they are to each other. Integrating epidemiological to genetic models by employing coalescent methods has also been crucial to infer changes in population sizes (population dynamics) and to trace back the most recent common ancestor (MRCA). Not only the NS5B region has been widely used for evolutionary studies, but also the core, E2 and NS5A regions [27, 33, 43, 45, 69, 73, 98, 99, 103, 122, 132, 167, 178].

Bayesian coalescent studies have shown rather complex evolutionary histories of HCV in Uruguay [27], Brazil [99], and Argentina [44, 45, 71, 102], where multiple introductions of a given subtype have been inferred. The epidemic history in Uruguay and Argentina suggests multiple introductions of subtypes 1a, 1b, and 3a (only for Uruguay), with a few country-specific strains being disseminated locally [27, 45]. Similar evolution patterns were observed in Brazil [99], but with the dissemination of a major clade for subtype 1a, whereas for 1b and 3a, the evidence indicates concurrent dissemination of multiple lineages.

In reference to the time of the MRCA (t_{MRCA}) for subtypes 1b and 1a, these are surprisingly alike between different countries in our region. For Uruguay, Brazil, and Argentina, MRCA has been estimated around the 1920s for 1b and about 40 to 60 years later for 1a [27, 44, 45, 71, 99, 102]. It seems that the 1b population is in a steady state nowadays, while 1a is still under expansion. In Colombia and Cuba,

subtype 1b appears to have been introduced at a later time point (1950s and 1970s, respectively); however, the rate of population growth reached a steady state soon after the 1990s [73, 121].

The demographic history of HCV in Chile seems a little different; despite multiple introductions of subtype 1b, the t_{MRCA} appears to be earlier than in the neighboring countries, dating between 1893 and 1901, indicating an earlier introduction of HCV in Chile. Venezuela appears to be one of the first countries in Latin America in which HCV seems to have spread, but opposed to the rest, the initial subtype was 2j and its t_{MRCA} was estimated around 1785, having been followed by 1b around a century later and by 1a around the 1920s [178].

It is clear that HCV spread has followed different pathways depending on the country, but it seems that neighboring countries tend to exhibit rather similar genotype distributions and epidemic histories. All these abundant data are undoubtedly relevant for epidemiological surveillance of HCV dispersal as well as for choosing therapeutic options, which, as is discussed in the next sections, is highly dependent upon the infecting genotype.

4 HCV Variability: Mutation, Quasispecies, and Recombination

HCV evolution is a dynamic process [38] driven by different mechanisms to generate genetic variation, among which nucleotide mutation seems to be the most important, particularly in RNA viruses. These mutations are primarily the result of an error-prone replication cycle as a consequence of using an RNA-dependent RNA polymerase that lacks proofreading activity [174]. HCV high replication rate, large number of progeny and mutation rate (10^{-4} substitutions/site/round of replication [13, 41]) give rise to a large number of different but genetically related viral variants during infection, which circulate in vivo as a complex population commonly known as a quasispecies cloud [20, 47, 113]. At a particular point of infection, the quasispecies distribution reflects the balance between the generation of new variants, the necessity to preserve crucial viral functions, and the positive selective pressure exerted by the environment. Quasispecies dynamics confers RNA viruses the ability to adapt easily to any changing environment. This fact represents one of the major complications for the control and prevention of RNA viral diseases [59] since, by means of generating and selecting fitter variants, viruses can escape control by antiviral drugs [141].

Although the analysis of quasispecies evolution is a complex task, several studies around the world have attempted to explore the genetic variability within quasispecies level as a means to predict response to antiviral therapy [4, 39, 40, 42, 85, 153, 187]. However, results seem conflicting on whether a higher diversity indeed predicts non-response (NR) and a lower level predicts SVR. Cristina et al. [39] showed that response to antiviral therapy was independent from genetic variability within quasispecies populations at the beginning of therapy. Opposite to these findings, Jardim

et al. [85] reported that low nucleotide diversity pre-therapy was associated with viral clearance. Dissimilar results were also found along treatment [4, 187]. These conflicting results could be explained by the use of different methodological approaches as well as the distinct genomic regions that were used to carry out these studies. The inconsistency in the results highlights the need for a deep analysis and comparison of different methods for studying quasispecies variability.

HCV also resorts to recombination, as well as mutation, to generate variability. Therefore, recombination is regarded as a key mechanism for the production of new genomes with selective growth advantage [198]. RNA recombination involves replication of genomic RNA, in the middle of which the viral RNA-dependent RNA polymerase complex switches from one parental strand to another. This template strand exchange mechanism is known as “copy choice” [34]. Recombination in HCV has been reported between different genotypes (inter-genotypic), between different subtypes (intra-genotypic), and even between different variants of the same quasispecies (intra-quasispecies) in different geographic locations. However, it has been rarely reported in Latin America [33, 126]. The first evidence for the possible existence of HCV recombination in our continent came from the analysis of a few HCV strains from Honduras in which partial sequences from different regions of the viral genome resulted in an HCV-discordant genotype [203]. However, no case of inter-genotypic recombination has been reported in Latin America, despite the existence of several from other regions [19, 46, 50, 82, 90, 91, 96, 100, 101, 123, 124, 133, 180, 201]. Nevertheless, examples of intra-genotypic recombination (1a/1b) have been identified in Peru [33] as well as in Uruguay [126]. As for intra-quasispecies recombination, only three reports have been published worldwide [125, 136, 170], but none of them corresponds to HCV variants isolated from Latin American patients. However, given that one of the detections has been reported by Uruguayan authors [125], it is clear that Latin American researchers have the means to detect these recombination events within a host, and although it seems to be more difficult, it is an attainable aim provided that the variability of the region under study allows the differentiation of the parental genomes.

It is worth noting that recombination may impact how patients respond to antiviral therapies as well as vaccine development, which makes it clearly important to determine the extent to which this mechanism plays a role in HCV evolution [126].

5 Antiviral Therapy and Predictors of Response to Treatment

5.1 *Standard of Care: Pegylated Interferon- α and Ribavirin*

As was mentioned earlier, the standard of care for HCV treatment has been facing numerous changes in the past 6 years. Historically (and up to 2010), the only available treatment was dual therapy, which involves the coadministration of pegylated interferon- α (IFN- α -PEG) and RBV for 24 or 48 weeks, depending mainly on the

infecting HCV genotype. Beginning in 1992, the first drug to be used was IFN- α in monotherapy, but the SVR rates were less than 20% in genotype 1 and 50% in genotypes 2 and 3 [152]. The conjugation of a polyethylene glycol (PEG) residue to IFN and the coadministration of RBV, a nucleoside analogue, increased those rates to up to 50% in genotype 1 and to 70–80% in genotype 2 or 3 [66]. The PEG residue enables a longer IFN half-life, and RBV contributes to viral eradication by introducing mutations to an unbearable level into the viral genome. Although the addition of PEG and the coadministration of RBV improved the SVR rates, this is still insufficient for genotype 1-infected patients. This treatment has several secondary effects (flu-like symptoms, hemolytic anemia, and depression) and is contraindicated in patients with autoimmune or depressive disorders and in those with cerebrovascular diseases [14]. Moreover, adherence to treatment is low as a consequence of both secondary effects as well as the parenteral route of IFN administration (injection).

5.2 New Standard of Care: Direct Antiviral Agents

The reasons outlined earlier prompted the development of new therapeutic agents, mainly aiming at inhibiting viral proteins, the first being approved in 2011 [66].

These new antiviral agents, known as DAAs (direct antiviral agents), target three different viral proteins vital to the viral cycle: the protease NS3-4A, the polymerase NS5B, and the protein NS5A (involved in many different steps throughout the replication cycle). Their antiviral effectiveness has proven to be much higher (80% to almost 100% depending on patient characteristics) than dual therapy when combined with IFN- α -PEG/RBV or even in IFN-free regimens, combining two or three different DAAs [142]. Furthermore, they exhibit fewer adverse effects, and because they are administered orally, compliance to treatment is higher [11]. Numerous DAAs have already been approved around the world [181]: telaprevir (TVR), boceprevir (BOC), simeprevir (SMV), asunaprevir (ASV), vaniprevir (VPV), and paritaprevir (PPV, PTV) (NS3-4A inhibitors); sofosbuvir (SOF) and dasabuvir (DBV, DSV) (NS5B inhibitors); and daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV), and ombitasvir (OBV) (NS5A inhibitors). Many of these are also available in Latin America.

5.3 Identification and Characterization of New Anti-HCV Drugs

Even though all these agents have been developed in industrialized countries, researchers in Latin America have done considerable work focused on the identification or characterization of new anti-HCV drugs [16, 57, 86, 97, 111, 150, 162, 185].

In reference to the synthesis and characterization of novel inhibitor drugs against the polymerase, many compounds have been described in Latin America, including indol-based compounds [97] and isoflavonoids [57, 111]. As for potential NS3-4A inhibitors, many products from the Amazon region were evaluated by molecular dynamics simulation studies [150]. The results of this work showed that some of those compounds seem to be promising as novel anti-HCV therapies. On the other hand, caffeine [16], natural compounds isolated from Brazilian plants [86], and acetylsalicylic acid [162, 185], also were shown to be efficient inhibitors of HCV replication and translation in cell culture-based assays.

5.4 Viral Genetic Factors Associated with Response to Treatment

Several factors have been associated with response to treatment in HCV-infected patients. Some have been essential to decide the length of dual therapy with IFN and RBV; others have become more important with the advent of direct antiviral drugs. These factors can be classified as virus- or host-related factors [160]. Among the pretreatment viral factors, it has been long recognized that the virus genotype is one of the strongest baseline predictors of dual therapy: genotype 1 has shown the lowest SVR rates (around 50%) [66]. This factor remains important with the new standard of care therapies with protease inhibitors (PI) because these were designed in a genotype-specific manner. Furthermore, triple therapies including a PI in genotype 1-infected patients have shown that SVR rates are slightly higher in patients infected with genotype 1b because resistance-associated variants (RAVs) are more frequent in genotype 1a [84, 94, 166]. Another well-known pretreatment factor associated with response to dual therapy is low baseline HCV load, which has been shown to be a predictor of SVR [18, 207].

Additional viral factors include quasispecies complexity as well as mutations/substitutions in different regions of the viral genome/proteins. The genetic heterogeneity of the ISDR domain of HCV NS5A (IFN sensitivity-determining region) showed a correlation to IFN response, meaning that in most cases a higher number of substitutions within the ISDR was observed in responding patients [55, 144, 194]. Latin American studies have also found similar results [21, 22, 168].

Concomitant with the introduction of DAAs to treat HCV infections, the detection of RAVs has become of utmost importance all around the world. In our region substantial work has been done in Brazil to address this issue [25, 28, 79, 80, 104, 131, 146, 206], but data on other countries are scarce, with only a few reports from elsewhere: Argentina [60, 88, 169], Venezuela [88], Mexico [60], and Uruguay [54].

The main role of the NS3-4A protease is to cleave the viral polyprotein to render individual proteins. Therefore, drugs that bind to its active site prevent the viral cycle from continuing by blocking replication by the lack of a cleaved polymerase. Because a more diverse choice of approved PIs has been available for a longer time than inhibitors of NS5A and NS5B, numerous data exist concerning RAVs in the

NS3 coding region. The vast majority of these RAVs map near the catalytic triad residues (His57, Asp81, Ser139) in the tertiary structure of the protease. Most substitutions exhibit cross-resistance to more than one PI, such as V36A/G/L/M, F43I/L/S/V, T54A/S, V55A/I, Q80K/L/R, S122R, R155G/K/S/T, A156S/T/V, D168A/G/V, and V/I170A/T [193, 199]. Others confer resistance to one drug only: Q41R (SMV), I132V (TVR), S138T (SMV), V158I (BOC), M175L (BOC) [193, 199].

In reference to RAV circulation in the Latin American region, the deep sequencing approach as well as the mismatch amplification mutation assay (MAMA) PCR method allowed detection of drug resistance variants present at very low frequencies in both Mexico and Argentina (1–6%) [60, 169]. On the other hand, Brazil reported HCV isolates with baseline RAVs in 3.2% to 18.9% of DAA treatment-naïve patients [25, 104, 146, 206]. Surprisingly, a higher frequency of baseline RAVs has been found in Uruguayan patients infected with HCV genotype 1 (25%) [54].

With respect to Q80K, a mutation associated with resistance to SMV, it has been found at a high prevalence among treatment-naïve HCV carriers in the U.S. (46%) and in Europe (4–16%) [131, 193], whereas in Brazil it is less than 6% [79, 146]. In Uruguay, although the number of samples analyzed was small ($n = 20$), Q80K/L was found in three patients [54].

NS5A and NS5B proteins seem to have a higher resistance barrier, and therefore fewer positions have been described as RAVs [53, 130]. The most important substitution conferring resistance to SOF (a nucleos(t)ide analogue, inhibitor of NS5B) is S282T, but others have been associated with treatment failure as well, such as L159F, C316N, and V321A. Substitutions in C316 are, together with S556G, implicated in resistance to DSV (a non-nucleoside inhibitor of the polymerase). As for RAVs to NS5A inhibitors, the primary mutations are M28T, Q30E/H/R, L31F/M/V, P32L, and Y93C/H/N.

Only three studies have been undertaken in our region to gain insight into resistance profiles against NS5A and NS5B inhibitors. The only study addressing NS5A RAVs documented several mutations in the consensus sequences, including M28T, Y93H, and L31M in at least 7% of the 107 treatment-naïve patients recruited [147]. NS5B S282T substitution was not found in Argentina [169], Brazil [28], or Venezuela [88]; however, C316N seems to be rather frequent in both Brazil and Venezuela, being present in 24% and 18% of genotype 1b-infected patients, respectively.

Other types of drugs are also under development, the most promising being miravirsin, a novel therapeutic agent targeting a host factor. Miravirsin is currently in phase 2 clinical trials [186], and it is aimed at inhibiting HCV in an indirect way by targeting miR-122, a liver-specific micro-RNA highly expressed in hepatocytes that is essential for HCV replication cycle [89]. Although results are promising given its broad antiviral activity and relatively high resistance barrier compared to DAAs [134], there are safety concerns because critical cellular functions are attributed to miR-122: maintenance of liver homeostasis as well as tumor-suppressor activity [83]. In light of these findings and bearing in mind the variety of RAVs already described, other alternatives to target HCV directly are being studied in Latin

America, such as RNA interference targeting five different regions of the genome [24] or the use of catalytically active DNA molecules capable of cleaving RNA upon binding to it [163].

As can be concluded from the studies already mentioned, there are as many interesting ongoing studies as there is still much to be done in the remaining Latin American countries to provide useful information for physicians before assigning a particular treatment to a given patient or even developing newer therapeutic strategies.

5.5 Host Factors Associated with Response to Treatment

So far, we have addressed only viral genetic factors, but several host factors have also been shown to be involved in the development of HCV infection and the response to therapy [160], apart from miR-122, discussed earlier. African-American race and advanced fibrosis or cirrhosis are associated with lower response rates, when compared to other races and less liver damage. Furthermore, since 2009, several single-nucleotide polymorphisms (SNP) near the interleukin-28B gene (IL28B), also known as interferon-lambda 3 (IFN- λ 3), have been reported to influence response to dual antiviral therapy (IFN- α -PEG plus RBV) [65, 155, 179, 183, 188, 202]. The SNPs identified through genome-wide association studies (GWAS) were mainly three: rs12979860, rs8099917, and rs12980275. For every SNP, risk or unfavorable alleles have been determined: rs12979860, T; rs8099917, G; and rs12980275, G. When combined in homozygosis (TT, GG, or GG) or heterozygosis with the major allele (TC, GT, or GA), these genotypes are associated with non-response to treatment and to lower rates of viral clearance. As these results have been validated in numerous clinical studies, IL28B genotyping has become important to assist clinicians with respect to the best therapeutic regimen to adopt for each patient; in particular, to decide the length of IFN-containing therapies or the implementation of a DAA-containing regimen.

Only a few countries in Latin America have investigated IL28B SNPs allelic and genotypic frequencies: Chile [8, 192], Mexico [61, 72, 118, 175], Argentina [64, 161], Brazil [29, 56, 156, 157, 172, 190], and Uruguay (unpublished data). Despite some discordant results, most of these studies reflect an association between favorable IL28B genotypes and spontaneous or treatment-induced viral clearance. Therefore, they cannot be denied as important and useful factors to consider when deciding on a particular therapeutic strategy.

Another interesting finding is that the frequency of protective alleles seems to be significantly lower in Amerindian and admixed populations from Mexico [72] and Argentina [184]. Similarly, in Uruguay, preliminary studies indicate that the frequency distribution for rs12979860 and rs8099917 genotypes among general population resembles that of an admixed population, instead of that of European ancestry. As observed for most other countries, genotype distribution varies when comparing healthy individuals and infected patients, but these changes seem to be statistically

significant only when analyzing rs12979860 SNP (unpublished data). In Brazil, similar observations were made with respect to African descendants, who show a higher frequency of unfavorable genotypes [29]. Despite some discordant results, most of the studies do indeed reflect an association between favorable IL28B genotypes and spontaneous or treatment-induced viral clearance. Therefore, these cannot be denied as important and useful factors to consider when deciding on a particular therapeutic strategy.

In fact, all the data mentioned throughout this section, if anything, highlight how imperative it is for the rest of the countries in our region to focus on characterizing and analyzing all the factors that influence a patient's response to anti-HCV therapy, as a way of evolving to a more personalized and effective medicine.

6 Vaccine Candidates

Despite worldwide efforts to develop a prophylactic vaccine against HCV, it remains elusive. Nevertheless, several Cuban researchers have been actively working on vaccine candidates for the past 15 years [1–3, 7, 12, 26, 49, 51, 115–117]. Most of the work focused on the main HCV antigens: the core protein and the E2 glycoprotein. The successful heterologous expression of these proteins and chimeric ones in yeast (*Pichia pastoris*) [116] or bacteria (*Escherichia coli*) [3] indicated that it is feasible to generate HCV vaccine candidates that can elicit both humoral and cell-mediated immune responses in mice, sheep, and monkeys [1, 2, 115]. Besides protein-based candidates, DNA-based formulations have also been investigated. Vaccination of mice with a plasmid containing a truncated variant of the core was able to induce a slow but potent immune response [51]. Furthermore, coadministration of a combination of a plasmid encoding the first 650 amino acids of the polyprotein and a protein comprising the first 120 amino acids of the core also showed potent immune responses in rats [12] and in humans [26], with no observable toxicity or adverse local or systemic alterations. These results are promising because vaccination with this combination seems to be safe and well tolerated; however, further studies are needed to evaluate these features in a larger cohort of individuals.

7 Concluding Remarks and Future Challenges

As can be appreciated, a great amount of work has been pursued in Latin America on HCV molecular evolution, although there are still numerous countries for which data on HCV infection are scarce or not available, or even where studies are lacking. Additionally, mainly because of budget constraints, many studies have been hampered or their development has been slow when compared to industrialized countries. These facts highlight the main problem that Latin America faces when coping with epidemics: the difficulty in keeping up with the most up-to-date findings and

techniques. Nevertheless, the work described in this chapter proves that the research in our region cannot be underestimated and that there are strong and well-prepared groups to face any necessary study to help in controlling and preventing HCV infection throughout Latin America.

Acknowledgments This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANI) through project FMV_1_2014_1_104171, Comisión Académica de Posgrado, UdelaR, PEDECIBA and program Grupos I+D CSIC, Uruguay.

References

1. Acosta-Rivero N, Alvarez-Obregón JC, Musacchio A, Falcón V, Dueñas-Carrera S, Marante J, Menéndez I, Morales J (2002) In vitro self-assembled HCV core virus-like particles induce a strong antibody immune response in sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 290:300–304. doi:[10.1006/bbrc.2001.6177](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6177)
2. Acosta-Rivero N, Poutou J, Álvarez-Lajonchere L, Guerra I, Aguilera Y, Musacchio A, Rodríguez A, Aguilar JC, Falcon V, Álvarez-Obregon JC, Soria Y, Torres D, Linares M, Pérez A, Morales-Grillo J, Dueñas-Carrera S (2009) Recombinant in vitro assembled hepatitis C virus core particles induce strong specific immunity enhanced by formulation with an oil-based adjuvant. *Biol Res* 42:41–56. doi:[10.4067/S0716-97602009000100005](https://doi.org/10.4067/S0716-97602009000100005)
3. Aguilar-Noriega D, Alvarez-Lajonchere L, Brown E, Santana FL, Dubuisson J, Wychowski C, Guerra I, Martínez-Donato G, Pérez A, Amador-Cañizares Y, Dueñas-Carrera S (2014) A chimeric protein encompassing hepatitis C virus epitopes is able to elicit both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Biotechnol Appl Biochem* 61:627–636. doi:[10.1002/bab.1223](https://doi.org/10.1002/bab.1223)
4. Alfonso V, Flichman DM, Sookoian S, Mbayed VA, Campos RH (2004) Evolutionary study of HVR1 of E2 in chronic hepatitis C virus infection. *J Gen Virol* 85:39–46. doi:[10.1099/vir.0.19403-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.19403-0)
5. Alonso M, Gutzman A, Mazin R, Pinzon CE, Reveiz L, Ghidinelli M (2015) Hepatitis C in key populations in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Int J Public Health* 60:789–798. doi:[10.1007/s00038-015-0708-5](https://doi.org/10.1007/s00038-015-0708-5)
6. Alvarado-Mora MV, Fernandez MFG, Gomes-Gouvêa MS, de Azevedo Neto RS, Carrilho FJ, Pinho JRR (2011) Hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV) and hepatitis delta (HDV) viruses in the Colombian population-how is the epidemiological situation? *PLoS One* 6(4):e18888. doi:[10.1371/journal.pone.0018888](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018888)
7. Amador-Cañizares Y, Martínez-Donato G, Álvarez-Lajonchere L, Vasallo C, Dausá M, Aguilar-Noriega D, Valenzuela C, Raíces I, Dubuisson J, Wychowski C, Cinza-Estévez Z, Castellanos M, Núñez M, Armas A, González Y, Revé I, Guerra I, Pérez Aguiar Á, Dueñas-Carrera S (2014) HCV-specific immune responses induced by CIGB-230 in combination with IFN- α plus ribavirin. *World J Gastroenterol* 20:148–162. doi:[10.3748/wjg.v20.i1.148](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.148)
8. Angulo J, Pino K, Pavez C, Biel F, Labbé P, Miquel JF, Soza A, López-Lastra M (2013) Genetic variations in host IL28B links to the detection of peripheral blood mononuclear cells-associated hepatitis C virus RNA in chronically infected patients. *J Viral Hepat* 20:263–272. doi:[10.1111/jvh.12076](https://doi.org/10.1111/jvh.12076)
9. Argentini C, Genovese D, Dettori S, Rapicetta M (2009) HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification. *Future Microbiol* 4:359–373. doi:[10.2217/fmb.09.8](https://doi.org/10.2217/fmb.09.8)
10. Armas D, Moreale J, González T (2013) Nuevos antivirales en la hepatitis C: Telaprevir y Boceprevir. *Biomedicina (B Aires)* 8(2):22–35

11. Attar BM, Van Thiel DH (2016) Hepatitis C virus: a time for decisions. Who should be treated and when? *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 6:33–40. doi:[10.4292/wjgpt.v7.i1.33](https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i1.33)
12. Bacardí D, Amador-Cañizares Y, Cosme K, Urquiza D, Suárez J, Marante J, Viña A, Vázquez A, Concepción J, Pupo M, Aldana L, Soria Y, Romero J, Madrigal R, Martínez L, Hernández L, González I, Dueñas-Carrera S (2009) Toxicology and biodistribution study of CIGB-230, a DNA vaccine against hepatitis C virus. *Hum Exp Toxicol* 28:479–491. doi:[10.1177/0960327109106438](https://doi.org/10.1177/0960327109106438)
13. Bartenschlager R, Lohmann V (2000) Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81:1631–1648. doi:[10.1099/0022-1317-81-7-1631](https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-7-1631)
14. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F (2013) The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* 11:482–496. doi:[10.1038/nrmicro3046](https://doi.org/10.1038/nrmicro3046)
15. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P (2011) Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19:95–103. doi:[10.1016/j.tim.2010.11.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.005)
16. Batista MN, Carneiro BM, Braga ACS, Rahal P (2014) Caffeine inhibits hepatitis C virus replication in vitro. *Arch Virol* 160:399–407. doi:[10.1007/s00705-014-2302-1](https://doi.org/10.1007/s00705-014-2302-1)
17. Bedoya JAP, Cortés Márquez MM, Cardona Arias JA (2012) Seroprevalence of markers of transfusion transmissible infections in blood bank in Colombia. *Rev Saude Publica* 46:950–959
18. Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, Wiedenmann B, Hopf U, Zeuzem S (2003) Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 37:600–609. doi:[10.1053/jhep.2003.50106](https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50106)
19. Bhattacharya D, Accola MA, Ansari IH, Striker R, Rehrauer WM (2011) Naturally occurring genotype 2b/1a hepatitis C virus in the United States. *Virol J* 8:458. doi:[10.1186/1743-422X-8-458](https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-458)
20. Biebricher CK, Eigen M (2005) The error threshold. *Virus Res* 107:117–127. doi:[10.1016/j.virusres.2004.11.002](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.002)
21. Bittar C, Jardim ACG, Yamasaki LHT, de Queiróz ATL, Carareto CMA, Pinho JRR, de Carvalho-Mello IMVG, Rahal P (2010) Genetic diversity of NS5A protein from hepatitis C virus genotype 3a and its relationship to therapy response. *BMC Infect Dis* 10:36. doi:[10.1186/1471-2334-10-36](https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-36)
22. Bolcic F, Laufer N, Torres C, Cassino L, Reynoso R, Quarleri J (2012) Longitudinal analysis of the 5'UTR, E2-PePHD and NS5A-PKRBD genomic regions of hepatitis C virus genotype 1a in association with the response to PEGinterferon and ribavirin therapy in HIV-coinfected patients. *Antivir Res* 95:72–81. doi:[10.1016/j.antiviral.2012.05.015](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.05.015)
23. Bukh J, Purcell RH, Miller RH (1992) Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4942–4946. doi:[10.1073/pnas.89.11.4942](https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4942)
24. Carneiro B, Braga ACS, Batista MN, Harris M, Rahal P (2015) Evaluation of canonical siRNA and Dicer substrate RNA for inhibition of hepatitis C virus genome replication: a comparative study. *PLoS One* 10:1–18. doi:[10.1371/journal.pone.0117742](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117742)
25. de Carvalho IMVG, Alves R, de Souza PAVM, da Silva EF, Mazo D, Carrilho FJ, Queiroz ATL, Pessoa MG (2014) Protease inhibitor resistance mutations in untreated Brazilian patients infected with HCV: novel insights about targeted genotyping approaches. *J Med Virol* 86:1714–1721. doi:[10.1002/jmv.24015](https://doi.org/10.1002/jmv.24015)
26. Castellanos M, Cinza Z, Dorta Z, Veliz G, Vega H, Lorenzo I, Ojeda S, Dueñas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Martínez G, Ferrer E, Limonta M, Linares M, Ruiz O, Acevedo B, Torres D, Márquez G, Herrera L, Arús E (2010) Immunization with a DNA vaccine candidate in chronic hepatitis C patients is safe, well tolerated and does not impair immune response induction after anti-hepatitis B vaccination. *J Gene Med* 12:107–116. doi:[10.1002/jgm.1407](https://doi.org/10.1002/jgm.1407)
27. Castells M, Bello G, Ifrán S, Pereyra S, Boschi S, Uriarte R, Cristina J, Colina R (2015) Epidemic history of major genotypes of hepatitis C virus in Uruguay. *Infect Genet Evol* 32:231–238. doi:[10.1016/j.meegid.2015.03.021](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.021)

28. Castilho MCB, Martins AN, Horbach IS, Perez RDM, Figueiredo FAF, Pinto PDTA, Nabuco LC, De Lima DB, Tanuri A, Porto LC, Ferreira Júnior ODC (2011) Association of hepatitis C virus NS5B variants with resistance to new antiviral drugs among untreated patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:968–975
29. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo ALD, Machado TMB, Lemaire DC, Mendes CMC, Pinho JR, Malta F, Lyra LGC, Lyra AC (2012) IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver Int* 32:476–486. doi:[10.1111/j.1478-3231.2011.02653.x](https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02653.x)
30. Césaire R, Martial J, Maier H, Kerob-Bauchet B, Bera O, Duchaud E, Brebion A, Pierre-Louis S (1999) Infection with GB virus C/hepatitis G virus among blood donors and hemophiliacs in Martinique, a Caribbean Island. *J Med Virol* 59:160–163. doi:[10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199910\)59:2<160::AID-JMV6>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199910)59:2<160::AID-JMV6>3.0.CO;2-Y)
31. Colina LR, María D, Mogdasy C, Cristina J, Uriarte R (2002) Caracterización molecular del virus de la hepatitis C en Montevideo-Uruguay. *Rev Méd Uruguay* 18:76–82
32. Colina R, Azambuja C, Uriarte R, Mogdasy C, Cristina J (1999) Evidence of increasing diversification of hepatitis C viruses. *J Gen Virol* 80:1377–1382
33. Colina R, Casane D, Vasquez S, García-Aguirre L, Chunga A, Romero H, Khan B, Cristina J (2004) Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 85:31–37. doi:[10.1099/vir.0.19472-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.19472-0)
34. Cooper P, Steiner-Pryor A, Scotti P, Delong D (1974) On the nature of poliovirus genetic recombinants. *J Gen Virol* 23:41–49. doi:[10.1099/0022-1317-23-1-41](https://doi.org/10.1099/0022-1317-23-1-41)
35. Cornberg M, Hardtke S, Port K, Manns MP, Wedemeyer H (2012) Hepatitis C standard of care. *Short Guid Hepat C*. doi:[10.1111/j.1945-5100.2009.tb02000.x](https://doi.org/10.1111/j.1945-5100.2009.tb02000.x)
36. Cornberg M, Wedemeyer H, Manns MP (2002) Treatment of chronic hepatitis C with PEGylated interferon and ribavirin. *Curr Gastroenterol Rep* 4:23–30. doi:[10.1007/s11894-002-0034-y](https://doi.org/10.1007/s11894-002-0034-y)
37. Craig PG, Bryan JP, Miller RE, Reyes L, Hakre S, Jaramillo R, Krieg RE (1993) The prevalence of hepatitis A, B and C infection among different ethnic groups in Belize. *Am J Trop Med Hyg* 49:430–434
38. Cristina J (2005) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus in the Latin American region. *J Clin Virol* 34(suppl 2):S1–S7
39. Cristina J, del Pilar MM, Moratorio G (2007) Hepatitis C virus genetic variability in patients undergoing antiviral therapy. *Virus Res* 127:185–194. doi:[10.1016/j.virusres.2007.02.023](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.023)
40. Cuevas JM, Gonzalez M, Torres-Puente M, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, González-Candelas F, Moya A (2009) The role of positive selection in hepatitis C virus. *Infect Genet Evol* 9:860–866. doi:[10.1016/j.meegid.2009.05.007](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.007)
41. Cuevas JM, González-Candelas F, Moya A, Sanjuán R (2009) Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *J Virol* 83:5760–5764. doi:[10.1128/JVI.00201-09](https://doi.org/10.1128/JVI.00201-09)
42. Cuevas JM, Torres-Puente M, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, Carnicer F, Del Olmo J, Ortega E, González-Candelas F, Moya A (2009) Combined therapy of interferon plus ribavirin promotes multiple adaptive solutions in hepatitis C virus. *J Med Virol* 81:650–656. doi:[10.1002/jmv.21460](https://doi.org/10.1002/jmv.21460)
43. Culasso ACA, Baré P, Aloisi N, Monzani MC, Corti M, Campos RH (2014) Intra-host evolution of multiple genotypes of hepatitis C virus in a chronically infected patient with HIV along a 13-year follow-up period. *Virology* 449:317–327. doi:[10.1016/j.virol.2013.11.034](https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.034)
44. Culasso ACA, Elizalde M, Campos RH, Barbini L (2012) Molecular survey of hepatitis C virus in the touristic city of Mar Del Plata Argentina. *PLoS One*. doi:[10.1371/journal.pone.0044757](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044757)
45. Culasso ACA, Farías A, Di Lello FA, Golemba MD, Ré V, Barbini L, Campos R (2014) Spreading of hepatitis C virus subtypes 1a and 1b through the central region of Argentina. *Infect Genet Evol* 26:32–40. doi:[10.1016/j.meegid.2014.05.008](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.008)

46. Demetriou VL, Kyriakou E, Kostrikis LG (2011) Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2 k/1b recombinant hepatitis c virus isolates. *Adv Virol* 2011:1–8. doi:[10.1155/2011/710438](https://doi.org/10.1155/2011/710438)
47. Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martín-Hernández AM, Sáiz JC, Escarmís C (1998) Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 4:521–527. doi:[10.3201/eid0404.980402](https://doi.org/10.3201/eid0404.980402)
48. Domingo E, Holland JJ (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51:151–178. doi:[10.1146/annurev.micro.51.1.151](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.151)
49. Dorta-Guridi Z, Dueñas-Carrera S, Arús-Soler ER, Castellanos-Fernández MI, Cinza-Estévez Z (2015) Therapeutic vaccines against the hepatitis C virus in the age of direct-acting antivirals. *Biotechnol Appl* 32:1121–1124. doi:[10.1016/B978-0-323-08375-1.00329-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08375-1.00329-2)
50. Du H, Qi Y, Hao F, Huang Y, Mao L, Ji S, Huang M, Qin C, Yan R, Zhu X, Zhang C (2012) Complex patterns of HCV epidemic in Suzhou: evidence for dual infection and HCV recombination in East China. *J Clin Virol* 54:207–212. doi:[10.1016/j.jcv.2012.04.017](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.04.017)
51. Dueñas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregón JC, Herrera A, Lorenzo LJ, Pichardo D, Morales J (2000) A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine* 19:992–997. doi:[10.1016/S0264-410X\(00\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00209-7)
52. Echeverría N, Moratorio G, Cristina J, Moreno P (2015) Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J Hepatol* 7:831–845. doi:[10.4254/wjh.v7.i6.831](https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i6.831)
53. Eltahlia AA, Luciani F, White PA, Lloyd AR, Bull RA (2015) Inhibitors of the hepatitis C virus polymerase; mode of action and resistance. *Viruses* 7:5206–5224. doi:[10.3390/v7102868](https://doi.org/10.3390/v7102868)
54. Echeverría N, Betancour G, Gámbaro F, Hernández N, López P, Chiodi D, Sánchez A, Boschi S, Fajardo A, Soñora M, Moratorio G, Cristina J, Moreno P (2016) Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: their relevance for developing countries. *Virus Res* 223:140–146. doi:[10.1016/j.virusres.2016.07.008](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.07.008)
55. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C (1995) Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b: sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 96:224–230. doi:[10.1172/JCI118025](https://doi.org/10.1172/JCI118025)
56. Fabrício-Silva GM, Poschetzky BS, Perez RDM, Dos Santos RC, Cavalini LT, Porto LC (2015) Association of cytokine gene polymorphisms with hepatitis C virus infection in a population from Rio de Janeiro, Brazil. *Hepatic Med Evid Res* 7:71–79
57. Fernandes TA, Manvar D, JLO D, Basu A, Nichols DB, Kaushik-Basu N, PRR C (2016) 5-Carba-pterocarpens: a new scaffold with anti-HCV activity. *Eur J Med Chem* 112:33–38. doi:[10.1016/j.ejmech.2016.02.010](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.010)
58. di Filippo D, Cortes-Mancera F, Beltran M, Arbelaez MP, Jaramillo S, Restrepo JC, Correa G, Navas M-C (2012) Molecular characterization of hepatitis C virus in multi-transfused Colombian patients. *Virology* 9:242. doi:[10.1186/1743-422X-9-242](https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-242)
59. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM (2000) Principles of virology, molecular biology, pathogenesis, and control. *Lancet Infect Dis* 9:471–472. doi:[10.1016/S1473-3099\(09\)70195-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70195-1)
60. Fonseca-Coronado S, Escobar-Gutiérrez A, Ruiz-Tovar K, Cruz-Rivera MY, Rivera-Orsorio P, Vazquez-Pichardo M, Carpio-Pedroza JC, Ruíz-Pacheco JA, Cazares F, Vaughan G (2012) Specific detection of naturally occurring hepatitis C virus mutants with resistance to telaprevir and boceprevir (protease inhibitors) among treatment-naïve infected individuals. *J Clin Microbiol* 50:281–287. doi:[10.1128/JCM.05842-11](https://doi.org/10.1128/JCM.05842-11)
61. Fonseca-Coronado S, Vaughan G, Cruz-Rivera MY, Carpio-Pedroza JC, Ruiz-Tovar K, Ruiz-Pacheco JA, Escobar-Gutiérrez A (2011) Interleukin-28B genotyping by melt-mismatch amplification mutation assay PCR analysis using single nucleotide polymorphisms rs12979860 and rs8099917, a useful tool for prediction of therapy response in hepatitis C patients. *J Clin Microbiol* 49:2706–2710. doi:[10.1128/JCM.00877-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00877-11)

62. Friebe P, Bartenschlager R (2009) Role of RNA structures in genome terminal sequences of the hepatitis C virus for replication and assembly. *J Virol* 83:11989–11995. doi:[10.1128/JVI.01508-09](https://doi.org/10.1128/JVI.01508-09)
63. Frost SDW, Brouwer KC, Firestone Cruz MA, Ramos R, Ramos ME, Lozada RM, Magis-Rodriguez C, Strathdee SA (2006) Respondent-driven sampling of injection drug users in two U.S.-Mexico border cities: recruitment dynamics and impact on estimates of HIV and syphilis prevalence. *J Urban Heal* doi:[10.1007/s11524-006-9104-z](https://doi.org/10.1007/s11524-006-9104-z)
64. Galvan CA, Elbarcha OC, Fernandez EJ, Beltramo DM, Soria NW (2012) Distribution of polymorphisms in cytochrome P450 2B6, histocompatibility complex P5, chemokine coreceptor 5, and interleukin 28B genes in inhabitants from the central area of Argentina. *Genet Test Mol Biomarkers* 16:130–133. doi:[10.1089/gtmb.2011.0058](https://doi.org/10.1089/gtmb.2011.0058)
65. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature (Lond)* 461:399–401. doi:[10.1038/nature08309](https://doi.org/10.1038/nature08309)
66. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB (2011) An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 54:1433–1444. doi:[10.1002/hep.24641](https://doi.org/10.1002/hep.24641)
67. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB (2009) Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49:1335–1374. doi:[10.1002/hep.22759](https://doi.org/10.1002/hep.22759)
68. Gismondi MI, Becker PD, Valva P, Guzmán CA, Preciado MV (2006) Phylogenetic analysis of previously nontypeable hepatitis C virus isolates from Argentina. *J Clin Microbiol* 44:2229–2232. doi:[10.1128/JCM.02569-05](https://doi.org/10.1128/JCM.02569-05)
69. Gismondi MI, Díaz Carrasco JM, Valva P, Becker PD, Guzmán CA, Campos RH, Preciado MV (2013) Dynamic changes in viral population structure and compartmentalization during chronic hepatitis C virus infection in children. *Virology* 447:187–196. doi:[10.1016/j.virol.2013.09.002](https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.09.002)
70. Gismondi MI, Staendner LH, Grinstein S, Guzmán CA, Preciado MV (2004) Hepatitis C virus isolates from Argentina disclose a novel genotype 1-associated restriction pattern. *J Clin Microbiol* 42:1298–1301. doi:[10.1128/JCM.42.3.1298-1301.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1298-1301.2004)
71. Golemba MD, Culasso ACA, Villamil FG, Bare P, Gadano A, Ridruejo E, Martínez A, Di Lello FA, Campos RH (2013) Hepatitis C virus diversification in Argentina: comparative analysis between the large city of Buenos Aires and the small rural town of O'Brien. *PLoS One*. doi:[10.1371/journal.pone.0084007](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084007)
72. Gonzalez-Aldaco K, Rebello Pinho JR, Roman S, Gleyzer K, Fierro NA, Oyakawa L, Ramos-Lopez O, Ferraz Santana RA, Sitnik R, Panduro A (2016) Association with spontaneous hepatitis C viral clearance and genetic differentiation of IL28B/IFNL4 haplotypes in populations from Mexico. *PLoS One* 11:e0146258. doi:[10.1371/journal.pone.0146258](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146258)
73. González-Horta EE, Marante J, Amador-Cañizares Y, Álvarez-Lajonchere L, Guerra I, Martínez-Donato G, Dueñas-Carrera S (2011) Analysis of hepatitis C virus core encoding sequences in chronically infected patients reveals mutability, predominance, genetic history and potential impact on therapy of Cuban genotype 1b isolates. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15:1320–1327
74. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H (2014) Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 61:S45–S57. doi:[10.1016/j.jhep.2014.07.027](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.027)
75. Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel-Fabiani F (2007) Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13:2416–2426
76. Gutiérrez JP, Sucilla-Pérez H, Conde-González CJ, Izazola JA, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M (2016) Disminución de la seroprevalencia de hepatitis C en México: resultados de la Ensanut 2012. *Salud Publica Mex* 58:25–32

77. Hakre S, Arteaga G, Núñez AE, Bautista CT, Bolen A, Villarroel M, Peel SA, Paz-Bailey G, Scott PT, Pascale JM (2013) Prevalence of HIV and other sexually transmitted infections and factors associated with syphilis among female sex workers in Panama. *Sex Transm Infect* 89:156–164. doi:[10.1136/sextrans-2012-050557](https://doi.org/10.1136/sextrans-2012-050557)
78. Hanus JS, Ceretta LB (2015) Major article incidence of hepatitis C in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 48:665–673
79. Hoffmann L, Faffe DS, Lima JFC, Capitanio TA, Cabral BCA, Ürményi TP, Coelho HSM, Rondinelli E, Villela-Nogueira CA, Silva R (2015) No correspondence between resistance mutations in the HCV-NS3 protease at baseline and early telaprevir-based triple therapy. *BBA Clin* 3:146–151. doi:[10.1016/j.bbaci.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.bbaci.2015.01.004)
80. Hoffmann L, Ramos JA, de Souza EV, de Araújo Ramos AL, Villela-Nogueira CA, Urményi TP, Tanuri A, Rondinelli E, Silva R (2013) Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Virology* 453:57–67. doi:[10.1016/j.virus.2013.10.017](https://doi.org/10.1016/j.virus.2013.10.017)
81. Hoofnagle JH (2002) Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36(5 suppl 1):S21–S29. doi:[10.1053/jhep.2002.36227](https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36227)
82. Hoshino H, Hino K, Miyakawa H, Takahashi K, Akbar SMF, Mishiroy S (2012) Inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noted by discrepancies between immunoassay and sequencing. *J Med Virol* 84:1018–1024. doi:[10.1002/jmv.23300](https://doi.org/10.1002/jmv.23300)
83. Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, Perle KL, Chivukula RR, Mao H, Wei M, Clark KR, Mendell JR, Caligiuri MA, Jacob ST, Mendell JT, Ghoshal K (2012) Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* 122:2871–2883. doi:[10.1172/JCI63539](https://doi.org/10.1172/JCI63539)
84. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R, George J, Rizzetto M, Shouval D, Sola R, Terg RA, Yoshida EM, Adda N, Bengtsson L, Sankoh AJ, Kieffer TL, George S, Kauffman RS, Zeuzem S (2011) Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 364:2405–2416. doi:[10.1056/NEJMoa1012912](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012912)
85. Jardim ACG, Bittar C, Matos RPA, Yamasaki LHT, Silva RA, Pinho JRR, Fachini RM, Carareto CMA, de Carvalho-Mello IMVG, Rahal P (2013) Analysis of HCV quasispecies dynamic under selective pressure of combined therapy. *BMC Infect Dis* 13:61. doi:[10.1186/1471-2334-13-61](https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-61)
86. Jardim ACG, Igloi Z, Shimizu JF, Santos VAFM, Felipe LG, Mazzeu BF, Amako Y, Furlan M, Harris M, Rahal P (2015) Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. *Antivir Res* 115:39–47. doi:[10.1016/j.antiviral.2014.12.018](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.018)
87. Jaspe RC, Sulbarán YF, Loureiro CL, Martínez N, Devesa M, Rodríguez Y, Torres JR, Rangel HR, Pujol FH (2014) Genetic diversity of hepatitis B virus and hepatitis C virus in human immunodeficiency virus type 1-co-infected patients from Venezuela. *J Med Microbiol* 63:1099–1104. doi:[10.1099/jmm.0.067496-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.067496-0)
88. Jaspe RC, Sulbarán YF, Sulbarán MZ, Loureiro CL, Rangel HR, Pujol FH (2012) Prevalence of amino acid mutations in hepatitis C virus core and NS5B regions among Venezuelan viral isolates and comparison with worldwide isolates. *Virology* 453:214–224. doi:[10.1016/j.virus.2013.10.017](https://doi.org/10.1016/j.virus.2013.10.017)
89. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309(5740):1577–1581. doi:[10.1126/science.1113329](https://doi.org/10.1126/science.1113329)
90. Kageyama S, Agdamag DM, Alesna ET, Leañó PS, Heredia AML, Abellanosa-Tac-An IP, Jereza LD, Tanimoto T, Yamamura JI, Ichimura H (2006) A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol* 78:1423–1428. doi:[10.1002/jmv.20714](https://doi.org/10.1002/jmv.20714)
91. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnus LO (2002) A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 76:4034–4043. doi:[10.1128/JVI.76.8.4034-4043.2002](https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.4034-4043.2002)

92. Kanda T, Yokosuka O, Omata M (2013) Treatment of hepatitis C virus infection in the future. *Clin Transl Med* 2:9. doi:[10.1186/2001-1326-2-9](https://doi.org/10.1186/2001-1326-2-9)
93. Keyvani H, Fazlalipour M, Monavari SHR, Mollaie HR (2012) Hepatitis C virus-proteins, diagnosis, treatment and new approaches for vaccine development. *Asian Pac J Cancer Prev* 13:5931–5949. doi:[10.7314/APJCP.2012.13.12.5917](https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.12.5917)
94. Kieffer TL, Sarrazin C, Miller JS, Welker MW, Forestier N, Reesink HW, Kwong AD, Zeuzem S (2007) Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology* 46:631–639. doi:[10.1002/hep.21781](https://doi.org/10.1002/hep.21781)
95. Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Murray MG, Lau JYN, Doudna JA (1999) The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol* 292:513–529. doi:[10.1006/jmbi.1999.3095](https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3095)
96. Kurbanov F, Tanaka Y, Avazova D, Khan A, Sugauchi F, Kan N, Kurbanova-khudayberganova D, Khikmatullaeva A, Musabaev E, Mizokami M (2008) Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. *Hepatol Res* 38:457–464. doi:[10.1111/j.1872-034X.2007.00293.x](https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00293.x)
97. De la Vega AP, Alarcón DA, Gómez-Jeria JS (2013) Quantum chemical study of the relationships between electronic structure and pharmacokinetic profile, inhibitory strength toward hepatitis C virus NS5B polymerase and HCV replicons of indole-based compounds. *J Chil Chem Soc* 4:2148–2157
98. Lampe E, Espírito-Santo MP, Martins RMB, Bello G (2010) Epidemic history of hepatitis C virus in Brazil. *Infect Genet Evol* 10:886–895. doi:[10.1016/j.meegid.2010.05.010](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.05.010)
99. Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-Da-Silva A, Martins RMB, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, De Martinez AMB, Basso R, Rebello Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini DA, Fujishima MAT, Bello G (2013) Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther* 18:435–444. doi:[10.3851/IMP2606](https://doi.org/10.3851/IMP2606)
100. Lee YM, Lin HJ, Chen YJ, Lee CM, Wang SF, Chang KY, Chen TL, Liu HF, Chen YMA (2010) Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form-2b6w. *J Med Virol* 82:57–68. doi:[10.1002/jmv.21658](https://doi.org/10.1002/jmv.21658)
101. Legrand-Abравanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, Pasquier C, Izopet J (2007) New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol* 81:4357–4362. doi:[10.1128/JVI.02639-06](https://doi.org/10.1128/JVI.02639-06)
102. Di Lello FA, Farias AA, Culasso AC, Perez PS, Pisano MB, Contigiani MS, Campos RH, Re VE (2015) Changing epidemiology of hepatitis C virus genotypes in the central region of Argentina. *Arch Virol* 160:909–915. doi:[10.1007/s00705-015-2390-6](https://doi.org/10.1007/s00705-015-2390-6)
103. Di Lello FA, Pineiro YLFG, Munoz G, Campos RH (2009) Diversity of hepatitis B and C viruses in Chile. *J Med Virol* 81:1887–1894. doi:[10.1002/jmv.21607](https://doi.org/10.1002/jmv.21607)
104. Lisboa-Neto G, Noble CF, Rebello Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvea MS, Alvarado-Mora MV, Da Silva MH, Leite AGB, Piccoli LZ, Rodrigues FK, Carrilho FJ, Mendes-Correa MC (2015) Resistance mutations are rare among protease inhibitor treatment-naive hepatitis C genotype-1 patients with or without HIV coinfection. *Antivir Ther* 20:281–287. doi:[10.3851/IMP2873](https://doi.org/10.3851/IMP2873)
105. Lopes CLR, Teles SA, Espírito-Santo MP, Lampe E, Rodrigues FP, Motta-Castro ARC, Marinho TA, Reis NR, Silva ÁMC, Martins RMB (2009) Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. *Rev Saude Publica* 43:43–50. doi:[10.1590/S0034-89102009000800008](https://doi.org/10.1590/S0034-89102009000800008)
106. López L, López P, Arago A, Rodríguez I, López J, Lima E, Insagaray J, Bentancor N (2005) Risk factors for hepatitis B and C in multi-transfused patients in Uruguay. *J Clin Virol* 34(suppl 2):S69–S74
107. Lopez-Balderas N, Bravo E, Camara M, Hernandez-Romano P (2015) Seroprevalence of hepatitis viruses and risk factors in blood donors of Veracruz, Mexico. *J Infect Dev Ctries* 9:274–282. doi:[10.3855/jidc.4812](https://doi.org/10.3855/jidc.4812)

108. Lopez-Colombo A, Melendez-Mena D, Seden-Monge V, Camacho-Hernandez JR, Vazquez-Cruz E, Morales-Hernandez ER, Sosa-Jurado F, Marquez-Dominguez L, Santos-Lopez G (2014) Hepatitis C virus infection in patients and family members attending two primary care clinics in Puebla, Mexico. *Ann Hepatol* 13:746–752
109. De los Ríos R, Miyahira J, Colichon A, Cieza J (1997) Prevalencia de anticuerpos anti-hepatitis C en pacientes en hemodiálisis crónica. *Rev Med Hered* 8:67–71
110. Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M (2006) Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 55:1350–1359. doi:[10.1136/gut.2005.076646](https://doi.org/10.1136/gut.2005.076646)
111. Manvar D, Fernandes TA, Domingos JLO, Baljinnnyam E, Basu A, Junior EFT, PRR C, Kaushik-Basu N (2015) Synthesis and biological evaluation of α -aryl- α -tetralone derivatives as hepatitis C virus inhibitors. *Eur J Med Chem* 93C:51–54. doi:[10.1016/j.ejmech.2015.01.057](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.01.057)
112. Marinovich S, Lavorato C, Bisigniano L, Soratti C, Krogh DH, Celia E, Fernández V, Tagliafichi V, Diez GR, Fayad A, Haber V (2014) Registro Argentino de Diálisis Crónica SAN-INCUCAI 2013. Buenos Aires, Argentina
113. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66:3225–3229
114. Martial J, Morice Y, Abel S, Cabié A, Rat C, Lombard F, Edouard A, Pierre-Louis S, Garsaud P, Béra O, Chout R, Gordien E, Deny P, Césaire R (2004) Hepatitis C virus (HCV) genotypes in the Caribbean island of Martinique: evidence for a large radiation of HCV-2 and for a recent introduction from Europe of HCV-4. *J Clin Microbiol* 42:784–791. doi:[10.1128/JCM.42.2.784-791.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.784-791.2004)
115. Martínez-Donato G, Amador-Cañizares Y, Alvarez-Lajonchere L, Guerra I, Pérez A, Dubuisson J, Wychowsk C, Musacchio A, Aguilar D, Dueñas-Carrera S (2014) Neutralizing antibodies and broad, functional T cell immune response following immunization with hepatitis C virus proteins-based vaccine formulation. *Vaccine* 32:1720–1726. doi:[10.1016/j.vaccine.2014.01.046](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.046)
116. Martínez-Donato G, Capdesuñer Y, Acosta-Rivero N, Rodríguez A, Morales-Grillo J, Martínez E, González M, Alvarez-Obregon JC, Dueñas-Carrera S (2007) Multimeric HCV E2 protein obtained from *Pichia pastoris* cells induces a strong immune response in mice. *Mol Biotechnol* 35:225–235. doi:[10.1007/s12033-007-9002-y](https://doi.org/10.1007/s12033-007-9002-y)
117. Martínez-Donato G, Musacchio A, Alvarez-Lajonchere L, Acosta-Rivero N, Amador Y, Guerra I, Peña D, Pérez A, Castro J, Puentes P, Soria Y, Cosme K, Sanchez J, Dueñas-Carrera S (2010) Ratio of HCV structural antigens in protein-based vaccine formulations is critical for functional immune response induction. *Biotechnol Appl Biochem* 56:111–118. doi:[10.1042/BA20090216](https://doi.org/10.1042/BA20090216)
118. Martínez-Gómez LE, Chávez-Tapia NC, Burguete-García AI, Aguilar-Olivos N, Madrid-Marina V, Román-Bahena M, Orbe-Orihuela C, Misael U, Méndez-Sánchez N (2012) IL28B polymorphisms predict the response to chronic hepatitis C virus infection treatment in a Mexican population. *Ann Hepatol* 11:876–881
119. Mendes-Correa MC, Cavalheiro NP, Mello C, Barone AA, Gianini RJ (2008) Genotypic distribution of hepatitis C among hepatitis C and HIV co-infected patients in Brazil. *Int J STD AIDS* 19:595–599. doi:[10.1258/ijsa.2007.007183](https://doi.org/10.1258/ijsa.2007.007183)
120. Monsalve-Castillo F, Chacin-Bonilla L, Atencio RJ, Espinoza LP, Costa-Leon L, Echevarria JM (2007) Low prevalence of hepatitis C virus infection in Amerindians from Western Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:107–110
121. Mora MVA, Romano CM, Gomes-Gouvea MS, Gutierrez MF, Carrilho FJ, Pinho JRR (2010) Molecular characterization, distribution, and dynamics of hepatitis C virus genotypes in blood donors in Colombia. *J Med Virol* 82:1889–1898. doi:[10.1002/jmv.21908](https://doi.org/10.1002/jmv.21908)
122. Moratorio G, Martínez M, Gutiérrez MF, González K, Colina R, López-Tort F, López L, Recarey R, Schijman AG, Moreno MP, García-Aguirre L, Manascero AR, Cristina J (2007) Evolution of naturally occurring 5'-non-coding region variants of hepatitis C virus in human populations of the South American region. *Virol J* 4:79. doi:[10.1186/1743-422X-4-79](https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-79)

123. Moreau I, Hegarty S, Levis J, Sheehy P, Crosbie O, Kenny-Walsh E, Fanning LJ (2006) Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland. *Virology* 3:95. doi:[10.1186/1743-422X-3-95](https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-95)
124. Morel V, Descamps V, François C, Fournier C, Brochet E, Capron D, Duverlie G, Castelain S (2010) Emergence of a genomic variant of the recombinant 2 k/1b strain during a mixed hepatitis C infection: a case report. *J Clin Virol* 47:382–386. doi:[10.1016/j.jcv.2010.01.011](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.01.011)
125. Moreno MP, Casane D, López L, Cristina J (2006) Evidence of recombination in quasispecies populations of a hepatitis C Virus patient undergoing anti-viral therapy. *Virology* 3:87. doi:[10.1186/1743-422X-3-87](https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-87)
126. Moreno P, Alvarez M, López L, Moratorio G, Casane D, Castells M, Castro S, Cristina J, Colina R (2009) Evidence of recombination in hepatitis C virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virology* 6:203. doi:[10.1186/1743-422X-6-203](https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-203)
127. Muñoz G, Velasco M, Thiers V, Hurtado C, Brahm J, Larrondo-Lillo M, Guglielmetti A, Smok G, Brechet C, Lamas E (1998) Prevalence and genotypes of hepatitis C virus in blood donors and in patients with chronic liver disease and hepatocarcinoma in a Chilean population. *Rev Med Chil* 126:1035–1042
128. Muñoz-Espinosa LE, Trujillo-Trujillo ME, Martínez-Macías RF, Panduro A, Rivas-Estilla AM, Fierro NA, Silvera-Linares AL, Torres-Valadez R, Cordero-Pérez P, González-Aldaco K, Chen-López CY, José-Abrego A, Zuñiga-Noriega JR, Gutiérrez-Ruiz MC, Roman S (2015) Increase of drug use and genotype 3 in HCV-infected patients from Central West and Northeast Mexico. *Ann Hepatol* 14:642–651
129. Mutimer D, Aghemo A, Diepolder H, Negro F, Robaey G, Ryder S, Zoulim F, Peck M, Craxi A, Fried M, Zeuzem S (2014) EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 60:392–420. doi:[10.1016/j.jhep.2011.02.023](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.023)
130. Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Shirasawa H, Yokosuka O (2014) Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World J Gastroenterol* 20:2902–2912. doi:[10.3748/wjg.v20.i11.2902](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i11.2902)
131. Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Ferreira SC, Alencar CS, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE, Salles NA, Mendrone A, Sabino EC (2014) HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 9:e86413. doi:[10.1371/journal.pone.0086413](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086413)
132. Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Romano CM, Alencar CS, Ferreira SC, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE, Salles NA, Mendrone-Junior A, Sabino EC (2015) Phylogenetic analysis of the emergence of main hepatitis C virus subtypes in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 19:473–478. doi:[10.1016/j.bjid.2015.06.010](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.06.010)
133. Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus ADME, Haagmans BL (2006) Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol* 80:7569–7577. doi:[10.1128/JVI.00312-06](https://doi.org/10.1128/JVI.00312-06)
134. Ottosen S, Parsley TB, Yang L, Zeh K, van Doorn L-J, van der Veer E, Raney AK, Hodges MR, Patick AK (2015) *In vitro* antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of Miravirsin, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob Agents Chemother* 59:599–608. doi:[10.1128/AAC.04220-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04220-14)
135. PAHO (2013) Supply of blood for transfusion in Latin American and Caribbean countries 2010 and 2011. Washington, DC
136. Palmer BA, Moreau I, Levis J, Harty C, Crosbie O, Kenny-Walsh E, Fanning LJ (2012) Insertion and recombination events at hypervariable region 1 over 9.6 years of hepatitis C virus chronic infection. *J Gen Virol* 93:2614–2624. doi:[10.1099/vir.0.045344-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.045344-0)
137. Paltanin LF, Reiche EMV (2002) Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil. *Rev Saude Publica* 36:393–399
138. Pando MA, Berini C, Bibini M, Fernandez M, Reinaga E, Maulen S, Marone R, Biglione M, Montano SM, Bautista CT, Weissenbacher M, Sanchez JL, Avila MM (2006) Prevalence of HIV and other sexually transmitted infections among female commercial sex workers in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 74:233–238

139. Panduro A, Roman S, Khan A, Tanaka Y, Kurbanov F, Martinez-Lopez E, Campollo O, Hernandez-Nazara Z, Mizokami M (2010) Molecular epidemiology of hepatitis C virus genotypes in West Mexico. *Virus Res* 151:19–25. doi:[10.1016/j.virusres.2010.03.009](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.03.009)
140. Pantiri K, Westerhout KY, Obando CA (2015) Cost-effectiveness analysis of simeprevir and sofosbuvir combination therapy for the treatment of genotype 1 HCV patients in the Dominican Republic. *Value Health* 18:A872. doi:[10.1016/j.jval.2015.09.021](https://doi.org/10.1016/j.jval.2015.09.021)
141. Pawlotsky JM (2006) Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 299:261–284. doi:[10.1007/3-540-26397-7_9](https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_9)
142. Pawlotsky JM (2014) New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* 146:1176–1192. doi:[10.1053/j.gastro.2014.03.003](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.003)
143. Pawlotsky J-M (2003) The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis* 16:587–592. doi:[10.1097/01.qco.0000104300.87920.03](https://doi.org/10.1097/01.qco.0000104300.87920.03)
144. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D (1998) Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 72:2795–2805
145. Pereira LMMB, Martelli CMT, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MRA, Figueiredo GM, Montarroyos UR, Braga C, Turchi MD, Coral G, Crespo D, Lima MLC, Alencar LCA, Costa M, dos Santos AA, Ximenes RAA (2013) Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 13:60. doi:[10.1186/1471-2334-13-60](https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-60)
146. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E (2012) Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:254–261
147. Peres-da-Silva A, De Almeida AJ, Lampe E (2015) NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naïve patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother* 70:726–730. doi:[10.1093/jac/dku462](https://doi.org/10.1093/jac/dku462)
148. Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CUT (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12:67–83. doi:[10.1101/gad.12.1.67](https://doi.org/10.1101/gad.12.1.67)
149. Piñeiro D, Martínez-Salas E (2012) RNA structural elements of hepatitis C virus controlling viral RNA translation and the implications for viral pathogenesis. *Viruses* 4:2233–2250. doi:[10.3390/v4102233](https://doi.org/10.3390/v4102233)
150. Pinheiro AS, Duarte JBC, Alves CN, de Molfetta FA (2015) Virtual screening and molecular dynamics simulations from a bank of molecules of the Amazon region against functional NS3-4A protease-helicase enzyme of hepatitis C virus. *Appl Biochem Biotechnol* 176(6):1709–1721. doi:[10.1007/s12010-015-1672-5](https://doi.org/10.1007/s12010-015-1672-5)
151. del Pino N, Oubiña JR, Rodríguez-Frías F, Esteban JI, Buti M, Otero T, Gregori J, García-Cehic D, Camos S, Cubero M, Casillas R, Guárdia J, Esteban R, Quer J (2013) Molecular epidemiology and putative origin of hepatitis C virus in random volunteers from Argentina. *World J Gastroenterol* 19:5813–5827. doi:[10.3748/wjg.v19.i35.5813](https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i35.5813)
152. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J (1998) Randomised trial of interferon alpha1;2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha1;2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 352:1426–1432. doi:[10.1016/S0140-6736\(98\)07124-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07124-4)
153. Puig-Basagoiti F, Fornis X, Furčić I, Ampurdanés S, Giménez-Barcons M, Franco S, Sánchez-Tapias JM, Saiz JC (2005) Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and non-responder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gen Virol* 86:1067–1075. doi:[10.1099/vir.0.80526-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.80526-0)
154. Pujol FH, Loureiro CL (2007) Replacement of hepatitis C virus genotype 1b by genotype 2 over a 10-year period in Venezuela. *J Clin Gastroenterol* 41:518–520
155. Rallón NI, Naggie S, Benito JM, Medrano J, Restrepo C, Goldstein D, Shianna KV, Vispo E, Thompson A, McHutchison J, Soriano V (2010) Association of a single nucleotide

- polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 24:F23–F29. doi:[10.1097/QAD.0b013e3283391d6d](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283391d6d)
156. Ramos JA, de Ramos ALA, Hoffmann L, de Perez RM, HSM C, Ürményi TP, Silva R, Rondinelli E, Vilella-Nogueira CA (2012) A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-rib. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:888–892. doi:[10.1590/S0074-02762012000700008](https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000700008)
 157. Ramos JA, Silva R, Hoffmann L, Ramos AL, Cabello PH, Urmenyi TP, Vilella-Nogueira CA, Lewis-Ximenez L, Rondinelli E (2012) Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro. *BMC Res Notes* 5:508. doi:[10.1186/1756-0500-5-508](https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-508)
 158. Ré V, Contigiani M, Yoshida CFT, Lampe E (2007) Identification of hepatitis C virus subtype 2c by sequencing analysis in patients from Córdoba, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:995–998. doi:[10.1590/S0074-02762007000800016](https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000800016)
 159. Ribeiro LC, Souto FJD, Do Espírito-Santo MP, G-Oliveira R, Lampe E (2009) An autochthonous case of hepatitis C virus genotype 5a in Brazil: phylogenetic analysis. *Arch Virol* 154:665–670. doi:[10.1007/s00705-008-0279-3](https://doi.org/10.1007/s00705-008-0279-3)
 160. Ridruejo E (2012) Predictors of response to chronic hepatitis C treatment. *Futur Virol* 11:1089–1101
 161. Ridruejo E, Solano A, Delettieres D, Martínez A, Marciano S, Mandó OG, Galdame O, Gadano A, Silva MO, Adrover R, Cocozzella D (2011) Interleukin-28B predicts Svr in Latin American hepatitis C genotype 1 patients treated with Peg IFN and ribavirin. *J Hepatol* 54:S465. doi:[10.1016/S0168-8278\(11\)61179-3](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(11)61179-3)
 162. Ríos-Ibarra CP, Lozano-Sepulveda S, Muñoz-Espinosa L, Rincón-Sánchez AR, Cordova-Fletes C, Rivas-Estilla AMG (2014) Downregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression is implicated in the antiviral activity of acetylsalicylic acid in HCV-expressing cells. *Arch Virol* 159:3321–3328. doi:[10.1007/s00705-014-2201-5](https://doi.org/10.1007/s00705-014-2201-5)
 163. Robaldo L, Berzal-Herranz A, Montserrat JM, Iribarren AM (2014) Activity of core-modified 10-23 DNazymes against HCV. *Chem Med Chem* 9:2172–2177. doi:[10.1002/cmdc.201402222](https://doi.org/10.1002/cmdc.201402222)
 164. MCM V, Rodríguez LL d l A, MCM V, Corredor MB, Frómata SS, Hernández JM, Carrera SD, Wong MS, Samada M, Núñez MB, Alonso LV, da Silva Filho HP, Hübschen JM, Reis MG (2012) HCV genotype determination in monoinfected and HIV co-infected patients in Cuba. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106:711–717. doi:[10.1016/j.trstmh.2012.08.001](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.08.001)
 165. Sanchez JL, Sjogren MH, Callahan JD, Watts DM, Lucas C, Abdel-Hamid M, Constantine NT, Hyams KC, Hinostroza S, Figueroa-Barrios R, Cuthie JC (2000) Hepatitis C in Peru: risk factors for infection, potential iatrogenic transmission, and genotype distribution. *Am J Trop Med Hyg* 63:242–248
 166. Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Müh U, Welker M, Wincheringer D, Zhou Y, Chu HM, Lin C, Weegink C, Reesink H, Zeuzem S, Kwong AD (2007) Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132:1767–1777. doi:[10.1053/j.gastro.2007.02.037](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.037)
 167. Sede M, Jones LR, Moretti F, Laufer N, Quarleri J (2014) Inter- and intra-host variability of hepatitis C virus genotype 1a hypervariable envelope coding domains followed for a 4-11 year of human immunodeficiency virus coinfection and highly active antiretroviral therapy. *Virology* 471:19–28. doi:[10.1016/j.virol.2014.09.016](https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.016)
 168. Sede M, Laufer N, Ojeda D, Gun A, Cahn P, Quarleri J (2013) Analysis of sequences of hepatitis C virus NS5A genotype 1 in HIV-coinfected patients with a null response to nitazoxanide or peg-interferon plus ribavirin. *Arch Virol* 158:1907–1915. doi:[10.1007/s00705-013-1687-6](https://doi.org/10.1007/s00705-013-1687-6)
 169. Sede MM, Laufer NL, Quarleri J (2015) Previous failure of interferon-based therapy does not alter the frequency of HCV NS3 protease or NS5B polymerase inhibitor resistance-associated variants: longitudinal analysis in HCV/HIV co-infected patients. *Int J Antimicrob Agents* 46:219–224. doi:[10.1016/j.ijantimicag.2015.04.011](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.011)

170. Sentandreu V, Jiménez-Hernández N, Torres-Puente M, Bracho MA, Valero A, Gosalbes MJ, Ortega E, Moya A, González-Candelas F (2008) Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PLoS One*. doi:[10.1371/journal.pone.0003239](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003239)
171. Sherman KE (2012) Managing adverse effects and complications in completing treatment for hepatitis C virus infection. *Top Antivir Med* 20:125–128
172. Da Silva Conde SRS, Soares Monteiro JCM, Silva Dos Santos BT, Fonseca Filgueiras NK, De Almeida Lins PA, Bonfim Freitas F, Da Silva GE, Demachki S, Ferreira De Araújo MT, Ishak R, Rosário Vallinoto AC (2014) SNP rs8099917 in gene IL28B might be associated with risk of chronic infection by HCV but not with response to treatment. *Biomed Res Int* 748606. doi:[10.1155/2014/748606](https://doi.org/10.1155/2014/748606)
173. Silva CM, Costi C, Krug LP, Ramos AB, Grandi T, Gandolfi VL, Menezes ME, Ocampos M, Niel C, Rossetti ML (2007) High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:867–870. doi:[10.1590/S0074-02762007005000122](https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000122)
174. Simmonds P (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* 85:3173–3188. doi:[10.1099/vir.0.80401-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.80401-0)
175. Sixtos-Alonso MS, Avalos-Martinez R, Sandoval-Salas R, Dehesa-Violante M, García-Juarez I, Chávez-Ayala A, Domínguez-López A, Vargas-Vorácková F, Toapanta-Yanchapaxi L, Amezcua-Guerra LM, Uribe M, Sánchez-Ávila JF (2015) A genetic variant in the interleukin 28B gene as a major predictor for sustained virologic response in chronic hepatitis C virus infection. *Arch Med Res* 46:448–453. doi:[10.1016/j.arcmed.2015.07.001](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.07.001)
176. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P (2014) Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59:318–327. doi:[10.1002/hep.26744](https://doi.org/10.1002/hep.26744)
177. Sophie L, Woolston, Nina Kim M (2016) Cost and access to direct-acting antiviral agents cost of direct-acting antiviral agents cost-effectiveness of direct-acting antiviral agents. <http://www.hepatitisc.uw.edu>.
178. Sulbarán MZ, di Lello FA, Sulbarán Y, Cosson C, Loureiro CL, Rangel HR, Cantaloube JF, Campos RH, Moratorio G, Cristina J, Pujol FH (2010) Genetic history of hepatitis C virus in Venezuela: high diversity and long time of evolution of HCV genotype 2. *PLoS One* 13;5(12):e14315. doi:[10.1371/journal.pone.0014315](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014315)
179. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41:1100–1104. doi:[10.1038/ng.447](https://doi.org/10.1038/ng.447)
180. Tallo T, Norder H, Tefanova V, Krispin T, Schmidt J, Ilmoja M, Orgulas K, Pruunsild K, Priimägi L, Magnius LO (2007) Genetic characterization of hepatitis C virus strains in Estonia: fluctuations in the predominating subtype with time. *J Med Virol* 79:374–382. doi:[10.1002/jmv.20828](https://doi.org/10.1002/jmv.20828)
181. Tamori A, Enomoto M, Kawada N (2016) Recent advances in antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Mediat Inflamm* 2016:1–11. doi:[10.1155/2016/6841628](https://doi.org/10.1155/2016/6841628)
182. Tanaka A (2015) JSH guidelines for the management of hepatitis C virus infection (version 3). *Nihon Rinsho* 73:221–227
183. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugouchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M (2009) Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105–1109. doi:[10.1038/ng.449](https://doi.org/10.1038/ng.449)
184. Trinks J, Caputo M, Hulaniuk M, Burgos Pratz L, Re V, Fortuny L, Frias A, Torres O, Nunez F, Gadano A, Corach D, Flichman D (2013) Distribution of genetic polymorphisms associated to hepatitis C virus (HCV) antiviral response in a multiethnic and admixed population. *J Viral Hepatol* 20:20. doi:[10.1038/tpj.2014.20](https://doi.org/10.1038/tpj.2014.20)

185. Trujillo-Murillo K, Rincón-Sánchez AR, Martínez-Rodríguez H, Bosques-Padilla F, Ramos-Jiménez J, Barrera-Saldaña HA, Rojkind M, Rivas-Estilla AM (2008) Acetylsalicylic acid inhibits hepatitis C virus RNA and protein expression through cyclooxygenase 2 signaling pathways. *Hepatology* 47:1462–1472. doi:10.1002/hep.22215
186. U.S. National Institutes of Health (2013) *ClinicalTrials.gov*. In: clinicaltrials.gov. <http://clinicaltrials.gov/>. Accessed 6 Apr 2016.
187. Ueda E, Enomoto N, Sakamoto N, Hamano K, Sato C, Izumi N, Watanabe M (2004) Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. *Hepatol Res* 29:89–96. doi:10.1016/j.hepres.2004.02.014
188. Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, Fellay J, Schuppan D, Cronin KD, Hong L, McKenzie A, Patel K, Shianna KV, McHutchison JG, Goldstein DB, Afdhal N (2010) IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 52:1888–1896. doi:10.1002/hep.23912
189. Valdivia JP, Vidal J, Bussalleu A, Huerta J, Ramirez D, Valdivia J, De los Rios R (2003) Infección por el Virus de la Hepatitis C en donantes del banco de sangre en el Hospital Cayetano Heredia (1998–2002). *Rev Gastroenterol* 23:22–28
190. Vasconcelos LRS, Moura P, do Carmo RF, Pereira LB, Cavalcanti Mdo S, DCBL A, Dutra RA, Pereira LM (2014) Low IL10 serum levels as key factor for predicting the sustained virological response to IFN α /ribavirin in Brazilian patients with HCV carrying IL28B CT/TT genotype. *Hum Immunol* 75:895–900. doi:10.1016/j.humimm.2014.06.017
191. Venegas M, Torres C, Brahm J (2013) Distribución nacional y regional de genotipos del virus hepatitis C en Chile. *Rev Chil Infectol* 1:566–568
192. Venegas M, Villanueva RA, González K, Brahm J (2011) IL28B polymorphisms associated with therapy response in Chilean chronic hepatitis C patients. *World J Gastroenterol* 17:3636–3639. doi:10.3748/wjg.v17.i31.3636
193. Vidal LL, Soares MA, Santos AF (2016) NS3 protease polymorphisms and genetic barrier to drug resistance of distinct hepatitis C virus genotypes from worldwide treatment-naïve subjects. *J Viral Hepatol*. doi:10.1111/jvh.12503.
194. Witherell GW, Beineke P (2001) Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J Med Virol* 63:8–16
195. World Health Organization (2014) Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. WHO Library Catalog Data. doi:10.1186/1471-2334-13-288
196. World Health Organization (2015) Hepatitis C, fact sheet no. 164. *Hepat C* 4. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62401-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62401-6)
197. World Health Organization (WHO) (2016) Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection. Updated version, April 2016. WHO Library Catalog Data.
198. Worobey M, Holmes EC (1999) Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 80:2535–2543
199. Wyles DL (2012) Beyond telaprevir and boceprevir: resistance and new agents for hepatitis C virus infection. *Top Antivir Med* 20:139–145
200. Yepes A, Álvarez C, Restrepo JC, Correa G, Zapata JC, Arango YAE (2002) Genotipos virales en pacientes con infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en medellín. *Gastroenterol Hepatol* 25:334–335
201. Yokoyama K, Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Yotsumoto S, Okamoto H, Momoi MY (2011) Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan. *Arch Virol* 156:1591–1601. doi:10.1007/s00705-011-1038-4
202. Yuan H, Adams-Huet B, Petersen T, Attar N, Lee WM, Jain MK (2012) A single nucleotide polymorphism in IL28B affects viral evolution of hepatitis C quasispecies after pegylated interferon and ribavirin therapy. *J Med Virol* 84:1913–1919. doi:10.1002/jmv.23407
203. Yun Z, Lara C, Johansson B, Lorenzana De Rivera I, Sönerborg A (1996) Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J Med Virol* 49:155–160. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199607)49:3<155::AID-JMV1>3.0.CO;2-3

204. Yusim K, Richardson R, Tao N, Dalwani A, Agrawal A, Szinger J, Funkhouser R, Korber B, Kuiken C (2005) Los Alamos hepatitis C immunology database. *Appl Bioinform* 4:217–225. doi:[10.2165/00822942-200504040-00002](https://doi.org/10.2165/00822942-200504040-00002)
205. Zarife MA, de Oliveira EC, Romeu JM, dos Reis MG (2006) Detection of genotype 4 of the hepatitis C virus in Salvador, BA. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:567–569. doi:[10.1590/S0037-86822006000600012](https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000600012)
206. Zeminian LB, Padovani JL, Corvino SM, Silva GF, Pardini MIDMC, Grotto RMT (2013) Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:13–17
207. Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciara J, Ibranyi E, Weiland O, Noviello S, Brass C, Albrecht J (2006) Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol* 44:97–103

Research Article

Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B Resistance-Associated Substitutions in Genotype 1 Uruguayan Infected Patients

Fabián Aldunate,¹ Natalia Echeverría,¹ Daniela Chiodi,² Pablo López,²
Adriana Sánchez-Cicerón,² Alvaro Fajardo,¹ Martín Soñora,¹ Juan Cristina,¹
Nelia Hernández,² and Pilar Moreno ¹

¹Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay

²Clínica de Gastroenterología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11600 Montevideo, Uruguay

Correspondence should be addressed to Pilar Moreno; pmoreno@cin.edu.uy

Received 16 March 2018; Revised 30 May 2018; Accepted 10 June 2018; Published 14 August 2018

Academic Editor: Nora A. Fierro

Copyright © 2018 Fabián Aldunate et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Hepatitis C Virus (HCV) infection treatment has dramatically changed with the advent of direct-acting antiviral agents (DAAs). However, the efficacy of DAAs can be attenuated by the presence of resistance-associated substitutions (RASs) before and after treatment. Indeed, RASs detected in DAA treatment-naïve HCV-infected patients could be useful for clinical management and outcome prediction. Although the frequency of naturally occurring HCV NS5A and NS5B RASs has been addressed in many countries, there are only a few reports on their prevalence in the South American region. The aim of this study was to investigate the presence of RASs to NS5A and NS5B inhibitors in a DAA treatment naïve cohort of Uruguayan patients infected with chronic hepatitis C and compare them with reports from other South American countries. Here, we found that naturally occurring substitutions conferring resistance to NS5A and NS5B inhibitors were present in 8% and 19.2%, respectively, of treatment-naïve HCV genotype 1 infected patients. Importantly, the baseline substitutions in NS5A and NS5B herein identified differ from the studies previously reported in Brazil. Furthermore, Uruguayan strains subtype 1a clustered within all major world clades, showing that HCV variants currently circulating in this country are characterized by a remarkable genetic diversity.

1. Introduction

Hepatitis C Virus (HCV) infection treatment has dramatically improved thanks to the introduction of direct-acting antiviral agents (DAAs). These antivirals have significantly increased response rates (up to 98%) and greatly reduced treatment duration [1]. Currently available DAAs are classified into four categories given their molecular targets in the HCV replication cycle: (1) NS3/4A protease inhibitors (PIs) bind to the active site of the NS3/4A protease; (2) NS5A inhibitors interact with domain 1 of the NS5A dimer, although the exact mechanism of NS5A inhibition remains to be fully elucidated; (3) nucleos(t)ide analog NS5B

polymerase inhibitors are incorporated into the nascent RNA chain resulting in chain termination by compromising the binding of the incoming nucleotide; (4) nonnucleoside NS5B polymerase inhibitors interact with either the thumb 1, thumb 2, palm 1, or palm 2 domain of NS5B and inhibit polymerase activity by allosteric mechanisms [2–4]. However, the extreme mutation and high replication rates of HCV, together with the immune system pressure, lead to a remarkable genetic variability that can compromise the high response rates to DAAs due to the preexistence of resistance-associated substitutions (RASs) [5, 6].

Each drug or class of DAA is characterized by specific resistance profiles. The likelihood that a DAA will select for

and allow outgrowth of viral populations carrying RASs depends on the DAA's genetic barrier to resistance (the number and type of mutations needed to generate an amino acid substitution that confers resistance), the viral fitness (replicative capacity) of the resistant variant, and viral genotypes and subtypes [7, 8].

The prevalence of RASs in treatment-naïve patients has been broadly reported worldwide [9–16]. However, apart from Brazil and Argentina, this issue has not been fully addressed in other South American countries yet [9, 17–19]. The lack of information in relation to preexisting baseline RASs, added to the high cost of these new drugs, are the major limiting factors for the broad implementation of these new therapies in Uruguay as well as in other Latin American countries (low- or lower-middle income) [20].

In this study, we explored the presence of resistance variants to NS5A and NS5B inhibitors in a DAA treatment naïve cohort of Uruguayan patients chronically infected with hepatitis C. Here, we aimed to contribute to the knowledge of the circulation of HCV resistant variants in the South American region.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Clinical Samples. Serum samples were obtained from 31 patients with serological markers for HCV, which were recruited between 2015 and 2017 at the Gastroenterology Clinic from Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay. HCV infection was confirmed by Abbott real-time HCV (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, USA). Patients selected for this study were both chronically infected with HCV genotype 1 and DAA treatment-naïve at the time of blood extraction. Written informed consent was obtained from all patients. The studies have been performed according to the World Medical Association Declaration of Helsinki and approved by the appropriate institutional board (Hospital de Clínicas ethical committee).

2.2. RNA Extraction, cDNA Synthesis, and NS5A and NS5B Amplification. Viral RNA was extracted from 140 μ l of serum using the QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The viral RNA was heated at 65°C for 5 min and used as a template for a reverse transcription reaction. The reverse transcription reaction mixture contained 5 μ l of the RNA template, 1 μ l of random hexamer 100 ng/ μ l (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1 μ l of dNTP mix (10 mM each), 4 μ l of 5X first-strand buffer, 2 μ l of 0.1 M DTT, 1 μ l of SuperScript II reverse transcriptase (200 U/ μ l) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 1 μ l (40 U/ μ l) RNaseOUT (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The reverse transcription was performed at 42°C for 50 min, and then the reverse transcriptase enzyme was inactivated at 70°C for 15 min. PCR amplification of NS5A and NS5B genome regions was performed using primers and conditions previously described [10]. Amplicons were purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life

Science, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's protocol.

2.3. NS5A and NS5B Sequencing. The purified product was then sequenced using the same sets of primers used for PCR amplification. Bidirectional Sanger sequencing was performed by MacroGen Korea (<http://www.macrogen.com>).

2.4. NS5A and NS5B Genotype Determination. HCV NS5A and NS5B consensus sequences obtained from Uruguayan patients were aligned with sequences from HCV representing all genotypes and main subtypes isolated in different geographic regions of the world. These sequences were obtained from Los Alamos HCV sequence database and from the NIAID Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) [21, 22]. For strains included in these studies, see Supplementary Material Table S1. Sequences were aligned using the CLUSTAL W software [23]. Once aligned, the best evolutionary model that described our sequence data was assessed using ModelGenerator program [24]. Using the GTR+G+I model (General time reversible+gamma+invariant sites), maximum likelihood phylogenetic trees were constructed for both NS5A and NS5B using the MEGA 5.0 software [25]. For NS5A, 953 nucleotides (positions 6367 to 7319, relative to HCV 1a reference strain, H77 NC_004102) were included in the phylogenetic analysis, whereas for NS5B, only 361 nucleotides corresponding to the Okamoto region (positions 8265 to 8625, relative to strain H77 NC_004102) were included. As a measure of the robustness of each node, we employed the bootstrapping method (1000 pseudoreplicates).

For NS5A 1a Uruguayan sequences ($n = 20$), a second alignment and maximum likelihood phylogenetic tree was generated in order to analyze HCV evolutionary relationships between Uruguayan, Brazilian, and worldwide strains. For non-Uruguayan strains included in this analysis, see Supplementary Material Table S2.

2.5. NS5A and NS5B Sequence Analysis. In order to properly identify substitution changes in NS5A and NS5B regions from HCV strains circulating in Uruguayan patients, we generated world consensus sequences for 1a and 1b subtypes using a wide range of NS5A and NS5B sequences from HCV strains isolated worldwide. For this purpose, NS5A gene sequences corresponding to subtypes 1a ($n = 160$) and 1b ($n = 88$) were retrieved from Los Alamos HCV sequence database and from the NIAID ViPR [21, 22]. Likewise, datasets of 150 and 124 NS5B sequences were generated for subtypes 1a and 1b, respectively. Using Seqman program, implemented in DNASTar 5.01 package (DNASTAR, Madison, USA), a world consensus nucleotide sequences were generated for each gene and subtype. Each Uruguayan sequence was subsequently aligned to the corresponding reference sequences, and then *in silico* translated. The amino acid sequences obtained were compared in order to explore the presence of RASs as well as the presence of polymorphisms at a RAS position (RAPs) in Uruguayan HCV strains. RAPs are defined as any change from reference sequence for a specific genotype at a position associated with NS5A resistance [26].

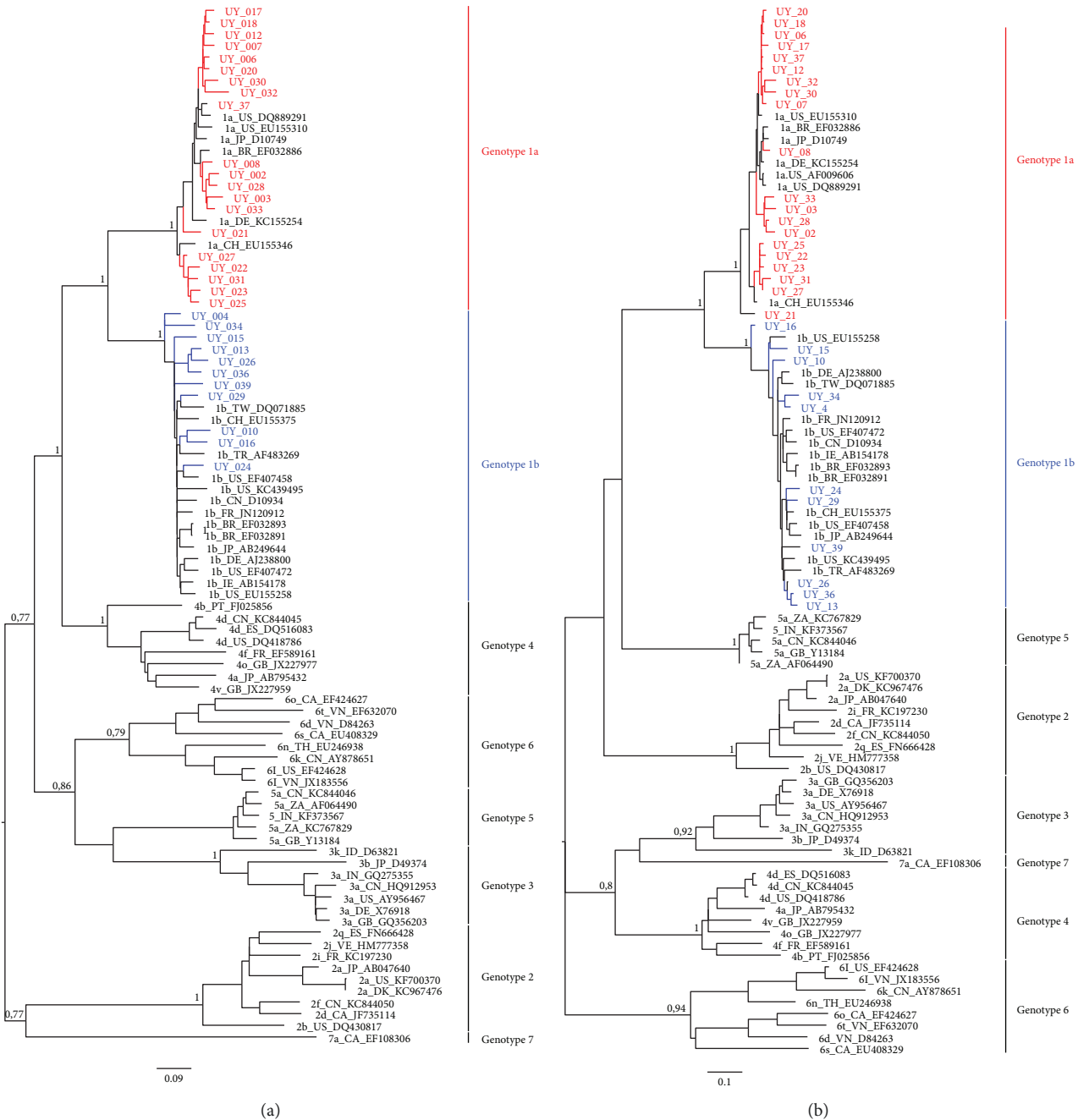


FIGURE 1: Maximum-likelihood phylogenetic analyses of the NS5A and NS5B genes of HCV strains circulating in Uruguay. Reference strains in the tree are shown by genotype_country_accession number. Numbers at the branches indicate bootstrap values. The bar at the bottom of the tree denotes distance. Uruguayan strains genotype 1a are shown in red and genotype 1b in blue. (a) NS5A region (953 nucleotides); (b) NS5B region (361 nucleotides).

3. Results

3.1. Genetic Variability of NS5A and NS5B Genes from HCV Strains Circulating in Uruguayan Patients. To study the genetic variability of NS5A and NS5B regions of HCV strains circulating in Uruguayan patients, sequences of these regions (accession numbers MH070029-MH070090) were aligned with corresponding sequences from 59 HCV strains isolated elsewhere, representing all genotypes and main subtypes (for strains included in these analyses, see Supplementary

Material Table S1). Therefore, maximum likelihood phylogenetic trees were constructed. The results of these studies are shown in Figure 1 (Figure 1(a): NS5A and Figure 1(b): NS5B).

All strains in the phylogenies were assigned according to their genotype, and each cluster was supported by very high bootstrap values for both analyzed regions. Strains isolated from Uruguayan patients ($n = 31$) were assigned to genotype 1, 20 of which corresponded to subtype 1a and 11 to subtype 1b. The results of NS5A (Figure 1(a)) and NS5B (Figure 1(b))

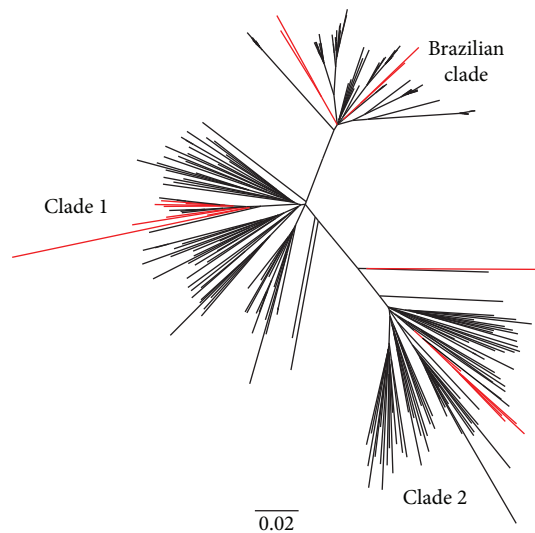


FIGURE 2: Maximum-likelihood phylogenetic tree analysis of the NS5A of HCV-1a strains circulating in Uruguay. The maximum-likelihood phylogenetic tree shows the evolutionary relationships between the Uruguayan, Brazilian, and worldwide HCV-1a isolates sequences. Uruguayan strains are shown in red. The bar at the bottom of the tree denotes distance. Sequence names have been removed for clarity.

phylogenetic analyses were concordant for both genomic regions in all 31 sequences, suggesting no recombination events between these regions.

To further analyze the evolutionary relationships between the Uruguayan strains and those circulating in Brazil and elsewhere, a second maximum likelihood phylogenetic tree of HCV-1a sequences of NS5A partial region was built (Figure 2). As was previously described, two distinct 1a clades (clades 1 and 2) were observed. Brazilian sequences clustered in a large group of related sequences inside clade 1 [9]. Whereas NS5A Uruguayan strains (in red) did not cluster in a particular clade, rather, they grouped dispersedly within all major world clades.

3.2. NS5A Substitution Analysis. With the purpose of studying the amino acid (AA) substitutions along the NS5A protein, Uruguayan HCV AA sequences were aligned with NS5A world consensus sequences (residues 23 to 354 relative to NS5A protein sequence). AA substitutions at positions previously found to be potentially associated with resistance to NS5A inhibitors, as well as polymorphisms at a RAS position, were identified. These results are summarized in Table 1.

RASs to NS5A inhibitors (L31M and L31V) were identified in 2 strains out of 25 (8%) fully sequenced samples. RAPs were found in 3 strains (subtype 1a): 2 exhibited the substitution H58P and 1 the substitution K24Q. Although these substitutions were not reported as resistant, some changes at these positions were previously described as RASs in subtype 1a, namely H58D and K24R [27, 28]. Finally, substitution E62D was found in one subtype 1a strain. This change is considered as a secondary substitution because, although it does not confer resistance by itself, when combined with a known

RAS it does. In fact, it confers a higher level of resistance than the one achieved by the RAS alone [26]. In addition, several polymorphisms that have not been previously reported to be associated with a resistant phenotype were also detected (see Supplementary Material Table S3).

3.3. NS5B Substitution Analysis. In order to study substitutions along NS5B protein, Uruguayan HCV AA sequences were aligned to the NS5B world consensus sequences. Almost full-length AA sequences were obtained in 26 out of 31 analyzed strains. 23 sequences span residues 36 to 539 whereas the remaining 3 span residues 36 to 557 of NS5B protein. This issue limited our studies, since many of the described RASs are observed as of residue 553.

Importantly, RASs to NS5B inhibitors (Table 2) were observed in 5 strains out of 26 sequenced samples (19.2%). C451R was found in two isolates while A421V was found in only one. In 2 of the 3 strains for which we were able to obtain longer sequences, RASs S556G (subtype 1a) and Q556R (subtype 1b) were observed.

Finally, we found two RAPs: A421V (in 2 subtype 1b strains) and A553G (in 1 subtype 1a strain). Although A421V has been associated with resistance to beclabuvir (BCV) in patients infected with HCV subtype 1a, this resistant phenotype has not been proven in strains subtype 1b [29]. In position 553, the substitution reported as resistant was A553T [8].

As was the case for NS5A, different polymorphisms not previously associated with a resistant phenotype were also detected in NS5B (see Supplementary Material Table S4).

4. Discussion

The advent of DAAs therapies constitutes one of the major breakthroughs in HCV infected patients management. However, these new treatment options are far from being universally available, in particular for HCV infected patients relying on Latin American public healthcare systems. The main limiting factors for worldwide access to DAAs in our region concern the high cost, the inadequate management of public healthcare systems, the limited access of low-income or uninsured populations to healthcare providers, and the lack of accurate epidemiological information [20, 30–32]. In Uruguay, these therapies became recently available, and although some have been approved for their use by the public health authorities (Viekira pak and sofosbuvir/ledipasvir therapies), they are not currently financially covered, except in specific cases. Despite the high rates of viral response achieved with DAA-based treatments, still 1 to 10% of the patients fails to eliminate infection, and in these cases, baseline and emergent resistance variants turn out to be key factors contributing to treatment failure [5, 17, 33].

Unfortunately, we are currently unable to properly assess the number of HCV infected people in Uruguay and even more to figure out the frequency and type of RASs circulating. These facts could compromise the effectiveness of these new therapies in our country.

We have previously reported that naturally occurring substitutions conferring resistance to NS3 inhibitors exist in

TABLE 1: Amino acid substitutions in HCV NS5A protein from DAA treatment-naïve patients.

Subtype	Isolate	RAS	RAP	Resistance to DAA	Reference
1a	003		H58P	—	HARVONI prescription*
1a	020		K24Q	—	[5, 49]
1a	032		H58P	—	HARVONI Prescription*
1b	016	L31 V		DCV, LDV, EBV	[5, 6]
1b	039	L31 M		DCV, LDV, EBV	[5, 47, 48]

Daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV), elbasvir (EBV). *Harvoni prescription, https://www.gilead.com/~/media/Files/pdfs/medicines/liver-disease/harvoni/harvoni_pi.pdf.

TABLE 2: Amino acids substitutions in HCV NS5B protein from DAA treatment-naïve patients.

Subtype	Isolate	RAS	RAP	Resistance to DAA	Reference
1a	003	C451R		DSV	Trial Coral I - cohort 2*
1a	020	A421V		BCV	[29]
1a	022	C451R		DSV	Trial Coral I - cohort 2*
1a	037	S556G		DSV	[54, 55]
	037		A553G	—	[8]
1b	026		A421V	—	[29]
	026	Q556R		DSV	[12]
1b	036		A421V	—	[29]

Beclabuvir (BCV), dasabuvir (DSV). *Trial Coral I - cohort 2 <http://www.hcv-trials.com/showStudy.asp?Study=86> (Mantry PS. AASLD, 2015, Abs. 1084).

a significant proportion of Uruguayan patients infected with HCV genotype 1, and we showed that this frequency seemed to be higher than in other South American countries (Brazil and Argentina) [34]. The present study describes the prevalence of baseline NS5A and NS5B RASs in HCV genotype 1 infected DAA-naïve patients in a Uruguayan cohort.

The presence of substitutions conferring resistance to NS5A inhibitors has been widely reported both in therapy-naïve and in relapsing patients from Europe [10, 33, 35–38], USA [37, 39, 40], and Asia [41–43]. However, NS5A sequences from South America are poorly analyzed yet [9, 44]. Recent studies have revealed that the mean prevalence of NS5A genotype 1 baseline RASs to different inhibitors ranges from 6% to 16% using population sequencing or deep sequencing [27, 37, 45, 46]. Importantly, the prevalence and type of baseline NS5A RASs varies slightly by geographic regions. For instance, L31M was found in 2.2% of genotype 1a infected patients in Europe, in 4.1% of those in Oceania, and strikingly in no patient from the USA [27]. For this reason, we believe that there is a need to contribute data from our region, for which we still do not have enough information, apart from Brazil [9, 44]. The results of this study indicate the presence of DAA NS5A RASs in 2 HCV strains (8% of the patients enrolled in this study), with baseline RASs detected at position 31 (see Table 1). L31M substitution confers resistance to daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV), and elbasvir (EBV) in both 1a and 1b subtypes [5, 6, 8, 28, 47, 48], whereas substitution L31V does it to DCV in subtypes 1a and 1b, to LDV in subtype 1b, and to EBV in subtype 1a [5, 6, 28]. Given that both L31V and L31M are clinically

relevant RASs, their detection at baseline may influence the choice of first-line treatment regimens [28].

The substitutions H58P and K24Q found in two patients are considered as resistance-associated polymorphisms (RAPs). The RASs characterized at these positions were H58D and K24G/N/R [5, 6, 27, 28, 49, 50]. The substitution H58P was found as a baseline RAP in relapsers to LDV (HARVONI prescription, https://www.gilead.com/~/media/files/pdfs/medicines/liver-disease/harvoni/harvoni_pi.pdf?la=en). However, it is sometimes regarded as a RAS [10, 51], despite conferring only 1.2 fold change in resistance in *in vitro* studies using the 1a replicon system [39].

We did not find M28T/V, Q30R/H, or Y93H substitutions as there were previously reported in Brazil and worldwide [9, 27, 44]. The amino acid substitution E62H was found in one Uruguayan patient. Although this change does not confer resistance by itself but in combination with Q30R, it generates a high resistance level to DCV [52].

The presence of baseline NS5A RASs impacts treatment outcome in some patient groups by affecting SVR rates. The detection of NS5A preexistent RASs may play a relevant role in the choice of first-line treatment regimens or in the simplification/shortening of recommended regimens, in order to bring SVR rates close to the highest achievable [27, 38, 41, 53], in particular in countries such as Uruguay, where only two different DAA-containing treatment regimens are approved for their use.

Regarding NS5B gene, global analysis (with the exception of South America [17, 19]) revealed that NS5B DAA resistance substitutions are infrequent [14]. Our study showed

the presence of NS5B inhibitors RASs in 5 out of 26 analyzed HCV infected Uruguayan patients naïve to treatment (19.2%). Substitutions found in this work were A421V and S556G associated in subtype 1a with resistance to BCV and dasabuvir (DSV), respectively [8, 28, 29, 54, 55], and Q556R associated with resistance to DSV both in genotype 1a and 1b [12, 28]. Substitution C451R, observed in two Uruguayan patients, was reported previously in patients who failed to clear the infection after treatment with OBV/PTV/r+DSV±RBV. In these cases, it appeared in combination with G558R (Trial Coral I-Cohort 2: <http://www.hcv-trials.com/showStudy.asp?Study=86>).

RAPs in positions 421 and 553 (A421V in two subtype 1b isolates and A553G in one subtype 1b isolate) were also found. Although A421V has been associated with resistance to BCV in patients with subtype 1a, this phenotype has not been proven in strains of subtype 1b [29]. In position 553, the substitutions reported as resistant are A553T in subtype 1a [8] and A553V in subtype 1b [54], conferring resistance to DSV.

In contrast to our results, Noble and coworkers (2016) reported the presence of V321A, A421G, M414V, Y448H, L159F, and C316N in Brazilian isolates [17], yet none of these mutations were found in this study, probably due to the diversity found between Uruguayan and Brazilian strains (Figure 2). Nevertheless, substitution A421V was found in Brazil [17], Argentina [19], and Uruguay. The RAS S282T was detected neither in Brazilian reports nor in this current work (Uruguay) [17, 18, 56]. Our findings further confirm and complement previous studies which evidenced a low prevalence of this substitution *in vivo*, probably due to its low replicative fitness [14, 18, 57]. Despite our results, it is worth mentioning that the presence of baseline NS5B RASs conferring resistance to nucleotide or nonnucleoside NS5B inhibitors has not been shown to have any impact on virologic responses thus far [53, 58].

These results show both diversity in the baseline polymorphisms found in different Latin American countries and in the evolutionary relationships of Uruguayan isolates (Figure 2). This fact could be linked not only to the isolates' geographic region and viral intrinsic characteristics but also to the genetic background of the host. It is worth mentioning that we live in a vast continent inhabited by populations with different genotypic characteristics that might, depending on the situation, require different approaches to treatment. Indeed, we have recently found that allele and genotype frequencies at *IL28B* locus of Uruguayan individuals closely resemble those of an admixed population rather than a uniformly European-descendant one [59]. Altogether, we believe that it could be important to carry out studies throughout the South American region in order to establish the prevalence of RASs in NS5A and NS5B in different countries. In fact, this will aid in understanding that not every treatment regimen might be adequate for every patient and country. The data we presented here might guide not only physicians in making therapeutic decisions but also public health authorities in approving more diverse treatment combinations. These treatment formulations would cover most of the circulating strains in our region, a region with an extremely diverse genetic background population.

5. Conclusion

To our knowledge, the present study revealed for the first time the presence of RASs in the NS5A and NS5B regions of HCV genotype 1 Uruguayan strains from patients who have not been previously treated with DAAs and is one of the few South American countries to report on this matter. It is currently unclear if preexisting viral variants with reduced susceptibility to DAAs are clinically relevant for the prediction of virologic treatment failure. However, individualized DAA therapy based on baseline resistance analysis may be beneficial for optimizing treatment efficacy in patients with HCV genotype 1 infection and risk factors for treatment failure. Therefore, the potential role of baseline resistance testing remains an area of critical research and clinical questions.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' Contributions

Fabián Aldunate and Natalia Echeverría contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Gonzalo Moratorio (Viral populations and Pathogenesis Unit, Institut Pasteur, Paris) for assistance during the manuscript preparation. This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (project FMV_1_2014_1_104171), PEDECIBA, Comisión Académica de Posgrados, Universidad de la República Uruguay (UdelaR), and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelaR, Uruguay.

Supplementary Materials

Supplementary Material Table S1: hepatitis C Virus NS5A and NS5B sequences used as representatives of each genotype to perform the phylogenetic analysis. Their corresponding genotype, country of isolation, and GenBank accession number are indicated. Supplementary Material Table S2: hepatitis C Virus NS5A subtype 1a sequences used to reveal evolutionary relationships between Uruguayan strains and others isolated elsewhere. Their corresponding country of isolation and GenBank accession number are indicated. Supplementary Material Table S3: amino acid substitutions in NS5A protein not previously associated with resistance to NS5A inhibitors. Supplementary Material Table S4: amino acid substitutions in NS5B protein not previously associated with resistance to polymerase inhibitors. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] T. Asselah, P. Marcellin, and R. F. Schinazi, "Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure?," *Liver International*, vol. 38, pp. 7–13, 2018.
- [2] J. M. Pawlotsky, "NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C," *Journal of Hepatology*, vol. 59, no. 2, pp. 375–382, 2013.
- [3] L. Gerber, T. M. Welzel, and S. Zeuzem, "New therapeutic strategies in HCV: polymerase inhibitors," *Liver International*, vol. 33, Supplement 1, pp. 85–92, 2013.
- [4] P. de Leuw and C. Stephan, "Protease inhibitor therapy for hepatitis C virus-infection," *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 19, no. 6, pp. 577–587, 2018.
- [5] D. L. Wyles, "Resistance to DAAs: when to look and when it matters," *Current HIV/AIDS Reports*, vol. 14, no. 6, pp. 229–237, 2017.
- [6] I. Esposito, J. Trinks, and V. Soriano, "Hepatitis C virus resistance to the new direct-acting antivirals," *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, vol. 12, no. 10, pp. 1197–1209, 2016.
- [7] L. Cuyppers, G. Li, P. Libin, S. Piamongsant, A. M. Vandamme, and K. Theys, "Genetic diversity and selective pressure in hepatitis C virus genotypes 1–6: significance for direct-acting antiviral treatment and drug resistance," *Viruses*, vol. 7, no. 9, pp. 5018–5039, 2015.
- [8] E. Lontok, P. Harrington, A. Howe et al., "Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: state of the art summary," *Hepatology*, vol. 62, no. 5, pp. 1623–1632, 2015.
- [9] A. Peres-da-Silva, A. J. De Almeida, and E. Lampe, "NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naïve patients infected with genotype 1 hepatitis C virus," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 70, no. 3, pp. 726–730, 2015.
- [10] S. Paolucci, L. Fiorina, B. Mariani et al., "Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients," *Virology Journal*, vol. 10, no. 1, p. 355, 2013.
- [11] Y. Zhang, Y. Cao, R. Zhang et al., "Pre-existing HCV variants resistant to DAAs and their sensitivity to PegIFN/RBV in Chinese HCV genotype 1b patients," *PLoS One*, vol. 11, no. 11, article e0165658, 2016.
- [12] Z. Chen, H. Li, H. Ren, and P. Hu, "Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 20310, 2016.
- [13] T. L. Applegate, S. Gaudieri, A. Plauzolles et al., "Naturally occurring dominant drug resistance mutations occur infrequently in the setting of recently acquired hepatitis C," *Antiviral Therapy*, vol. 20, no. 2, pp. 199–208, 2015.
- [14] T. M. Welzel, N. Bhardwaj, C. Hedskog et al., "Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses," *Journal of Hepatology*, vol. 67, no. 2, pp. 224–236, 2017.
- [15] J. Itakura, M. Kurosaki, H. Takada et al., "Naturally occurring, resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to interleukin-28B genotype and are sensitive to interferon-based therapy," *Hepatology Research*, vol. 45, no. 10, pp. E115–E121, 2015.
- [16] J. A. Larousse, P. Trimoulet, P. R. Pinson et al., "Prevalence of hepatitis C virus (HCV) variants resistant to NS5A inhibitors in naïve patients infected with HCV genotype 1 in Tunisia," *Virology Journal*, vol. 12, no. 1, p. 84, 2015.
- [17] C. F. Noble, F. Malta, G. Lisboa-Neto et al., "Natural occurrence of NS5B inhibitor resistance-associated variants in Brazilian patients infected with HCV or HCV and HIV," *Archives of Virology*, vol. 162, no. 1, pp. 165–169, 2017.
- [18] S. Franco, M. Casadellà, M. Noguera-Julian et al., "No detection of the NS5B S282T mutation in treatment-naïve genotype 1 HCV/HIV-1 coinfecting patients using deep sequencing," *Journal of Clinical Virology*, vol. 58, no. 4, pp. 726–729, 2013.
- [19] M. M. Sede, N. L. Laufer, and J. Quarleri, "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 coinfecting patients," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 46, no. 2, pp. 219–224, 2015.
- [20] J. Trinks, M. Caputo, M. L. Hulaniuk, D. Corach, and D. Flichman, "Hepatitis C virus pharmacogenomics in latin american populations: implications in the era of direct-acting antivirals," *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, vol. 10, pp. 79–91, 2017.
- [21] C. Kuiken, K. Yusim, L. Boykin, and R. Richardson, "The Los Alamos hepatitis C sequence database," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 3, pp. 379–384, 2005.
- [22] B. Pickett, D. Greer, Y. Zhang et al., "Virus pathogen database and analysis resource (ViPR): a comprehensive bioinformatics database and analysis resource for the coronavirus research community," *Viruses*, vol. 4, no. 11, pp. 3209–3226, 2012.
- [23] J. D. Thompson, D. G. Higgins, and T. J. Gibson, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice," *Nucleic Acids Research*, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680, 1994.
- [24] T. M. Keane, C. J. Creevey, M. M. Pentony, T. J. Naughton, and J. O. McInerney, "Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 6, no. 1, p. 29, 2006.
- [25] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739, 2011.
- [26] J.-H. Sun, D. R. O'Boyle II, Y. Zhang et al., "Impact of a baseline polymorphism on the emergence of resistance to the hepatitis C virus nonstructural protein 5a replication complex inhibitor, BMS-790052," *Hepatology*, vol. 55, no. 6, pp. 1692–1699, 2012.
- [27] S. Zeuzem, M. Mizokami, S. Pianko et al., "NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: prevalence and effect on treatment outcome," *Journal of Hepatology*, vol. 66, no. 5, pp. 910–918, 2017.
- [28] European Association for the Study of the Liver, "EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2016," *Journal of Hepatology*, vol. 66, no. 1, pp. 153–194, 2017.
- [29] S. Kim, K.-H. Han, and S. H. Ahn, "Hepatitis C virus and antiviral drug resistance," *Gut and Liver*, vol. 10, no. 6, pp. 890–895, 2016.
- [30] K. V. Silva-Vidal and N. Méndez-Sánchez, "The good, the bad and the ugly of the new treatments for hepatitis C virus," *Annals of Hepatology*, vol. 13, no. 5, pp. 574–575, 2014.

- [31] D. B. Olmedo, S. A. Cader, and L. C. Porto, "IFN- λ gene polymorphisms as predictive factors in chronic hepatitis C treatment-naïve patients without access to protease inhibitors," *Journal of Medical Virology*, vol. 87, no. 10, pp. 1702–1715, 2015.
- [32] D. B. Rein, J. S. Wittenborn, B. D. Smith, D. K. Liffmann, and J. W. Ward, "The cost-effectiveness, health benefits, and financial costs of new antiviral treatments for hepatitis C virus," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 61, no. 2, pp. 157–168, 2015.
- [33] R. Brandão, R. Marcelino, F. Gonçalves et al., "Characterization of NS5A and NS5B resistance-associated substitutions from genotype 1 hepatitis C virus infected patients in a Portuguese cohort," *Viruses*, vol. 10, no. 5, p. 223, 2018.
- [34] N. Echeverría, G. Betancour, F. Gámbaro et al., "Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: their relevance for developing countries," *Virus Research*, vol. 223, pp. 140–146, 2016.
- [35] A. L. McCormick, L. Moynihan, M. J. Macartney et al., "Baseline drug-resistance mutations are detectable in HCV genes NS3 and NS5A but not NS5B in acute and chronic HIV-coinfected patients," *Antiviral Therapy*, vol. 20, no. 3, pp. 361–363, 2015.
- [36] Z. Plaza, V. Soriano, E. Vispo et al., "Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor," *Antiviral Therapy*, vol. 17, no. 5, pp. 921–926, 2012.
- [37] C. Sarrazin, H. Dvory-Sobol, E. S. Svarovskaia et al., "Prevalence of resistance-associated substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and outcomes of treatment with ledipasvir and sofosbuvir," *Gastroenterology*, vol. 151, no. 3, pp. 501–512.e1, 2016.
- [38] V. Cento, M. Aragri, E. Teti et al., "Optimal cure rate by personalized HCV regimens in real-life: a proof-of-concept study," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 72, no. 12, pp. 3420–3424, 2017.
- [39] R. A. Fridell, C. Wang, J. H. Sun et al., "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*, vol. 54, no. 6, pp. 1924–1935, 2011.
- [40] K. M. Kitrinou, A. C. Corsa, A. Worth et al., "Nonstructural protein 5A resistance profile in patients with chronic hepatitis C treated with ledipasvir-containing regimens without sofosbuvir," *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 25, no. 2, pp. 126–133, 2018.
- [41] R. Kozuka, H. Hai, H. Motoyama et al., "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*, vol. 25, no. 5, pp. 535–542, 2018.
- [42] Z. Li, Z. W. Chen, H. Li, H. Ren, and P. Hu, "Prevalence of hepatitis C virus-resistant association substitutions to direct-acting antiviral agents in treatment-naïve hepatitis C genotype 1b-infected patients in western China," *Infection and Drug Resistance*, vol. 10, pp. 377–392, 2017.
- [43] H. Fujii, A. Umemura, T. Nishikawa et al., "Real-world efficacy of daclatasvir and asunaprevir with respect to resistance-associated substitutions," *World Journal of Hepatology*, vol. 9, no. 25, pp. 1064–1072, 2017.
- [44] F. Malta, K. V. Gaspareto, G. Lisboa-Neto, F. J. Carrilho, M. C. Mendes-Correa, and J. R. R. Pinho, "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*, vol. 17, no. 1, p. 716, 2017.
- [45] D. J. Bartels, J. C. Sullivan, E. Z. Zhang et al., "Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment," *Journal of Virology*, vol. 87, no. 3, pp. 1544–1553, 2013.
- [46] F. Suzuki, H. Sezaki, N. Akuta et al., "Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b," *Journal of Clinical Virology*, vol. 54, no. 4, pp. 352–354, 2012.
- [47] S. Zeuzem, R. Ghalib, K. R. Reddy et al., "Grazoprevir–elbasvir combination therapy for treatment-naïve cirrhotic and non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C virus genotype 1, 4, or 6 infection: a randomized trial," *Annals of Internal Medicine*, vol. 163, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [48] X. Forns, S. C. Gordon, E. Zuckerman et al., "Grazoprevir and elbasvir plus ribavirin for chronic HCV genotype-1 infection after failure of combination therapy containing a direct-acting antiviral agent," *Journal of Hepatology*, vol. 63, no. 3, pp. 564–572, 2015.
- [49] F. C. Lahser, K. Bystol, S. Curry et al., "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*, vol. 60, no. 5, pp. 2954–2964, 2016.
- [50] P. Krishnan, R. Tripathi, G. Schnell et al., "Resistance analysis of baseline and treatment-emergent variants in hepatitis C virus genotype 1 in the AVIATOR study with paritaprevir-ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 59, no. 9, pp. 5445–5454, 2015.
- [51] K. V. Gaspareto, R. M. Ribeiro, F. de M. Malta et al., "Resistance-associated variants in HCV subtypes 1a and 1b detected by ion torrent sequencing platform," *Antiviral Therapy*, vol. 21, no. 8, pp. 653–660, 2016.
- [52] S. Nakamoto, T. Kanda, S. Wu, H. Shirasawa, and O. Yokosuka, "Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 11, pp. 2902–2912, 2014.
- [53] K. H. Peiffer, J. Vermehren, L. Kuhnhenh et al., "Interferon-free treatment choice according to baseline RASs leads to high SVR rates in HCV genotype 1 infected patients," *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 24, no. 7, pp. 524–530, 2018.
- [54] W. Kati, G. Koev, M. Irvin et al., "In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 59, no. 3, pp. 1505–1511, 2015.
- [55] S. Zeuzem, I. M. Jacobson, T. Baykal et al., "Retreatment of HCV with ABT-450/r–ombitasvir and dasabuvir with ribavirin," *The New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 17, pp. 1604–1614, 2014.
- [56] M. C. B. Castilho, A. N. Martins, I. S. Horbach et al., "Association of hepatitis C virus NS5B variants with resistance to new antiviral drugs among untreated patients," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 106, no. 8, pp. 968–975, 2011.
- [57] H. Dutartre, C. Bussetta, J. Boretto, and B. Canard, "General catalytic deficiency of hepatitis C virus RNA polymerase with an S282T mutation and mutually exclusive resistance towards 2'-modified nucleotide analogues," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 12, pp. 4161–4169, 2006.

- [58] S. Fourati and J. M. Pawlotsky, “Virologic tools for HCV drug resistance testing,” *Viruses*, vol. 7, no. 12, pp. 6346–6359, 2015.
- [59] N. Echeverría, D. Chiodi, P. López et al., “IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients,” *Virology Journal*, vol. 15, no. 1, p. 40, 2018.

Letter to the Editor

Response to: Comment on “Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B Resistance-Associated Substitutions in Genotype 1 Uruguayan Infected Patients”

Fabián Aldunate,¹ Natalia Echeverría,¹ Daniela Chiodi,² Pablo López,² Adriana Sánchez-Cicerón,² Alvaro Fajardo,¹ Martín Soñora,¹ Juan Cristina,¹ Nelia Hernández,² and Pilar Moreno¹

¹Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay

²Clínica de Gastroenterología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11600 Montevideo, Uruguay

Correspondence should be addressed to Pilar Moreno; pmoreno@cin.edu.uy

Received 5 November 2018; Accepted 8 November 2018; Published 5 February 2019

Academic Editor: Emilia Hadziyannis

Copyright © 2019 Fabián Aldunate et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We are very grateful to Dr. Sana Eybpoosh and Dr. Mona Kiminezhad for their valuable comments and suggestions [1] on our recent article entitled “Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B Resistance-Associated Substitutions in Genotype 1 Uruguayan Infected Patients” [2].

We have carefully reviewed all the comments [1] and hope that the provided responses will address the concerns on validity and generalizability of our results.

The first concern raised by Eybpoosh and Kiminezhad refers to the possibility that our samples may have reached partial or full “substitution saturation” given the fact that they were collected from chronic hepatitis C virus (HCV) cases. As stated, this phenomenon of saturation occurs more rapidly in fast evolving pathogens [3] and it is well established that HCV exhibits a fast evolutionary rate ranging from 10^{-3} to 10^{-4} substitutions/site/year [4–6]. As substitution saturation could decrease the phylogenetic signal in the sequence alignment, the authors suggest that it could affect the quality and accuracy of our phylogenetic inferences. However, likelihood mapping studies had previously been performed on all of our datasets in order to determine the phylogenetic signal of our aligned sequences [7]. Unfortunately, we did not include these results in our publication.

In all cases, the likelihood mapping results confirmed that over 91% of the trees rendered fully resolved topologies (Figure 1). Our NS5A and NS5B datasets for genotyping purposes (Figure 1 in [2]) included 31 Uruguayan strains and 58 or 59 strains, respectively, corresponding to different HCV subtypes and genotypes isolated elsewhere. In particular, as shown in Figure 1(a), our NS5A dataset (953 nucleotide long) showed that 93.8% of trees are fully resolved, whereas for our NS5B dataset (361 nucleotide long) this percentage was slightly lower (91.9%, Figure 1(b)), but in both cases, these results suggested sufficient phylogenetic signal for our subsequent analyses. The NS5A genotype 1a dataset, used to analyse evolutionary relationships (Figure 2 in [2]), included 20 Uruguayan HCV subtype 1a strains and 237 HCV subtype 1a strains isolated elsewhere (1119 nucleotide long). This dataset showed the highest percentage of fully resolved trees (95.5%, Figure 1(c)).

Despite the abovementioned results, we agree with the comment of the authors that we could have assessed the substitution saturation of our data. Therefore, we have addressed this issue using DAMBE [8], as suggested by them. Figure 2 shows the results obtained for the Uruguayan strains when plotting the observed transitions and transversions of

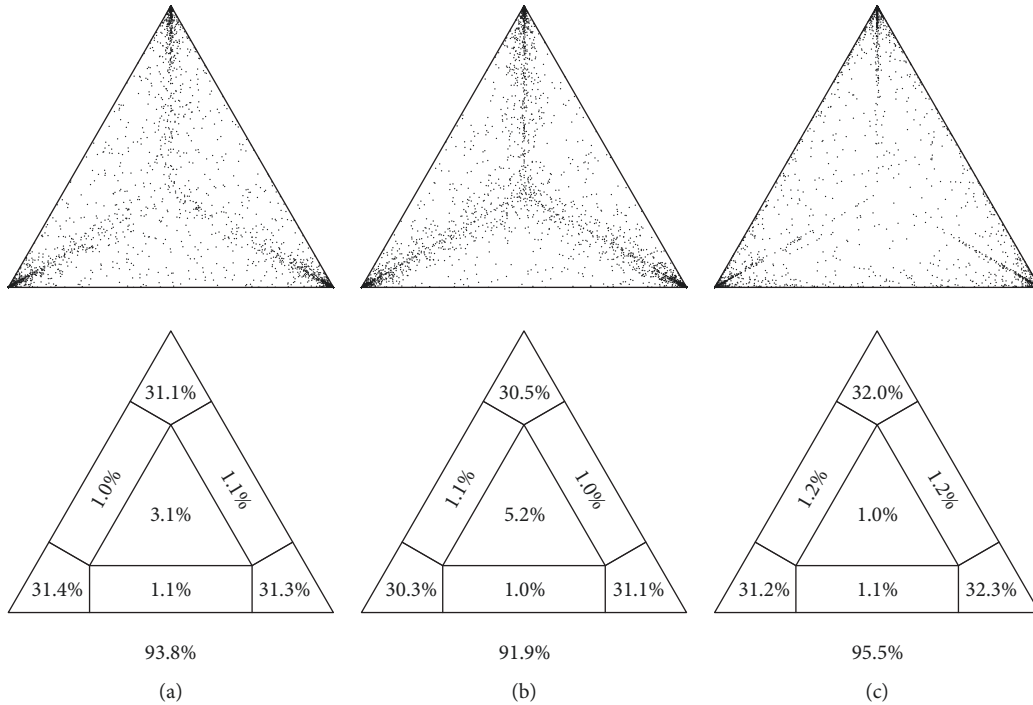


FIGURE 1: Likelihood mapping analysis. (a) NS5A dataset for genotyping purposes ($n = 89$ sequences, 953 nt); (b) NS5B dataset for genotyping purposes ($n = 90$ sequences, 361 nt); (c) NS5A genotype 1a dataset used to analyse evolutionary relationships ($n = 257$ sequences, 1119 nt). The analyses showed that, across all datasets, over 91% of trees are fully resolved (percentages are indicated below each triangle). Analyses were performed using 1000 random quartets and a GTR model of substitution with a mixed model of rate heterogeneity (1 invariable + 4 gamma rates).

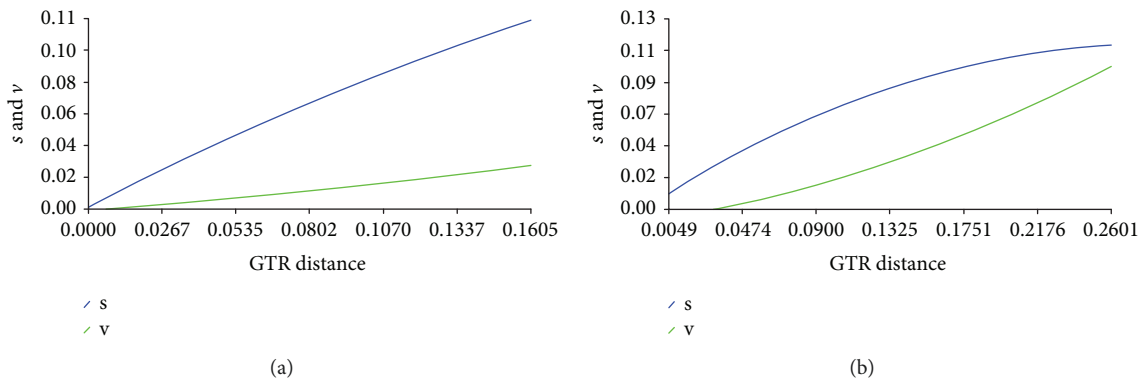


FIGURE 2: Substitution saturation analysis using DAMBE. (a) NS5A Uruguayan strain dataset; (b) NS5B Uruguayan strain dataset. Transitions (blue line) and transversions (green line) are plotted against divergence. The genetic distance was computed with the GTR nucleotide substitution model. The results show that all Uruguayan sequences included in our study [2] contain enough evolutionary information for reliable phylogenetic inferences and little substitution saturation despite corresponding to chronic HCV strains.

all codon positions against a GTR-corrected genetic distance (NS5A, Figure 2(a) and NS5B, Figure 2(b)). These results indicate that our sequences, derived from chronically infected patients, have not yet reached substitution saturation which is evidenced by a higher rate of transitions than transversions, both increasing with the genetic distance.

In addition to analysing Uruguayan strains, we have tested the substitution saturation in all of our datasets using Xia's method [9, 10]. This test provides an index of substitution saturation (I_{ss}) and compares it with a critical I_{ss} ($I_{ss,c}$)

which corresponds to a value at which the sequences will begin to fail to recover the true tree. In addition, it is performed assuming two extreme tree topologies (symmetrical vs. asymmetrical). Since the computer simulation is limited to $n \leq 32$ sequences and our datasets exceed this number, DAMBE randomly samples subsets of 4, 8, 16, and 32 sequences multiple times and performs the test for each subset. When considering NS5A genotype 1a dataset for evolutionary relationships (257 sequences), no saturation was found (Table 1). This is evidenced by I_{ss} values

TABLE 1: Test of substitution saturation by Xia’s method implemented in DAMBE [9, 10] on NS5A genotype 1a dataset used to analyse evolutionary relationships.

n sequences	I_{ss}	Symmetrical topology		Asymmetrical topology	
		$I_{ss,c}^{Sym}$	p	$I_{ss,c}^{Asym}$	p
4	0.124	0.825	0.0000	0.793	0.0000
8	0.129	0.795	0.0000	0.691	0.0000
16	0.137	0.778	0.0000	0.585	0.0000
32	0.144	0.757	0.0000	0.458	0.0000

I_{ss} : index of substitution saturation; $I_{ss,c}$: critical index of substitution saturation; p : p value for two-tailed tests.

TABLE 2: Test of substitution saturation by Xia’s method implemented in DAMBE [9, 10] on NS5A and NS5B datasets used for genotyping purposes.

	n sequences	I_{ss}	Symmetrical topology		Asymmetrical topology	
			$I_{ss,c}^{Sym}$	p	$I_{ss,c}^{Asym}$	p
NS5A	4	0.434	0.819	0.0000	0.787	0.0000
	8	0.427	0.787	0.0000	0.681	0.0000
	16	0.433	0.77	0.0000	0.571	0.0000
	32	0.448	0.746	0.0000	0.439	0.7354
NS5B	4	0.354	0.785	0.0000	0.756	0.0000
	8	0.361	0.739	0.0000	0.628	0.0000
	16	0.359	0.694	0.0000	0.485	0.0000
	32	0.365	0.687	0.0000	0.358	0.8151

I_{ss} : index of substitution saturation; $I_{ss,c}$: critical index of substitution saturation; p : p value for two-tailed tests.

significantly smaller than $I_{ss,c}$ for both tree topologies which argues for a dataset with little substitution saturation [10]. This, in turn, supports the evolutionary relationships inferred in Figure 2 in [2]. When performing Xia’s method on NS5A and NS5B datasets for genotyping purposes (89 and 90 sequences, respectively, corresponding to all known HCV genotypes and several subtypes), the results are slightly different. As shown in Table 2, only when sample subsets of 32 sequences are considered and under an extremely asymmetric tree topology assumption, the results suggest that our datasets would be poor for phylogenetic studies ($I_{ss} > I_{ss,c}$, $p > 0.05$). Nevertheless, it is worth noting that our likelihood mapping results (Figure 1) are indicative of good phylogenetic signal for both datasets. In addition, the topologies of the reconstructed phylogenetic trees (Figure 1 in [2]) seem to be more symmetric-like, and under the symmetric tree topology assumption, all I_{ss} values are significantly smaller than $I_{ss,c}$, regardless of the number of sequences sampled. In conclusion, considering the tree topology as well as the likelihood mapping studies, the genotype assignment is presumably correct.

Eyboosh and Kiminezhad also drew attention to the small number, apparently not randomly sampled, of HCV patients enrolled in our study. To better comprehend our sampling diversity, we must introduce some demographical data about our country. Uruguay comprises a small territory (176.215 m^2) and has only about 3.3 million inhabitants [11]. To this respect, the Gastroenterology Clinic from Hospital de Clínicas, though located in Montevideo (the capital city), is the only university reference centre where patients from all

over the country and belonging to different socioeconomic backgrounds are referred to. Hence, since the patients were recruited from this centre, we conceive our samples to be fairly representative of Uruguayan HCV-infected population. Nevertheless, we share the idea proposed by the authors [1] that having nationwide surveys would provide larger samples to support our studies. However, it is worth mentioning that such an approach would be very difficult to carry out in our country given that our HCV infection prevalence among general population is currently unknown [12]. In conclusion, following this line of thought, we believe that generalizations about the frequency of HCV resistance-associated substitutions (RASs) in the whole country are reasonably accurate. The purpose of our study was to contribute with an initial assessment of the presence of RASs to NS5A/NS5B inhibitors in a direct-acting antiviral agent treatment naïve cohort of Uruguayan patients chronically infected with HCV, and therefore, we encourage further studies on HCV resistance patterns.

Finally, we thank the authors for their comments and the editor for giving us the opportunity to clarify the concerns.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors’ Contributions

Fabián Aldunate and Natalia Echeverría contributed equally to this work.

References

- [1] S. Eybpoosh and M. Kiminezhad Malaie, "Comment on 'Pre-treatment hepatitis C virus NS5A/NS5B resistance-associated substitutions in genotype 1 Uruguayan infected patients'," *Disease Markers*, vol. 2018, Article ID 8698263, 2 pages, 2018.
- [2] F. Aldunate, N. Echeverría, D. Chiodi et al., "Pretreatment hepatitis C virus NS5A/NS5B resistance-associated substitutions in genotype 1 Uruguayan infected patients," *Disease Markers*, vol. 2018, Article ID 2514901, 9 pages, 2018.
- [3] M. Salemi, "Genetic distances and nucleotide substitution models – Practice," in *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*, P. Lemey, M. Salemi, and A. M. Vandamme, Eds., pp. 126–141, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2009.
- [4] G. Magiorkinis, E. Magiorkinis, D. Paraskevis et al., "The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis," *PLoS Medicine*, vol. 6, no. 12, article e1000198, 2009.
- [5] O. G. Pybus, M. A. Charleston, S. Gupta, A. Rambaut, E. C. Holmes, and P. H. Harvey, "The epidemic behavior of the hepatitis C virus," *Science*, vol. 292, no. 5525, pp. 2323–2325, 2001.
- [6] J. P. Allain, Y. Dong, A. M. Vandamme, V. Moulton, and M. Salemi, "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*, vol. 74, no. 6, pp. 2541–2549, 2000.
- [7] K. Strimmer and A. von Haeseler, "Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 13, pp. 6815–6819, 1997.
- [8] X. Xia and Z. Xie, "DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution," *Journal of Heredity*, vol. 92, no. 4, pp. 371–373, 2001.
- [9] X. Xia and P. Lemey, "Assessing substitution saturation with DAMBE - practice," in *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*, P. Lemey, M. Salemi, and A. M. Vandamme, Eds., pp. 624–630, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2009.
- [10] X. Xia, Z. Xie, M. Salemi, L. Chen, and Y. Wang, "An index of substitution saturation and its application," *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 26, no. 1, pp. 1–7, 2003.
- [11] Instituto Nacional de Estadística, *Resultados del Censo de Población 2011*, Instituto Nacional de Estadística, Montevideo, Uruguay, 2012.
- [12] N. Echeverría, P. Moreno, and J. Cristina, "Molecular evolution of hepatitis C virus: from epidemiology to antiviral therapy (current research in Latin America)," in *Human Virology in Latin America: From Biology to Control*, J. E. Ludert, F. H. Pujol, and J. Arbiza, Eds., pp. 333–359, Springer International Publishing, 2017.