

Tesis Doctoral

Coinfección HIV-Hepatitis C: análisis molecular de factores genéticos del HCV que influyen sobre la respuesta al interferón

Bolcic, Federico Martín

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bolcic, Federico Martín. (2012). Coinfección HIV-Hepatitis C: análisis molecular de factores genéticos del HCV que influyen sobre la respuesta al interferón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bolcic, Federico Martín. "Coinfección HIV-Hepatitis C: análisis molecular de factores genéticos del HCV que influyen sobre la respuesta al interferón". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Coinfección HIV-Hepatitis C: Análisis molecular de factores genéticos del HCV que influyen sobre la respuesta al interferón

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Federico Martín Bolcic

Director de Tesis: Dr. Jorge Fabián Quarleri

Consejero de Estudios: Dra. Laura Alché

Lugar de trabajo: Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2012

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Jorge Quarleri por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, ayudarme en mi preparación y aconsejarme tanto en temas laborales como personales.

Al Dr. Horacio Salomón por aceptarme en el laboratorio y brindarme todo su apoyo.

A mis compañeros de trabajo, Rita, Franco, Naty y Lu, por estar siempre presentes, dispuestos a ayudar, a prestar un oído y dar un consejo. A los chicos de la oficina, Mauri, Cris y Gaby, por tantas charlas amenas, mates y fines de semanas compartidos.

A Luci, por seguirme, aguantarme a mí y a mis viajes y por tratar de entender lo que hago.

A mi familia, por la comprensión y el apoyo incondicional.

Coinfección HIV-Hepatitis C: análisis molecular de factores genéticos del HCV que influyen sobre la respuesta al interferón

El virus de la hepatitis C y el HIV comparten las mismas vías de transmisión, lo que conlleva a una elevada tasa de coinfección. En este escenario, la tasa de respuesta al peg-IFN+RBV es más baja que en pacientes mono infectados con HCV.

El objetivo central de este trabajo fue estudiar si diferentes proteínas del HCV, estructurales (E2) y no estructurales del HCV (NS5A), son capaces de interrumpir las acciones antivirales desencadenadas por el IFN, contribuyendo hacia una respuesta disminuida a la terapia.

El genotipo de HCV implicado en la infección denotó una prevalencia elevada del 1a así como un crecimiento del 4. Ambos son conocidos por su baja tasa de respuesta al IFN. Se encontró una relación temporal en la introducción en Argentina del genotipo 1a del HCV y el subtipo BF de HIV.

La glicoproteína E2 no dio evidencia de rol alguno en la respuesta al tratamiento. Dominios definidos de la proteína NS5A arrojaron resultados encontrados dependiendo de la población bajo estudio. La co-presencia de HIV no parece impactar en la génesis de variantes de escape de HCV, ni modificar la composición de cuasiespecies. No obstante el HCV tendría capacidad replicativa en sitios extrahepáticos aunque las variantes virales halladas en células mononucleares de sangre periférica no exhibieron diferencias con las presentes en plasma.

La menor respuesta al tratamiento con peg-IFN+RBV en la coinfección guardaría relación con la mayor presencia de genotipos 1a y 4. La proteína NS5A podría contribuir en tal sentido. Es necesario analizar el rol que desempeñan factores inherentes al hospedador.

Palabras claves: HCV, E2, NS5A, peg-IFN+RBV, HIV

HIV-Hepatitis C Coinfection: Molecular analysis of HCV-related genetics factors that influence interferon response

The HIV and HCV share the same transmission routes which lead to a high prevalence of coinfection. In this scenario, the rate of response to peg-IFN + RBV is lower than in HCV monoinfected patients.

The aim of this work was to analyze whether different HCV proteins, structural (E2) and nonstructural HCV (NS5A), are able to disrupt viral actions triggered by IFN, contributing to a decreased response to therapy.

The HCV genotype infection epidemiology denoted that the most prevalent was 1a and genotype 4. Both are known for their low response rate to IFN. We found a temporal relationship in the introduction in Argentina of HCV genotype 1a and BF subtype of HIV.

The E2 glycoprotein gave no evidence of any role in the response to treatment. Defined domains of the NS5A protein yielded results depending on the population under study. The co-presence of HIV does not appear to impact the selection of HCV resistant variants, or modify the composition of quasispecies. However, the HCV may have replicative capacity in extrahepatic compartments but viral variants found in peripheral blood mononuclear cells did not differ with those present in plasma.

The lower response to treatment with peg-IFN + RBV in HIV coinfecting patients would be related to the increased presence of genotypes 1a and 4. NS5A protein could contribute to this effect. It is necessary to analyze the role that factors inherent to the host.

Key words: HCV, E2, NS5A, peg-IFN+RBV, HIV

ÍNDICE

ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Virus de la hepatitis C	2
1.1.1. Estructura del virus de la hepatitis C.....	2
1.1.2. Diversidad y genotipificación del HCV	4
1.1.3. Epidemiología del HCV	7
1.1.4. Vías de transmisión del HCV.....	8
1.1.5. Efecto de los interferones	9
1.1.6. Factores inherentes al hospedador y al virus que influyen la respuesta a la terapia basada en el uso de interferones.....	11
1.1.7. Escape del HCV a los efectores antivirales inducidos por peg-IFN+RBV	13
1.1.8. Compartimentalización del HCV	15
1.2.1 Características generales	16
1.2.2 Historia natural de la infección	18
1.2.3 Tratamiento antirretroviral.....	19
1.3.1. Características de la coinfección	20
1.3.2. Resistencia a la terapia con IFN en la coinfección.....	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
2.1. Hipótesis principal	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. Distribución de genotipos del HCV en pacientes infectados por HIV. Relación con los niveles de carga viral plasmática	29
3.2. Epidemiología molecular del HCV genotipo 4	29
Extracción del ARN	30
Ensayo de retrotranscripción (RT).....	30
Reacciones de PCR	31
Segunda amplificación (nested- PCR).....	31
Secuenciación nucleotídica	32
Análisis Filogenético.....	32
Máxima Verosimilitud	32
Análisis Bayesiano	33
Máxima Parsimonia.....	33

Remuestreo (<i>Bootstrap</i>) y edición de árboles	34
Análisis estadísticos	34
3.3. Epidemiología molecular del HCV genotipo 1a	34
Detección de viremia del HCV en pacientes infectados por HIV	34
Extracción de ARN, transcripción reversa, amplificación y secuenciación	35
Reacciones de PCR	35
Segunda amplificación (nested- PCR).....	37
Secuenciación y análisis filogenéticos del HCV y HIV	39
Análisis de recombinación	39
Análisis de aminoácidos	40
Análisis comparativo <i>in silico</i> de la unión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) a los péptidos del HCV.....	40
Análisis de Coalescencia Bayesiana	41
Análisis estadísticos	41
3.4. Impacto de las mutaciones en regiones genómicas asociadas a resistencia antiviral como elemento pronóstico de respuesta sostenida a la terapia antiviral interferón-basada.	42
Población bajo estudio (I)	42
Extracción del ARN, amplificación y secuenciación	42
Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP)	43
Determinación de la carga viral plasmática y recuento de linfocitos T CD4+	43
Secuenciación nucleotídica	43
Análisis de mutaciones e inferencias filogenéticas.....	44
Análisis estadístico	44
Población bajo estudio (II)	44
Extracción, amplificación, secuenciación y análisis de mutaciones	44
Análisis estadístico	45
3.5. Evolución molecular del HCV y análisis de la compartimentalización durante el tratamiento con peg-IFN+RBV	45
Extracción de ARN, amplificación y secuenciación	46
Clonado	46
Análisis de secuencias	46
Análisis filogenético y de coalescencia Bayesiana	47
Análisis de la heterogeneidad del HCV	47

El análisis de la diversidad a nivel nucleotídico se evaluó a nivel inter e intra paciente.....	47
Selección positiva y negativa	48
Análisis de poblaciones virales minoritarias en E2-PePHD por pirosecuenciación ultra-profunda (UDPS)	49
Análisis de aminoácidos	50
Análisis estadísticos	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Distribución de genotipos del HCV en pacientes infectados por HIV. Relación con los niveles de carga viral plasmática.....	52
4.2. Epidemiología molecular del HCV genotipo 4	54
Caracterización molecular y análisis filogenético de los aislamientos del HCV genotipo 4	54
Comparación con secuencias de bases de datos	55
4.3. Epidemiología molecular del HCV genotipo 1a.....	60
Análisis filogenético del HCV.....	61
Análisis de la composición de aminoácidos y de la predicción de la unión de los péptidos derivados del HCV-1a con el CMH clase I	64
Tasas de sustitución y tiempos de evolución del HCV-1a	65
Análisis filogenético y de recombinación de los aislamientos de HIV caracterizados a partir de pacientes coinfectados	66
4.4. Impacto de las mutaciones en regiones genómicas del HCV asociadas a resistencia antiviral como elemento pronóstico de respuesta sostenida a la terapia antiviral basada en el interferón	71
Población bajo estudio (II)	75
4.5. Evolución molecular del HCV y análisis de la compartimentalización durante el tratamiento con peg-IFN+RBV	78
Evolución del HCV basado en el análisis de secuencias de la región 5'UTR	78
Evolución del HCV basado en el análisis de secuencias del gen E2	80
Evolución del HCV basado en el análisis de secuencias del gen NS5A	83
Relación entre el número de mutaciones en E2 y NS5A y los niveles de carga viral	87
Tasas de sustitución del HCV	88
Compartimentalización del HCV.....	89

Selección positiva y negativa y, análisis de la heterogeneidad del HCV basado en las secuencias de NS5A durante el tratamiento.....	91
Conservación aminoacídica en la constitución de la glicoproteína E2-Análisis por UDPS.....	92
5. DISCUSIÓN.....	97
5.1. Distribución de genotipos del HCV en pacientes infectados por HIV. Relación con los niveles de carga viral plasmática.....	98
5.2. Epidemiología molecular del HCV genotipo 4	99
5.3. Epidemiología molecular del HCV genotipo 1a	101
5.4. Impacto de las mutaciones en regiones genómicas asociadas a resistencia antiviral como elemento pronóstico de respuesta sostenida a la terapia antiviral interferón-basada	102
5.5. Evolución molecular del HCV y análisis de la compartimentalización durante el tratamiento con peg-IFN+RBV	106
6. CONCLUSIONES	111
7. ANEXOS.....	114
7.1 Anexo I.....	115
7.2 Anexo II.....	119
7.3 Anexo III.....	120
7.4 Anexo IV.....	123
8. BIBLIOGRAFÍA.....	124

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

ADNdc: ADN doble cadena

ANNs: redes neuronales artificiales (*artificial neural networks*)

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*).

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

CTL: linfocito T citotóxico (*Cytotoxic T Lymphocyte*)

DS: desvío standard.

eIF2 α : factor eucariótico de iniciación 2 alfa de la transcripción

ETS: enfermedades de transmisión sexual

Gt: genotipo

HAART: tratamiento antirretroviral de alta eficiencia (*Highly Active Antiretroviral Treatment*).

HBV: virus de la hepatitis B

HCV: virus de la hepatitis C.

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus*).

HLA: antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigen*).

HPD: densidad posterior mayor (*high probabilistic density*)

HSH: hombres que tienen sexo con hombres.

IC: intervalo de confianza.

IFN: interferón.

peg-IFN: interferón pegilado alfa.

IRES: sitio interno de entrada al ribosoma (*internal ribosome entry site*)

ISG: gen estimulado por el interferón (*interferon stimulated gene*)

ISDR: región determinante de la sensibilidad al interferón (*interferon sensitivity determining region*.)

jpHMM: *jumping profile Hidden Markov Model*

LT-CD4+: linfocitos T CD4+.

MCMCMC: cadenas de markov de monte marlo acoplada a metrópolis

NS: no estructural (*non structural*)

NR: no respuesta

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PePHD : región con homología al sitio de fosforilación del factor eucariótico de iniciación 2α (*protein kinase -eIF2-alpha phosphorylation homology domain*)

PKR: proteína quinasa R

PKRBD: dominio de unión a la proteína quinasa R

RBV: ribavirina.

RVR: respuesta virológica rápida

RT: transcriptasa reversa (*Reverse Transcriptase*).

RT-PCR: transcripción inversa acoplada a amplificación por PCR.

Sida: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

RVS: respuesta virológica sostenida (*sustained virological response*)

UDI: usuario de drogas inyectables.

UTR: región no traducible (*un-translated region*)

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Virus de la hepatitis C

1.1.1. Estructura del virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (HCV) es envuelto, con genoma ARN monocatenario de polaridad positiva, de aproximadamente 9,6 kb, y ha sido clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* en el género *Hepacivirus* [1]. En la figura 1.1 se muestra un esquema representativo de la partícula viral.

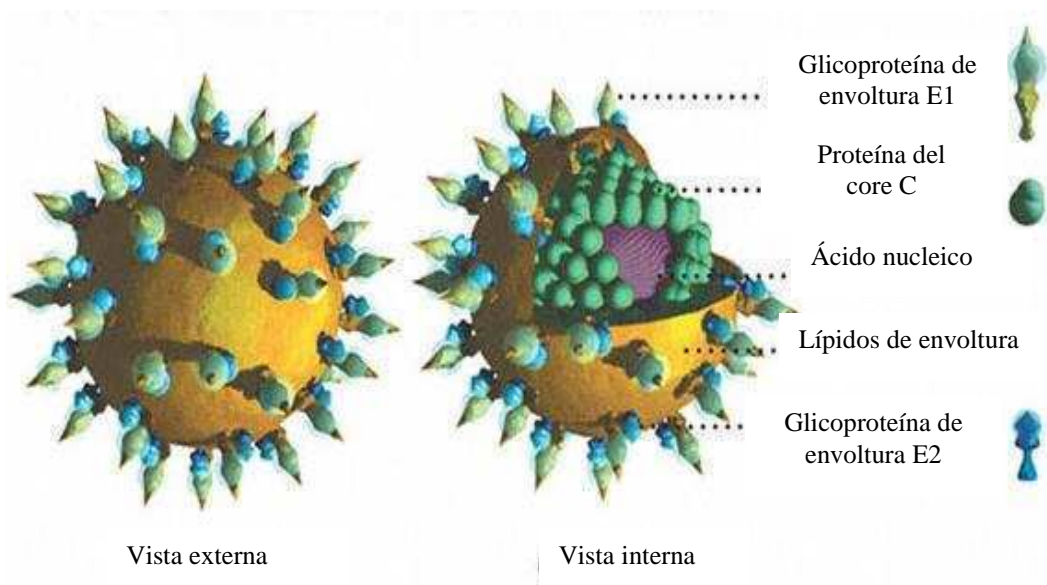


Figura 1.1: Estructura del virus de la hepatitis C
Modificado de Louis E. Henderson PhD. The PNR Notebook Online [2]

La transcripción del genoma viral a partir de un largo marco de lectura genera una poliproteína precursora (Figura 1.2). El clivaje de este precursor da como resultado la formación de cuatro proteínas estructurales (*core*, p7 y glicoproteínas de envoltura 1 y 2) y seis no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) y está mediado por, al menos, tres enzimas que pueden ser tanto celulares como virales [3]. Las proteasas virales son NS2-NS3 y NS3, pero para que cumplan su función, necesitan de la interacción con otra proteína viral, NS4A, que actúa como co-factor de la proteasa NS3 [4]. En la figura 1.2 se muestra un esquema del genoma del HCV.

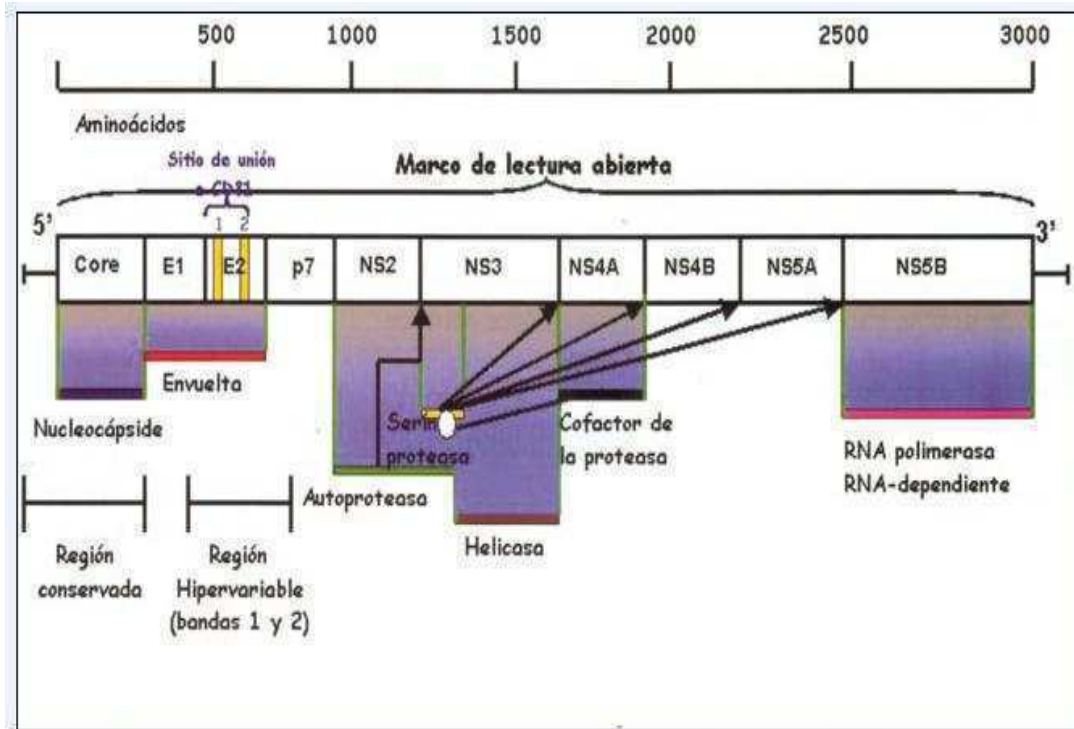


Figura 1.2: Estructura del genoma del virus de la hepatitis C. Pueden apreciarse tanto las regiones codificantes de las proteínas estructurales como las no estructurales. A ambos extremos del único marco abierto de lectura (5' y 3') se encuentran dos regiones no codificantes de proteínas (UTR). Modificado de Dariela Micheloud. Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas, 2008 [5].

La proteasa NS2-NS3 es una enzima dependiente de zinc y produce el clivaje entre NS2 y NS3, perdiéndose así, la actividad proteínica de esta enzima. NS3 es una serina proteasa que cliva los sitios entre NS3 y NS4A [3].

La proteína NS4B es rica en residuos aminoacídicos hidrofóbicos y su función todavía se desconoce, aunque recientemente ha sido reportado que podría estar involucrada en el ensamblado viral [6].

La proteína no estructural NS5A se encuentra fosforilada en los residuos serina de la región C-terminal. Aunque no se conoce el rol de esta proteína en el ciclo de replicación viral, se le han adjudicado características genéticas asociadas a la sensibilidad del HCV al interferón (IFN). Se ha caracterizado una región de 40 aminoácidos, denominada región determinante de la sensibilidad al interferón (ISDR), que junto con una secuencia adicional de 26 aminoácidos han sido postulados como inhibidores de la respuesta al IFN [4].

La región codificante NS5B da lugar a la ARN polimerasa ARN dependiente [7, 8]. Se han desarrollado diversos agentes con el fin de inhibir la función de esta proteína a

modo de antivirales directos, aunque a la fecha su uso terapéutico no está disponible para todo el mundo [9].

La proteína del *core* es rica en aminoácidos básicos y en residuos de prolina, y tiene la capacidad de unirse al extremo 5' no traducible (5'UTR) del genoma viral. Esta proteína se obtiene por el clivaje de la porción N-terminal del precursor proteico. Esta acción es realizada por proteasas celulares. La proteína del *core* juega un rol importante en la regulación del crecimiento de células infectadas por el HCV, en la transformación a un fenotipo tumoral y en el desarrollo de carcinoma hepatocelular [10, 11]. Se ha reportado la interacción de la proteína del *core* con diversos promotores, como por ejemplo los del virus de la hepatitis B (HBV) [12] y del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) [13].

Las glicoproteínas de envoltura 1 (E1) y 2 (E2) están codificadas "río abajo" de la región que codifica a la proteína del *core*. E1 y E2 forman heterodímeros por enlaces no covalentes, que probablemente representan al complejo pre-brotación. También se ha demostrado que la proteína E2 puede interactuar con la proteína quinasa ARN-dependiente inducible por IFN (PKR) que se activa ante la presencia de ARN doble cadena. En dicha interacción se implica un dominio de fosforilación homólogo al factor eucariótico de iniciación de la transcripción (eIF2 α) por PKR que actuaría como sustrato alternativo. De este modo, se evadiría la acción antiviral de la PKR, permitiendo que el factor eucariótico permanezca desfosforilado y activo para proseguir con la síntesis proteica, y por ende la replicación viral [14, 15]. Junto a la proteína E2 se sintetiza una pequeña proteína de 7 kD llamada p7, cuya función actual es desconocida, aunque estudios *in-vitro* la han caracterizado como un canal iónico [16].

1.1.2. Diversidad y genotipificación del HCV

El HCV fue identificado por primera vez en 1989 y en la actualidad se conocen al menos 6 genotipos diferentes y más de 70 subtipos distribuidos geográficamente [17-19].

La heterogeneidad genética es una característica del virus de la hepatitis C. Así como otros virus ARN, el HCV posee una alta tasa de fijación de mutaciones, alrededor de $1,44-1,92 \times 10^{-3}$ cambios de nucleótido por posición genómica por año, dada por la incapacidad de la polimerasa viral de corregir los errores introducidos por ella misma. Estos errores de la polimerasa generan variantes virales conocidas como *cuasiespecies*. El término cuasiespecies hace referencia a la heterogeneidad genética dentro de un

mismo individuo infectado, y dicha complejidad puede estar dada tanto por la infección *de novo* con una población de virus heterogénea como por la acumulación de mutaciones durante el curso de la infección.

La clasificación del HCV fue consensuada con la publicación de un trabajo en 1993 [12, 17], el cual proponía la clasificación por métodos filogenéticos de 6 genotipos distintos, designados del 1 al 6. Estos grupos equidistantes genéticamente pueden, a la vez, subdividirse en distintos subtipos (Figura 1.3). Los tipos difieren a nivel nucleotídico en un 31-33%, mientras que los subtipos se diferencian unos de los otros en un 20-25%. En adelante se hace referencia genéricamente a la combinación de ambos como “genotipos”.

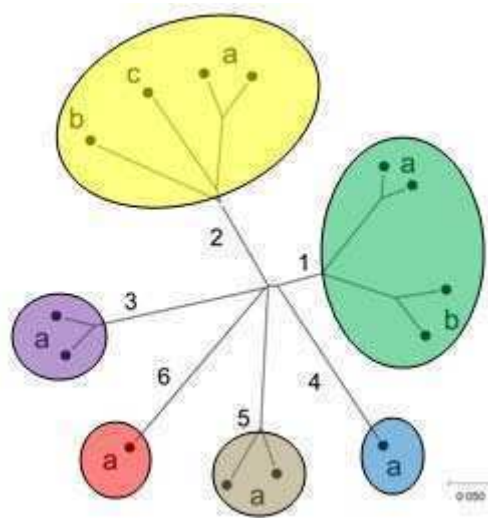


Figura 1.3: Esquema representativo de la distribución filogenética de los diversos genotipos y subtipos del HCV. Los números corresponden a los genotipos y las letras a los subtipos.

Modificado de Simmons P., *Journal of General Virology*, 2004 [20].

La identificación genotípica es clínicamente importante debido a las diferencias en la resistencia a la terapia con IFN, exhibiendo los genotipos 1 y 4 mayor resistencia que los genotipos 2 y 3 [21]. A causa de esto, muchos de los protocolos de tratamiento requieren la información genotípica para establecer un tratamiento adecuado, para determinar la dosis a usar y el tiempo de duración del mismo [22].

A pesar de que la recombinación es importante en la mayoría de los virus de ARN, hasta hace poco la evidencia de recombinación en el HCV era escasa [23], sugiriendo que estos eventos eran raros *in vivo* y que el resultado de la recombinación era inviable [24]. Sin embargo, en los últimos años, se han identificado algunos eventos naturales de recombinación intra-genotipo (inter-subtipo) y eventos intra-cepas, cambiando así las

ideas previas acerca de la ausencia de recombinación en este virus. Esta opinión se basaba en dos razones principales. Por un lado, hasta el año 2002 ni un solo caso convincente y bien caracterizado de cepas del HCV recombinante habían sido identificadas [25]. Por otro, la evidencia experimental sugería que la sobreinfección por otra cepa del HCV era imposible en las células previamente infectadas por el HCV [26]. Teniendo en cuenta que para que la recombinación viral se produzca es necesario que los dos virus diferentes infectaran la misma célula al mismo tiempo, la imposibilidad de sobreinfección también impidió la aparición de virus recombinantes [27].

Aunque las evidencias de recombinación son escasas, sigue siendo un mecanismo de variabilidad viral que podría generar variantes de escape al tratamiento. Por lo tanto, desde que se dispone de evidencia de recombinación homóloga, la tipificación genómica del HCV requeriría estrictamente de la secuenciación del genoma completo [25]. Dada lo impráctico de ello, se recurre al empleo de técnicas de mayor versatilidad. Entre éstas, merecen mencionarse aquellas que se basan en el análisis de secuencias de un segmento amplificado del genoma viral. Ampliamente utilizada es la región 5' no traducible (5'UTR), debido al uso concomitante de ella en la pesquisa del ARN del HCV con fines diagnósticos. Aunque esta región está altamente conservada, hay un conjunto de polimorfismos bien caracterizados que permite predecir el genotipo, que pueden ser detectados por sondas de hibridación [28, 29], cambios en los sitios de restricción por endonucleasas [30, 31] o por el análisis por secuenciación directa [32].

La genotipificación usando la 5'UTR posee más del 95% de concordancia con la identificación genotípica por secuenciación directa de la región NS5B (considerada como "gold standard") u otras regiones codificantes del genoma [12, 33].

Recientemente ha sido reportado que las regiones genómicas E2 y NS5A proveen una gran información filogenética en términos de la caracterización genotípica del HCV [34].

La clasificación de las variantes del HCV en los 6 grupos genéticos es respaldada por cada uno de los principales métodos de análisis filogenético de la región del *core*/E1, NS5B y la secuencia completa del genoma.

1.1.3. Epidemiología del HCV

El HCV es responsable del 20% de las hepatitis agudas y más del 70% de las crónicas. La hepatopatía crónica por el HCV afecta del 1 al 3% de la población mundial, aproximadamente unos 170 millones de personas, lo cual constituye un problema sanitario de gran magnitud [35].

En el 70-80% de los casos la infección aguda por el HCV es asintomática y raramente evoluciona a la forma fulminante. Tras la infección aguda, aproximadamente el 20% de los pacientes son capaces de aclarar la viremia y por tanto curarse, mientras que el resto permanecerán con una infección crónica [36].

Algunos genotipos del HCV se distribuyen mundialmente, mientras que otros están más confinados geográficamente (Figura 1.4). Los más comúnmente encontrados en los países del Oeste han sido clasificados como 1a y 1b para el genotipo 1, y 2a, 2b y 2c para el genotipo 2. Es así como los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a se encuentran en más del 90% de las infecciones por el HCV en América del Norte y del Sur, en Europa, Rusia, China, Japón, Australia y en Nueva Zelanda. El genotipo 3a se encuentra más comúnmente distribuido en Asia, aunque su distribución ha sido mundialmente descrita [20]. Otros subtipos del genotipo 3 son altamente prevalentes en Nepal, India y Pakistán. En Egipto se ha encontrado una gran dominancia del genotipo 4a. En África central se encuentran tanto genotipos 4a como otros subtipos del genotipo 4, mientras que en Sudáfrica el genotipo 5a predomina en el 50% de todas las infecciones. El genotipo 6 se ha encontrado principalmente en el sudeste asiático. Estas variantes se han distribuido ampliamente en los últimos 50-70 años debido a la transfusión sanguínea, al intercambio de agujas en los usuarios de drogas inyectables y a varios procedimientos médicos invasivos como las cirugías. Es por esto que la distribución de los genotipos puede variar significativamente entre los diferentes grupos poblacionales, aunque se encuentren presentes en la misma área geográfica [37].

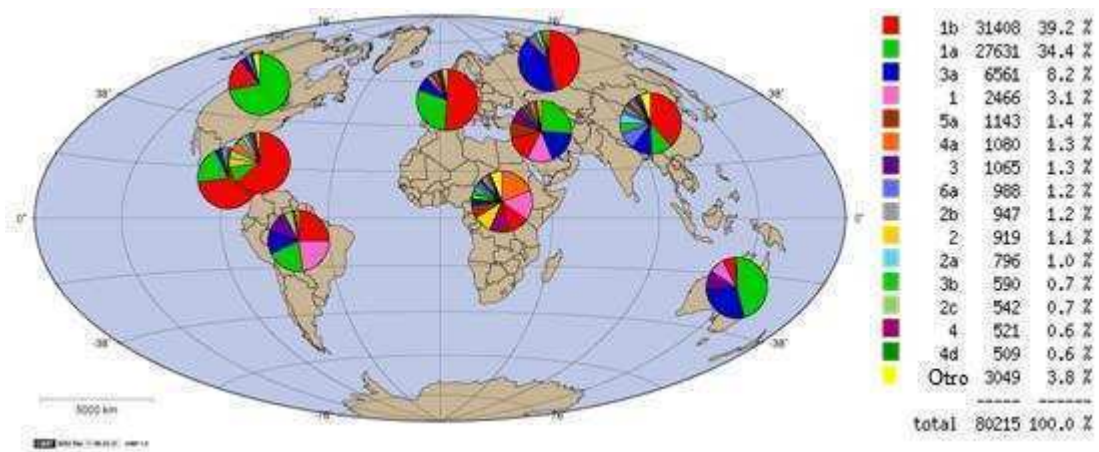


Figura 1.4: Distribución mundial de los genotipos del virus de la hepatitis C.

Modificado de Kuiken C. y col., Bioinformatics, 2005 [38].

En Argentina, los genotipos que se encuentran en mayor proporción son el 1, 2 y 3 (Figura 1.5). Los subtipos predominantes para el genotipo 1 son, el 1b que está presente en el 30% de las infecciones y el 1a/c, presente en un 23,5%. Para el genotipo 2 se encuentra un 23% de los subtipos 2a/c y 2b/c, mientras que el genotipo 3 sólo están presentes en un 8,6% de los casos, representado por los subtipos 3a/b/c/d/e. El 14,8% restante corresponde a otras infecciones [39, 40].

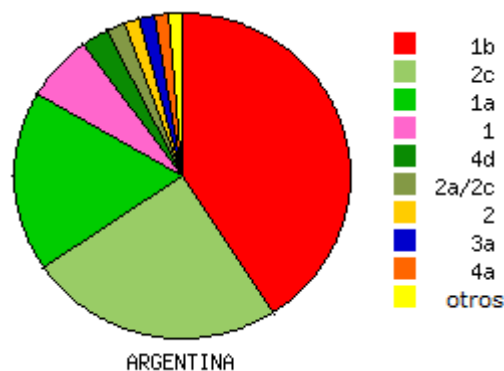


Figura 1.5: Distribución de los genotipos del HCV en la República Argentina.

Modificado de Kuiken C. y col., Bioinformatics, 2005 [38].

1.1.4. Vías de transmisión del HCV

La transmisión ocurre principalmente por exposición parenteral a sangre y hemoderivados contaminados. Las agujas y las jeringas infectadas son los principales vehículos de propagación, especialmente entre los usuarios de droga inyectables (UDI)

donde se dan las mayores tasas de infección [41, 42]. La transmisión del HCV por otras vías como, contacto familiar y contacto sexual, parece ser menos eficiente que la vía parenteral [43, 44]. Si la transmisión sexual sucede, una estimación razonable del riesgo sería del 5%, y este riesgo parece estar asociado fundamentalmente a las múltiples parejas sexuales más que a las parejas estables que son sexualmente monógamas. La transmisión perinatal de madres infectadas a los recién nacidos, aunque es infrecuente, también ha sido documentada [45]. En contraste con la alta eficiencia existente en la transmisión perinatal del HBV, la transmisión perinatal del HCV ocurre en mujeres con elevada viremia, riesgo que se incrementa de manera significativa cuando la madre está coinfectada con HIV debido a un incremento en la carga viral del HCV a consecuencia de la inmunodepresión [43, 44]. Alrededor del 5% de los recién nacidos de madres infectadas con el HCV se infectan al nacer [46].

Desafortunadamente no existe tratamiento que pueda prevenir este hecho. En conjunto, las exposiciones parenteral, sexual y perinatal constituyen los factores de riesgo identificados en la mayoría de los casos de hepatitis C. Sin embargo, existe un porcentaje sustancial de casos (del 30 al 40%) donde la vía de la infección no puede ser definida.

1.1.5. Efecto de los interferones

El IFN es la base del tratamiento actual tanto para pacientes mono infectados como coinfectados con HIV [47].

Los interferones son un grupo de proteínas y glicoproteínas de origen natural, conocidas por poseer efectos antivirales, antiproliferativos e inmunoreguladores. Normalmente individuos sanos no poseen elevados niveles de IFNs en circulación. Los IFNs aparecen en sangre en respuesta a una infección, a antígenos y a mitógenos. Este aumento de los IFNs en circulación constituye la primera línea de defensa contra una infección.

Han sido identificadas tres clases de IFNs, designados tipos I, II y III y clasificados de acuerdo con la cascada de señales que desencadena el complejo del receptor. El IFN tipo II consiste únicamente en el producto del gen del IFN- γ que genera una respuesta inmune a patógenos diferentes a los virus. A la fecha poco se conoce sobre los IFNs del tipo III, aunque se sabe que regulan la respuesta antiviral y que han sido propuestos como los ancestros de los IFNs del tipo I [48].

Los IFNs del tipo III (interferón lambda [IFN- λ] o interleuquinas-28/29 [IL-28/29]) fueron recientemente descubiertos. Se los ha caracterizado por poseer propiedades similares a los IFNs tipo I [49], habiéndose demostrado además que utilizan la misma cascada de señalización para la regulación de la expresión de genes involucrados en control de la replicación viral y la proliferación celular [50].

Los IFNs del tipo I comprenden a los IFN- α y β y son esenciales para la generación de una respuesta robusta contra una infección viral [51]. Así, los IFNs del tipo I son las primeras citoquinas producidas luego de la infección viral, lo que induce un estado antiviral en las células vecinas dado por una regulación positiva de los genes estimulados por el IFN (ISGs) [51, 52].

Uno de los mecanismos de señales antivirales mejor caracterizado de los IFNs tipo I es el mediado por la proteína quinasa dependiente de ARNdc (*PKR*) [51, 53, 54]. La unión del ARNdc durante la replicación viral altera la conformación de la *PKR*, llevando a una dimerización y a la activación por autofosforilación. Una vez activada, la *PKR* fosforila la subunidad α del factor eucariótico de iniciación 2 α (eIF-2 α), inhibiendo así la traducción proteica e inhibiendo la replicación viral [55]. No es de sorprender que muchos virus hayan desarrollado mecanismos para evadir los efectos antivirales de *PKR* [56-59] (Figura 1.6).

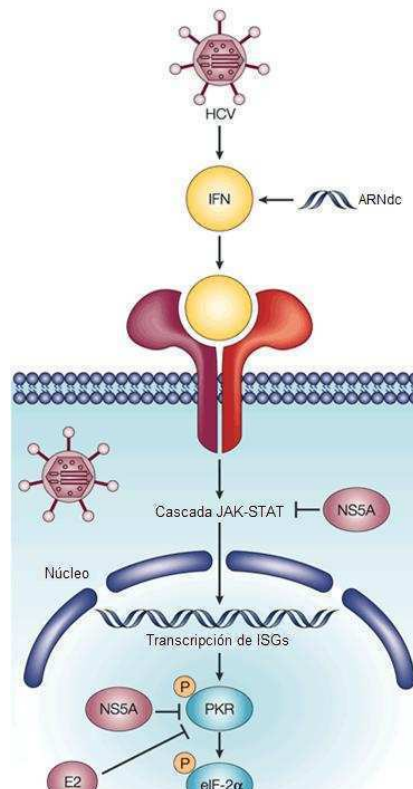


Figura 1.6: Mecanismo de acción del IFN y blancos de acción de las proteínas virales. El IFN activado por antígenos virales o el ARNdc estimula la cascada de señalización JAK-STAT que induce a la transcripción de los genes estimulados por el IFN. Estos activan a la PKR que fosforila al eIF-2 α y así se inhibe a replicación viral. El HCV posee proteínas (E2 y NS5A) capaces de contrarrestar la acción de la PKR y así escapar a la acción antiviral.

Modificado de Katze M.G y col., Nature Reviews Immunology, 2002 [58].

1.1.6. Factores inherentes al hospedador y al virus que influyen la respuesta a la terapia basada en el uso de interferones

Aunque se han hecho considerables mejoras para el tratamiento de pacientes con hepatitis C crónica, la terapia antiviral actual consiste en la combinación del interferón pegilado (peg-IFN) con el análogo de nucleósido ribavirina (RBV), que lleva a una tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) en solo el 38-63% de los pacientes [60-63]. Se ha denominado RVS a la ausencia de ARN viral detectable tras 24 semanas de finalizado el tratamiento. La terapia consiste en la administración subcutánea del peg-IFN semanalmente y RBV oral diariamente, durante 48 semanas.

El cumplimiento del tratamiento y la aparición de efectos adversos son cruciales para el éxito de la terapia. Los efectos secundarios más comunes del interferón/ribavirina son malestar general, fiebre, mialgias, dolor de cabeza, alteración del estado de ánimo (depresión, ansiedad) y hemólisis de glóbulos rojos [64]; que llevan a discontinuar la terapia en un 15-25% de los pacientes [65]

Diferentes factores pronóstico de respuesta al tratamiento con IFN han sido descritos a fin de disminuir el tiempo de tratamiento y mejorar la calidad de vida del paciente. Entre ellos se destacan:

- *Género*: Ha sido reportada una asociación entre el género femenino y la respuesta virológica sostenida [66], aunque en algunos casos esa asociación no sea estadísticamente significativa [60, 61].
- *Edad*: En todos los grandes estudios prospectivos de tratamiento con peg-IFN+RBV se ha reportado que a los pacientes jóvenes tiene mayor tasa de respuesta al tratamiento, siendo los menores de 40-45 años los que poseen mejor pronóstico de respuesta [60, 61, 66, 67].
- *Diversidad genética*: Estudios en tejidos hepáticos sugieren que los pacientes no respondedores tienden a expresar grandes cantidades de ISG

como parte de la cascada de regulación del IFN [68-70]. Recientemente ha sido publicado que el polimorfismo genético cerca del gen IL28B, que codifica para el interferón- λ -3, está altamente asociado con la respuesta al tratamiento [71].

- *Parámetros histológicos:* Un estado avanzado de fibrosis y cirrosis hepática ha sido asociado con baja respuesta al tratamiento basado en el interferón [66].
- *Carga viral basal del HCV:* Bajos niveles de ARN viral en plasma (<600,000–800,000 IU/ml o menos) han sido determinados como predictores de la respuesta virológica sostenida, independientemente del genotipo [61, 66, 67, 72-74], así, aquellos pacientes con bajos niveles del HCV en plasma tienen una mayor probabilidad de responder a la terapia.
- *Genotipo:* El genotipo del HCV es el factor viral pronóstico de respuesta a la terapia basada en interferón- α más importante en la muestra basal. En numerosos estudios se ha demostrado que los pacientes infectados con los genotipos 1 y 4 poseen menos probabilidades de llegar a la RVS que aquellos infectados con otros genotipos, si son tratados durante el mismo tiempo [61, 66, 67, 72, 74]. Las tasas de respuesta de pacientes infectados con el genotipo 1 van del 41% al 52%, luego de 48 semanas de peg-IFN+RBV, mientras que para los genotipos 2 y 3 las tasas son del 76-84% [60, 75].
- *Cinética viral:* Una respuesta viral rápida (RVR) determinada como la ausencia de ARN en plasma a la cuarta semana de tratamiento es uno de los factores pronósticos más importantes de RVS, siendo de un 86-100%, independientemente del genotipo [76, 77]. La ausencia de una respuesta viral temprana (RVT), definida como la caída en 2 o más Log₁₀ de la carga viral o ARN indetectable a la semana 12 de tratamiento, mostró una probabilidad de alcanzar una RVS de 0-3%, llevando a la suspensión de la terapia [60, 78]. Aquellos pacientes que hayan continuado el tratamiento y que posean ARN detectable a la semana 24, poseen un 98-100% de posibilidades de fallar al mismo [61, 78, 79].

Con el tratamiento estándar de la hepatitis C crónica, la combinación de interferón pegilado alfa y ribavirina, las tasas de respuesta virológica sostenida se puede lograr, tan

sólo en aproximadamente el 50% de los pacientes. Una mejor comprensión del ciclo de replicación del virus ha llevado a la identificación de numerosos blancos potenciales de acción directa de nuevos compuestos antivirales. Los inhibidores de la proteasa NS3/4A son actualmente los más avanzados en desarrollo clínico. Recientemente se completaron estudios en fase III de los dos inhibidores de la proteasa *telaprevir* y *boceprevir*. Cada uno se administra en combinación con el tratamiento estándar de peg-IFN+RBV, obteniéndose tasas de RVS en pacientes con infección del HCV de genotipo 1 en el rango de 66-75% en pacientes sin tratamiento previo y el 59-66% en pacientes tratados con anterioridad [80].

Los inhibidores de la proteína NS5A del HCV y de la polimerasa NS5B son potencialmente activos a través de diferentes genotipos del HCV y han mostrado prometedora eficacia antiviral en los primeros estudios clínicos [81, 82].

Si bien la mejora de las actuales terapias para el HCV también se están desarrollando, las esperanzas futuras dependen de la combinación de antivirales de acción directa, con la posibilidad eventual de excluir al IFN en la terapia [83].

1.1.7. Escape del HCV a los efectores antivirales inducidos por peg-IFN+RBV

Se han llevado a cabo diferentes estudios tendientes a explicar la resistencia del genotipo 1 a la terapia basada en IFN [84]. Una fuerte correlación ha sido exhibida entre el número de mutaciones dentro de la región carboxilo terminal de la NS5A, que abarca desde el codón 2209 hasta el 2248, y denominada por tal asociación como “región determinante de la sensibilidad al interferón (ISDR)” (Figura 1.7), y la respuesta a la terapia por IFN. Así, ningún paciente infectado con virus HCV del “tipo salvaje” en su secuencia ISDR respondió a la terapia basada en IFN, mientras que todos aquellos infectados con el “tipo mutante” del virus (definido por la presencia de 4 o más sustituciones aminoacídicas en ISDR) mostraron una RVS [85]. A pesar de algunos hallazgos controversiales reportados particularmente en Europa y EE.UU [85, 86], la ISDR provee una importante clave sobre un potencial mecanismo específico por el cual genotipos específicos del HCV podrían escapar a la respuesta inducida por el IFN. Basado en la expresión heteróloga de NS5A en cultivo celular y sistemas *in vitro*, fue demostrada la capacidad de interactuar e inhibir a la PKR celular (Figura 1.6). La capacidad de NS5A de unirse a la PKR requiere aparentemente de la ISDR como así también de los 26 aminoácidos adyacentes (es decir desde 2209 a 2274) [87-89].

En modo semejante, más cambios aminoacídicos fueron observados en aislamientos del HCV genotipo 1, de pacientes respondedores al IFN, estando ellos concentrados en dos regiones variables en el extremo carboxilo terminal de NS5A. Las dos regiones variables corresponden a dos previamente descritas, V3 (situada cercana a la señal de localización nuclear -345 a 362- y a la región rica en prolina -PRR, 310-354-) y una nueva región variable (310 a 330) [90].

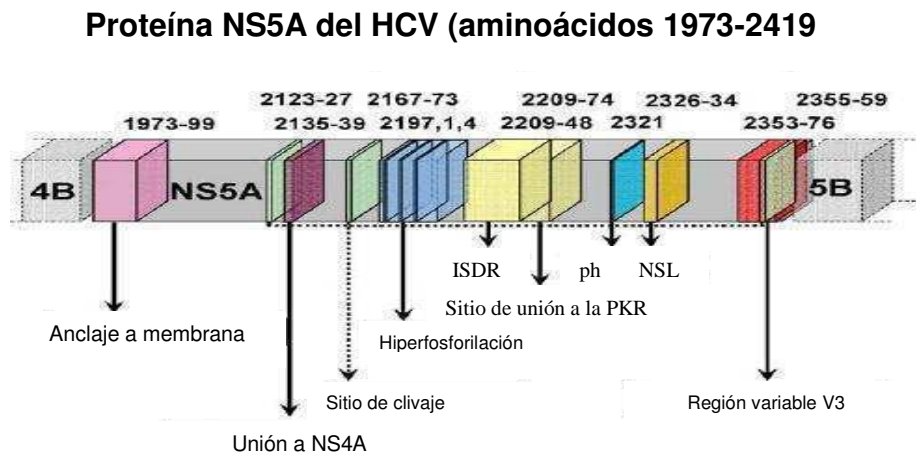


Figura 1.7: Proteína NS5A con sus putativas regiones funcionales. ISDR, región determinante de sensibilidad al interferón; ph, sitio de fosforilación; NLS, señal de localización nuclear.

Modificado de Hoffman W. P. y col, Journal of Clinical Virology, 2004 [91].

Basado en hallazgos previos *in vitro* producto de trabajos con replicones subgenómicos del HCV, la presencia de mutaciones definidas en la región NS5A facilitarían la replicación viral [92].

En modo semejante, la glicoproteína de envoltura E2 presenta una región con homología por el sitio de fosforilación al factor eucariótico de iniciación 2 α o “PePHD” (Figura 1.8), que actuaría ofreciéndose a la PKR como sustrato alternativo de fosforilación, permitiendo que la síntesis proteica prosiga (Figura 1.6). Esta estrategia ha sido postulada en modo restrictivo al genotipo 1 [85].

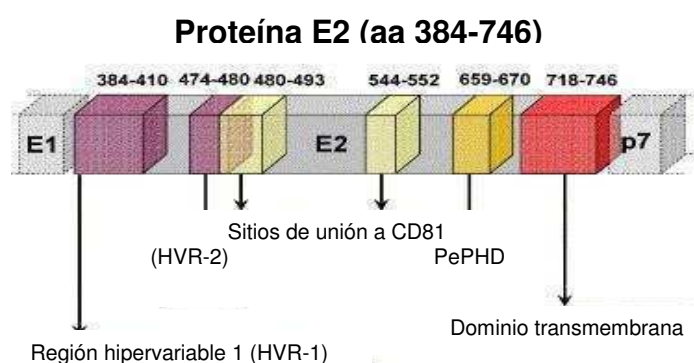


Figura 1.8: Proteína E2 y regiones con funciones diferenciales, PePHD: dominio homólogo a eIF2 α de fosforilación por PKR.

Modificado de Hoffman W. P. y col, Journal of Clinical Virology, 2004 [91].

1.1.8. Compartimentalización del HCV

A pesar que los hepatocitos son considerados como el principal blanco celular de replicación del HCV, ensayos clínicos y experimentales indican que el virus también infecta y se replica en células de otros órganos, especialmente del sistema inmune [93-95]. De esta manera, el HCV puede efectivamente beneficiarse de uno de los mecanismos más eficaces para establecerse a largo plazo, como se ha documentado para otros virus, igualmente capaces de inducir las infecciones persistentes [96-98].

Por purificaciones de afinidad se observó que el HCV podía infectar diferentes tipos celulares dentro de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), como por ejemplo las células linfoides T CD4 + y CD8 +, células linfoides B, monocitos y macrófagos [99].

La existencia de un reservorio viral podría estar implicada en recurrencias durante la hepatitis crónica, tanto después del tratamiento antiviral, aparentemente con éxito, como después de un trasplante de hígado debido a la cirrosis causada por el HCV [100]. En cuanto a la recurrencia de la hepatitis crónica, se observa que un número significativo de pacientes, tratados con interferón, inicialmente alcanzan niveles indetectables de ARN en plasma, pero recaen ya sea durante o después del tratamiento. Uno de los mecanismos propuestos para la recaída es que las CMSP sirven como reservorio viral de cepas resistentes al IFN. En algunos estudios se ha sugerido que la infección de las CMSP podría ser considerado como un factor pronóstico negativo con respecto a la respuesta de los pacientes [101-104].

Se ha postulado que factores virales podrían influenciar el tropismo viral. Así, un estudio reciente mostró que una proporción significativa de pacientes con hepatitis C es coinfectado por dos o más variantes del HCV con distintas secuencias en el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), dentro de la región 5'UTR, y que poseían diferente tropismo celular. Así, esta compartimentalización podría ser un fuerte predictor independiente de la eficacia del tratamiento [105]. En este sentido, se han descrito tres mutaciones puntuales (G107A, C204A y G243A) en la región 5'UTR, que favorecerían la replicación del HCV en células linfoides [106, 107]. El estudio de estas mutaciones en

aislamientos de plasma podría predecir la infección de las CMSP y la posible respuesta ante la terapia IFN-basada.

1.2 Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1.2.1 Características generales

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y su estadio final, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), se han convertido en el mayor desafío de la salud pública de los tiempos modernos, con más de 25 millones de personas fallecidas y más de 33 millones de personas viviendo con HIV/sida, la mayoría de ellos sin acceso al tratamiento [108].

Hasta el momento se han descrito dos tipos del virus, HIV-1 y HIV-2, ambos asociados al sida. La infección por el HIV-1 se distribuye mundialmente, mientras que la infección por el HIV-2 se encuentra circunscripta a la región sur del Sahara de África [109, 110].

Se puede clasificar al HIV-1 en tres grupos, M, N y O. El grupo M, incluye al menos 9 subtipos y 125 formas recombinantes intersubtipo [111].

Hoy en día no hay regiones en el mundo que no hayan sido afectadas por esta pandemia (Figura 1.9).

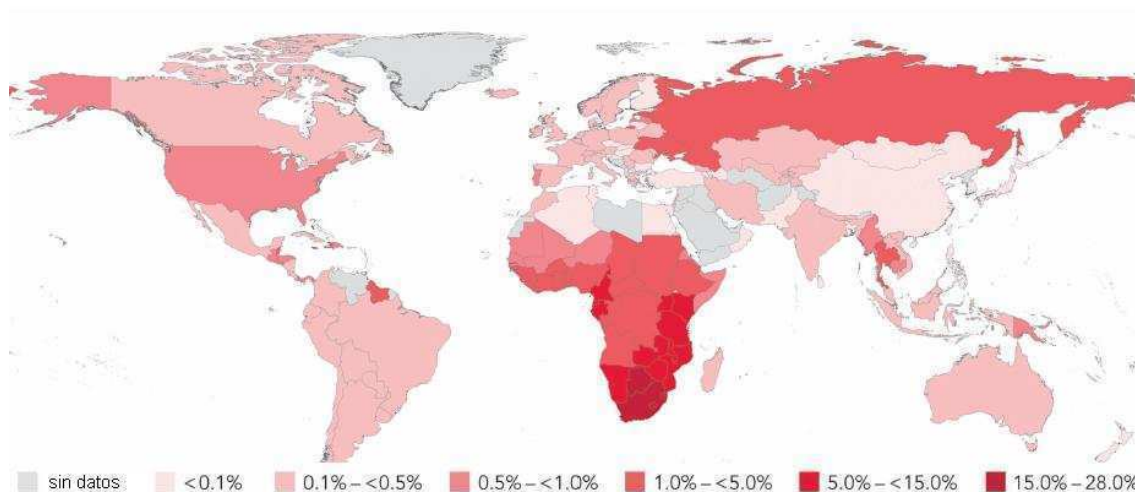


Figura 1.9: Mapa mundial de prevalencia de HIV en 2009 (de Reporte de epidemia mundial de sida 2010) [112].

Según estimaciones, el número de personas fallecidas a causa de enfermedades relacionadas a sida está disminuyendo desde 2004, fenómeno éste que está relacionado con el acceso a terapia antirretroviral y al cuidado de las personas que viven con HIV.

En América latina y el Caribe hay aproximadamente 2,1 millones de niños y adultos viviendo con HIV, de los cuales 233.000 son nuevas infecciones y al menos 90.000 fallecieron a causa del sida [112].

Las estimaciones realizadas en el año 2008 en forma conjunta entre ONUSIDA, OMS y la Dirección de Sida y ETS del Ministerio de Salud de la Nación muestran que aproximadamente 130.000 personas viven con HIV/sida en Argentina, de las cuales un 50% desconocerían su situación serológica.

En la Argentina existe una epidemia concentrada ya que la prevalencia en la población general es del 0,4% mientras que en determinados grupos vulnerables la misma supera el 5%; 12% entre homosexuales y otros hombres que tienen sexo con hombres, 7% entre usuarios de drogas, 5% entre trabajadores/as sexuales, 34% entre personas travestis-transexuales.

Las vías de transmisión del HIV se encuentran bien definidas habiendo sido descriptas las vías sexual, parenteral y vertical. Las relaciones sexuales no protegidas son la ruta más importante de transmisión del HIV. Existen tres formas de transmisión sexual: vaginal, anal y oral. Esta vía de transmisión se puede dar entre relaciones heterosexuales, en relaciones de hombres que tienen sexo con hombres y, excepcionalmente, entre mujeres. El sexo anal receptivo es considerado el de mayor riesgo de infección [113]. También han sido descripto casos de transmisión a través de sexo oral no protegido [114], siendo ésta una vía de transmisión menos eficaz que las relaciones vaginales o anales [115]. Cuanto menor es la carga viral del HIV en los diferentes fluidos orgánicos menor es la posibilidad de transmisión de la infección. Inversamente cuanto mayor es la carga viral, mayor es el riesgo de infección [116].

Diversos mecanismos están implicados en la transmisión del HIV por vía parenteral: inoculación de sangre o hemoderivados infectados, trasplante de órganos desde un donante infectado y maniobras con instrumentos corto-punzantes, entre los que se incluyen la práctica de compartir jeringas entre usuarios de drogas inyectables y los accidentes del personal de salud. El riesgo de contagio aumenta concomitantemente con el número de exposiciones, de tal forma que los usuarios de drogas inyectables presentan mayor riesgo según la intensidad de la drogadicción, del intercambio de jeringas usadas y del número de compañeros con los que se comparten [117]. Las transfusiones de sangre, en el caso de estar contaminadas por HIV, tendrían una eficiencia de infección del receptor en más del 60%-95% de los casos [118]

La transmisión madre-hijo puede producirse durante la gestación, el parto (75%) o en el amamantamiento (10-15%). Actualmente, la transmisión vertical ocurre de manera infrecuente en los países desarrollados. Con el tratamiento antirretroviral, la cesárea y la evitación de la lactancia se han conseguido tasas de transmisión muy bajas [119].

Los niveles de carga viral pueden predecir el riesgo de transmisión y los niveles más altos se detectan durante la infección aguda y en estados avanzados de la enfermedad producida por el HIV-1. Aún más, co-infecciones con otros agentes de transmisión sexual pueden incrementar la carga viral de HIV-1 a niveles similares a los observados en las infecciones agudas.

1.2.2 Historia natural de la infección

Desde un punto de vista clínico-virológico pueden distinguirse las siguientes fases en la historia natural de la infección por HIV:

- Infección primaria, fase aguda o primoinfección y seroconversión: A partir del momento del contagio el virus se disemina rápidamente a través del organismo invadiendo múltiples órganos, principalmente los sistemas linfático y nervioso. A las 2-6 semanas de la inoculación la mayoría de los pacientes tienen una carga viral muy elevada en el plasma, encontrándose infectados una gran proporción de los linfocitos CD4+ (LT-CD4+). En más del 50% de los casos, en este momento aparecen los signos y síntomas con manifestaciones similares a las de la mononucleosis infecciosa [120]. Este cuadro desaparece espontáneamente en el plazo de 2 o 3 semanas, quedando posteriormente el paciente asintomático durante varios años [121]. Entre las 4 y las 12 semanas desde la inoculación se detectan anticuerpos anti-HIV específicos, siendo éstos de dudosa actividad neutralizante, y comienzan a aumentar los niveles linfocitos T CD8+ (LT-CD8+) [122]. Luego de aproximadamente 6 meses de la infección, los niveles plasmáticos de viremia, alcanzan un estado de equilibrio (“set point”). Los LT-CD8+ son críticos para alcanzar ese equilibrio y enlentecer la disminución continua del compartimiento de LT-CD4+ [123].
- Latencia clínica: La infección aguda es seguida por un período de infección asintomática donde los pacientes generalmente no presentan signos positivos en el examen físico, a excepción de linfadenopatías [124]. La carga viral en CMSP es relativamente baja en este momento y va aumentando a medida que la enfermedad

progresar con la disrupción de la arquitectura de los ganglios linfáticos. Durante esta etapa persiste una elevada actividad replicativa del virus, produciéndose diariamente 10^9 - 10^{10} partículas virales [125].

- Infección temprana sintomática: Esta etapa de la infección es conocida como “Clase B” según la clasificación de 1993 del CDC. Comprende manifestaciones clínicas que denotan progresión de la enfermedad, pero que por sí solas no clasifican al paciente como enfermo de sida.
- Sida: En esta etapa se produce un incremento de la actividad replicativa del virus. El sistema inmune es incapaz de reponer los LT-CD4+ destruidos. También hay un descenso importante de la actividad citotóxica anti-HIV [126]. Clínicamente, los pacientes presentan una grave alteración del estado general e infecciones oportunistas junto a un marcado descenso de los LT-CD4+ (<200 cel/ml).

1.2.3 Tratamiento antirretroviral

El tratamiento antirretroviral es la mejor opción para la supresión de la replicación viral y, subsecuentemente, para la reducción de la mortalidad y la morbilidad. Sin embargo, las drogas desarrolladas hasta el momento son incapaces de erradicar la infección por el HIV-1, con lo cual es necesario mantener el tratamiento de por vida.

En la mayoría de los pacientes se necesita la aplicación de tres o más drogas combinadas. Esta combinación de potentes agentes antirretrovirales permite la supresión de la replicación viral hasta niveles tan bajos que la aparición de variantes resistentes permanecen retrasadas. Como consecuencia de esto, el número de linfocitos T CD4+ se incrementa, llevando al sistema inmune a un grado tal que es capaz de revertir el estado aparente de inmunosupresión.

En paralelo con el incremento de la supervivencia de los individuos infectados por el HIV a consecuencia del uso del tratamiento antirretroviral de gran actividad (HAART), se ha producido un aumento de las muertes por causa hepática, tanto por cirrosis como por carcinoma hepatocelular, entre los individuos coinfectados con HBV y HCV [127]. Es así que la hepatopatía crónica por el HCV y las complicaciones asociadas a dicha infección suponen una importante causa de morbi-mortalidad en la población HIV seropositiva [86]. Algunos autores han constatado que, en el momento actual, la enfermedad hepática terminal constituye la primera causa de ingreso hospitalario y

muerte en estos pacientes [128, 129]. En consecuencia, para aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes infectados por el HIV, el estudio de la infección por el virus de la hepatitis C en dichos pacientes ha adquirido gran importancia.

1.3 Coinfección HIV-HCV

1.3.1. Características de la coinfección

El HCV puede transmitirse por vía sexual, vertical y percutánea tras exposición a sangre, siendo ésta la vía más eficaz. Como se explicó anteriormente, el HIV presenta similares vías de contagio y esto condiciona que exista una alta tasa de prevalencia de coinfección HIV-HCV, oscilando entre el 15 y el 40% de acuerdo a la zona geográfica y hasta el 90% en subgrupos de pacientes con antecedentes de adicción a drogas por vía parenteral o hemofílicos [130, 131].

El virus de la hepatitis C es aproximadamente 10 veces más infeccioso que el HIV tras la exposición percutánea accidental, observando la seroconversión en 15-30 casos de cada mil exposiciones [132]. La transmisión sexual (tanto homosexual como heterosexual) del HCV en las parejas estables es poco frecuente aunque parece que en los individuos HIV seropositivos es algo superior (3%) [133]. La transmisión vertical del HCV en las pacientes mono infectadas es del 2-5%, mientras que entre las pacientes HIV seropositivas este porcentaje se eleva al 10-12%. Para algunos autores este incremento se relacionaría con los niveles plasmáticos de carga viral del HCV y el consumo de drogas inyectables [13, 111].

La hepatitis crónica causada por el HCV es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los individuos infectados por HIV en los países desarrollados, especialmente en áreas donde la prevalencia de adicción a drogas por vía parenteral es elevada. Esta relevancia clínica de la hepatopatía crónica se debe a la drástica reducción en la incidencia de infecciones oportunistas merced a disponerse de la terapia antirretroviral [127, 134, 135], así como a la rápida evolución a cirrosis en los pacientes HIV-HCV coinfectados y al mayor riesgo de toxicidad hepática del HAART en pacientes con hepatitis crónica C.

Los niveles de ARN del HCV, tanto en plasma como en tejido hepático son significativamente mayores en pacientes HIV-HCV coinfectados que en pacientes HCV mono infectados [136]. Esto podría deberse al hecho que en pacientes infectados con el HIV, el HCV no sólo replica en hepatocitos, sino también en células linfocitarias [137]. La

capacidad de las células linfoides de servir como un reservorio extra-hepático para la replicación del HCV explican el hecho que las personas coinfectadas con el HIV tengan un aumento en los niveles de carga viral luego de la seroconversión, dado que el HCV promueve la activación de las células linfoides contribuyendo al escenario de hiperestimulación que favorece la replicación del HIV.

La coexistencia de la infección por HIV y HCV en un mismo individuo crea complejas interacciones, cambiando la historia natural de ambas infecciones, siendo así que entre un 15-20% de los pacientes mono infectados por el HCV presentan una tasa espontánea de limitación de la infección, mientras que algunos autores han reportado que esta aclaración es detectada en un 5-10% de los pacientes HIV-HCV coinfectados [138, 139]. Las infecciones oportunistas, la coinfección con otros virus hepatotropos, el uso de drogas hepatotrópicas (como la terapia antirretroviral) y el abuso del alcohol son factores que contribuyen a acelerar la disfunción hepática en los pacientes HIV positivos.

En los pacientes que reciben HAART, la hepatitis crónica progresa más lentamente que en aquéllos con alta replicación del HIV e inmunosupresión grave. De modo contrario, la activación inmune persistente que ocasiona la infección crónica por el HCV parece facilitar la transcripción del HIV en los linfocitos T, provocando una destrucción más rápida de los mismos.

Existen datos discordantes en cuanto al efecto del HCV en la evolución de la infección crónica por el HIV. Mientras que algunos autores han observado una menor tolerancia y eficacia del tratamiento antirretroviral, así como una mayor tasa de progresión a sida y muerte [140], otros autores observaron que el impacto del HCV sería mínimo e irrelevante en el curso clínico de la infección por el HIV [15].

El virus de la hepatitis C podría actuar como co-factor en la progresión de la enfermedad causada por el HIV a través de varios mecanismos. Primero, la estimulación inmune causada por la infección crónica del HCV podría aumentar la replicación del HIV. Segundo, la infección de células inmunes por el HCV puede favorecer la depleción de células T CD4+ y de esta forma empeorar la recuperación de aquellos pacientes bajo HAART. Tercero, el HCV podría comprometer los beneficios de las drogas antirretrovirales debido a una mayor incidencia a la toxicidad hepática, lo que causaría la discontinuación del tratamiento [141].

La coinfección por el HCV se ha relacionado con el aumento de la toxicidad hepática asociada al HAART y aunque se desconocen los mecanismos implicados exactos parecen estar involucrados factores virales propios [124], un descenso en el

metabolismo, fenómenos de reconstitución inmunológica [22] y un aumento de la disfunción mitocondrial [142].

El 15% de los pacientes coinfectados que inician HAART deben suspender el tratamiento por toxicidad hepática [143]. Este riesgo es mayor en pacientes que presentan el genotipo 3 del HCV, que se asocia con mayor esteatosis hepática. Aunque la mayor parte de la toxicidad hepática es asintomática, se han descrito casos de fallo hepático agudo [144].

1.3.2. Resistencia a la terapia con IFN en la coinfección

La combinación del peg-IFN+RBV es actualmente el tratamiento de referencia para aquellos pacientes coinfectados con HCV y HIV [47]. En un estudio clínico multinacional, *randomizado* (AIDS PEGASYS Ribavirin International Co-infection Trial: APRICOT) se demostró que la tasa de respuesta viral sostenida era significativamente mayor ($p < 0.001$) en pacientes coinfectados tratados con peg-IFN alfa-2a y ribavirina respecto de aquellos sólo tratados con peg-IFN como monoterapia (20%) o con interferón-alfa y ribavirina (12%). Esto condujo a la aprobación de la primera combinación en EE.UU. y Europa para su uso en la coinfección HIV-HCV [145]. Sin embargo, esta estrategia terapéutica no es efectiva en todos los pacientes considerando la compleja patogénesis de ambas infecciones y las potenciales interacciones entre las drogas.

El estudio clínico multinacional APRICOT mostró que el peg-IFN alfa-2a más ribavirina es eficaz para el tratamiento de la coinfección HIV-HCV, disminuyendo el riesgo de cirrosis y mejorando la calidad de vida de los pacientes [145]. Sin embargo, aunque el tratamiento con peg-IFN representa un avance significativo para los pacientes coinfectados, resulta más oneroso que aquel basado en IFN no pegilado.

Los datos disponibles muestran que la tasa de RVS en personas coinfectadas tratadas con peg-IFN+RBV es aún menor que en pacientes monoinfectados [146]. En razón de ello hay un enorme interés en determinar las bases moleculares de la falta de respuesta del HCV, lo cual puede proveer herramientas para mejorar las modalidades terapéuticas.

La heterogeneidad de cuasiespecies del HCV en pacientes coinfectados con HIV bajo HAART podría divergir según el éxito terapéutico, tendiendo a incrementarse en pacientes respondedores [147, 148]. Como consecuencia, aquellos factores predictivos relacionados a la heterogeneidad del HCV podrían estar directamente modificados.

En personas infectadas con HIV, el virus C aumenta la tasa infección en las células del sistema inmunológico [137, 146, 149], lo cual refuerza la posibilidad de interacciones directas entre los dos patógenos. Poco es lo que se conoce respecto del rol que desempeñan los factores pronósticos de respuesta terapéutica que son de utilidad ante la mono infección por HCV cuando HIV está también presente.

Considerando que la prevalencia de la coinfección es elevada entre usuarios de drogas inyectables, pudiendo exponerse a múltiples fuentes de contagio (y eventualmente de diferentes genotipos del HCV) mientras comparten agujas, se podría generar un escenario propicio que promueva cambios en la epidemiología molecular del HCV, lo cual conllevaría cambios en la respuesta a la terapia con IFN. La relación entre el genotipo del HCV y la progresión de la infección por HIV no es clara a pesar que estudios preliminares sugieren que dicho factor viral podría influenciar la historia natural de la coinfección [132].

Contribuyendo en la misma dirección, la infección por HIV a través de la inducción de antagonistas de los interferones perturba la respuesta inmune antiviral innata que de otro modo podría inhibir la replicación del HCV, haciendo que algunos blancos celulares resulten más susceptibles a la infección por HCV [146].

Definir el rol de parámetros virales seleccionados que permitan la identificación de respondedores y no-respondedores al peg-IFN+RBV previo al establecimiento del tratamiento será imperativo al momento de tomar decisiones individuales relativas al tratamiento.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Objetivo principal

Caracterizar a nivel genómico los factores virológicos del virus de la hepatitis C (HCV) asociados a resistencia al interferón en pacientes coinfectados con HIV.

2.1. Hipótesis principal

El HCV y el HIV comparten las mismas vías de transmisión, lo que lleva a una elevada tasa de coinfección.

Los distintos genotipos del HCV presentan diferentes tasas de respuesta al tratamiento basado en el interferón, siendo los genotipos 1 y 4 los que exhiben peor respuesta. Además, la coinfección con HIV baja aún más estas tasas de respuesta. A su vez, ha sido reportado que el genotipo más prevalente a nivel mundial es el 1 y que el genotipo 4 ha ido incrementando su distribución, observándose cada vez más reportes sobre la prevalencia de este genotipo en distintas regiones del mundo.

La presencia de un menor control inmunológico ante la infección con HIV, permite inferir que la replicación del HCV se encuentre favorecida. Además, factores virológicos asociados a la resistencia a la terapia con peg-IFN+RBV, tales como variantes virales que exhiban proteínas NS5A y E2 capaces de contrarrestar efectos antivirales IFN-mediados, podrían sustentar una peor respuesta al tratamiento en los pacientes coinfectados con HIV.

Caracterizar a nivel genómico las regiones reguladoras del HCV de los pacientes que responden y no responden al tratamiento antiviral y su evaluación como marcador pronóstico de respuesta podría contribuir a ajustar el tiempo de tratamiento, mejorando la calidad de vida de los pacientes con HCV coinfectados con HIV.

Este proyecto involucra además **objetivos particulares**, a saber:

- (i) Estudiar las relaciones filogenéticas entre pacientes infectados con los genotipos 1a y 4 del HCV.
- (ii) Analizar el impacto de las mutaciones en regiones genómicas asociadas a resistencia antiviral, (codificantes de las proteínas no-estructural 5A -NS5A- y, de la glicoproteína de envoltura 2 -E2-) como elemento pronóstico de respuesta sostenida a la terapia antiviral interferón-basada

- (iii) Estudiar la complejidad y evolución de las cuasiespecies virales del HCV antes, durante y después del tratamiento antiviral.

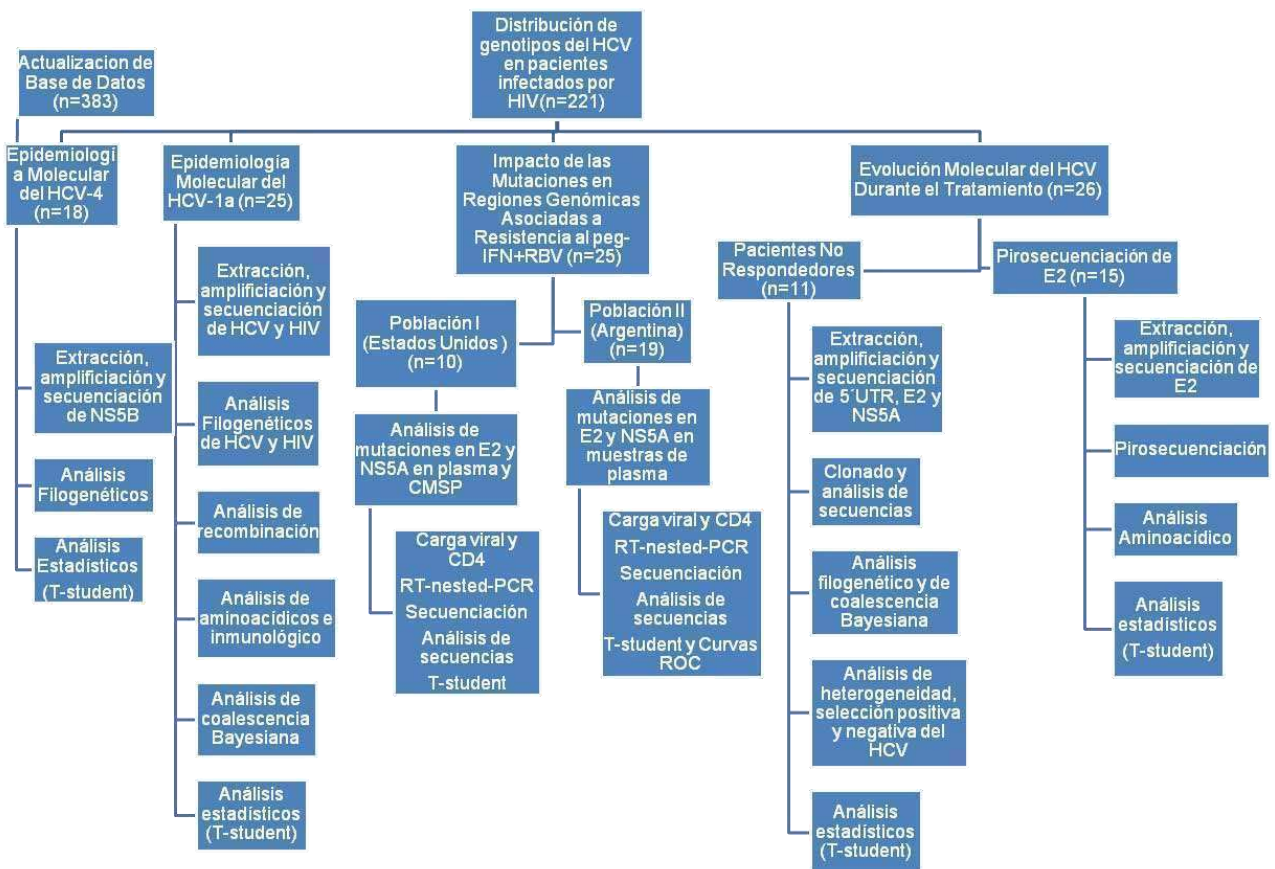
- (iv) Examinar la presencia de correlaciones entre factores virológicos del HCV (genotipo, carga viral, nivel de heterogeneidad de cuasiespecies), y *status* inmune (niveles de linfocitos T CD4+) del hospedador infectado con HIV-1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

Las muestras analizadas en esta tesis provienen de voluntarios que fueron específicamente convocados para los distintos estudios. El registro de muestras se realizó mediante la asignación de un código conformado por las iniciales del apellido y del nombre junto a la fecha de nacimiento. En todos los casos se obtuvo la firma del consentimiento de cada participante y se mantuvo la confidencialidad de toda la información recolectada, como así también de los resultados de laboratorio obtenidos de acuerdo a las recomendaciones internacionales y la legislación vigente (Ley 23.798 Nacional de Sida y su Decreto Reglamentario). En ningún caso se registró o almacenó información que contuviera los nombres o número de documento de los participantes y se siguieron estrictamente las pautas éticas internacionales recomendadas para estudios epidemiológicos [142].

En la Figura 3.1 se muestra un organigrama de los procedimientos involucrados en este trabajo incluyendo los objetivos particulares de estudio, el tamaño de la población estudiada y las metodologías aplicadas en cada caso.



3.1. Distribución de genotipos del HCV en pacientes infectados por HIV. Relación con los niveles de carga viral plasmática.

Los objetivos descriptos se cumplieron luego de confeccionar una base de datos de los pacientes HIV seropositivos que asisten al Centro Nacional de Referencia para el SIDA (CNRS), Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, a realizarse estudios por prescripción médica de pesquisa de viremia, genotipificación y/o carga viral plasmática del HCV. Todos los pacientes asistidos en esta institución se encuentran, a su vez, coinfectados con el HIV. Un total de 221 pacientes fueron analizados.

Desde dicha base de datos fue posible identificar diferentes grupos de pacientes que constituyeron las poblaciones bajo estudio para dar respuesta a los objetivos planteados. Así se formaron cuatro cohortes de pacientes, dos para cada análisis de epidemiología molecular, una para el análisis de mutaciones en regiones genómicas del HCV asociadas a la respuesta al IFN y una población para la evolución molecular del HCV durante el tratamiento (Figura 3.1).

Los cuatro estudios contaron con la aprobación del comité de ética de la Cátedra de Humanidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y con el consentimiento de los pacientes antes de su realización.

Para los análisis estadísticos se utilizó *Student t-test*. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS para Windows versión 13.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Un valor de p de 2 colas menor a 0.05 se consideró como estadísticamente significativo.

3.2. Epidemiología molecular del HCV genotipo 4

En una actualización de la base de datos de pacientes que asistieron al CNRS para realizar análisis de genotipo del HCV durante Abril del 2008 y Mayo del 2010 (un total de 383 pacientes), se observó un elevado número de pacientes HIV positivos coinfectados con el genotipo 4 del HCV. En la tabla 3.1 se muestra la distribución de genotipos, el promedio de carga viral del HCV, la proporción de hombres y mujeres y la edad promedio de los pacientes infectados con cada subtipo. A los 14 aislamientos caracterizados como genotipo 4 se agregaron 4 más previamente obtenidos, pero no caracterizadas a nivel molecular, de la base de datos explicada en el punto 3.1, dando así un total de 18 aislamientos para analizar.

Tabla 3.1: Distribución de genotipos y datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio.

Genotipo HCV	1	2	3	4	Mixto
N=383 (%)	281 (73.4)	8 (2.1)	67 (17.5)	14 (3.6)	13 (3.4)
promedio de CV-HCV (Log UI/ml)	5.85	5.21	5.3	5.49	5.39
Mujeres/Hombres	91/190	1/7	23/44	7/7	1/12
Edad Promedio (años)	42.7	65	43.4	45.5	41

Extracción del ARN

La extracción del ARN de todas las muestras de los pacientes con serología reactiva para el HCV, previamente caracterizadas como genotipo 4 por medio de métodos comerciales, se llevó a cabo a partir de 200 μ l de plasma, siguiendo las instrucciones del método comercial utilizado (TRIzol, Invitrogen, USA). El producto obtenido se resuspendió en 25 μ l de agua, libre de enzimas que degradan al ARN.

Ensayo de retrotranscripción (RT)

El ensayo se realizó en dos etapas. En la primera, se incubó al ARN (8 μ l del producto de extracción) con los *primers* específicos (0,4 pmol/ μ l) para la región genómica a amplificar (NS5B), y los dNTPs (10mM), a una temperatura de 65°C durante 5 minutos. Esta etapa se llevó a cabo con el fin de linealizar al ARN (desnaturalizar la estructura secundaria) para que la hibridación de los *primers* y los dNTPs sea más eficiente. En la segunda etapa, se mezcló el producto obtenido con 200 unidades de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (M-MLV RT) (Invitrogen, USA) por reacción y 40 unidades de un inhibidor de RNAsas (RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen, USA) por reacción, más 4 μ l del *buffer* estándar 5X. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo durante 60 minutos a 37°C tras los cuales se inactivó a 94°C durante 15 minutos para desnaturalizar la transcriptasa reversa que podría inhibir la posterior amplificación mediada por la Taq polimerasa.

Reacciones de PCR

A partir de 5 μ l del ADNc obtenido se produjo la amplificación de la región NS5B de la siguiente manera: 1 U de *Taq* DNA Polimerasa Recombinante (Invitrogen, USA), 5 μ l de buffer 10X sin Mg, 1,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de dNTPs, 0,4 pmol/ μ l de cada *primer* más el volumen adecuado de agua tridestilada estéril para alcanzar un volumen final de reacción de 50 μ l.

Los tiempos de ciclado fueron los siguientes:

(1 ciclo) 94^o 90s

(5 ciclos) 94^o 30s → 64^o 45s → 72^o 1m

(30 ciclos) 94^o 30s → 64^o caída de 0.5^o cada ciclo 45s → 72^o 1m

(5 ciclos) 94^o 30s → 48^o 45s → 72^o 1m

(1 ciclo) 72^o 10m

Los *primers* utilizados fueron previamente descritos [150].

Forward: 5' TAT GAY ACC CGC TGY TTT GAC TC 3'

Reverse: 5' GCN GAR TAY CTV GTC ATA GCC TC 3'

Segunda amplificación (nested- PCR)

A partir del producto de primera amplificación por PCR, se realizó una segunda ronda de amplificación (PCR anidada o *nested* PCR), para optimizar tanto la sensibilidad de detección como la especificidad de la región genómica de interés. Posteriormente, los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio.

Las mismas condiciones para la reacción de PCR se utilizaron para realizar la *nested*-PCR, con la única excepción de los *primers*:

Forward: 5' TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTG A 3'

Reverse: 5' GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA 3'

El tamaño del producto de amplificado es de 401pb.

Secuenciación nucleotídica

Se realizó una secuenciación directa y automática, en ambos sentidos (Applied Biosystems 3100 DNA Sequencer) de la región NS5B utilizándose 1 µl de BDT, 1,5 µl de Buffer 5x, 1 µl de ADN y una concentración 4 µM de cada primer, llegando a un volumen final de 10 µl por muestra.

La edición de las secuencias se llevó a cabo mediante el uso del programa Sequencer v.4.10.1 (Gene Codes). Las secuencias de referencias de cada región y de los diferentes genotipos se obtuvieron de GenBank [151]. Los múltiples alineamientos de las secuencias se realizaron mediante el programa Mafft [152, 153].

Análisis Filogenético

Se obtuvieron secuencias de referencia de distintas bases de datos del HCV de los diferentes genotipos y subtipos del HCV, principalmente de los subtipos del genotipo 4 [38, 154]. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Mafft [152, 153].

Dos *sets* de datos se utilizaron para realizar los análisis filogenéticos. El primero incluyendo 407 secuencias, se analizó por técnicas de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud. El segundo *set* incluía 117 secuencias y fue analizado mediante inferencia Bayesiana. El número de secuencias es menor en el segundo *set* debido a que fue el mayor número de secuencias que se pudo analizar mediante inferencias Bayesianas.

Para los métodos probabilísticos (Máxima Verosimilitud y Análisis Bayesianos) se infirió el modelo de sustitución y de evolución molecular estimado de acuerdo al criterio de Akaike, mediante la utilización del programa JModelTest [155]. Este análisis indicó que el Tiempo General Reversible más una proporción cadenas invariantes y un determinado valor en la heterogeneidad de la velocidad de cambios de nucleotídicos o valor Gamma (GTR+I+G) era el modelo de evolución molecular que permite el ajuste óptimo para el estudio de las secuencias de los diferentes grupos de datos.

Máxima Verosimilitud

Los árboles por Máxima Verosimilitud se infirieron con el programa PhyML versión 3.0 [156] partiendo de un árbol inicial generado por neighbor joining (NJ) y reordenado, luego, por medio del intercambio de ramas con el vecino más cercano (NNI) y del podado

y rearreglo de sub-árboles (SPR), con el fin de hallar el árbol óptimo dentro del espacio de búsqueda.

Análisis Bayesiano

El análisis Bayesiano se realizó con el programa MrBayes [157]. Este análisis se corrió dos veces en forma independiente utilizando Cadenas de Markov de Monte Carlo acoplada a Metropolis (MCMCMC) que mejora la capacidad de búsqueda de los árboles de las cadenas de Markov [157]. Se realizaron 10^6 generaciones de las Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) y se tomaron muestras con una frecuencia de 100 generaciones. Se utilizaron 8 cadenas de Markov *calientes*, con aumento de su temperatura según la calibración por defecto del programa. Diez intentos de cambio de estado entre las cadenas *frías* y *calientes* se realizaron cada 10 generaciones. Luego de descartar los árboles del *burn-in* (1000), se combinó el muestreo de árboles y se generó, mediante la regla de mayoría del 50%, el árbol consenso. La probabilidad posterior de los clados se estimó como la proporción de muestras que presentan algún clado en particular.

Máxima Parsimonia

Para los análisis de Máxima Parsimonia se utilizó el programa TNT [158, 159]. Se empleó una combinación de nuevas técnicas de búsqueda de árboles como *Tree Fusing*, *Ratchet*, *Tree Drift* y *Sectorial Seach* (T-R-Df-SS, respectivamente), aplicadas de manera sucesiva a los mejores árboles obtenidos previamente a partir de 100 secuencias de adición al azar (RAS) seguido de una bisección y reconexión de ramas de los árboles (TBR). La combinación de T-R-Df y SS se realizó 3 veces para cada evento de RAS+TBR. Este esquema se repitió 10 veces y los árboles resultantes se fusionaron para verificar que ninguna mejora en el largo de las ramas sea posible, al menos bajo estas condiciones experimentales.

Se realizó un consenso de mayoría de los árboles más parsimoniosos para mostrar como figura representativa.

Remuestreo (*Bootstrap*) y edición de árboles

La consistencia filogenética de los nodos individuales en la topología del árbol más frecuente se estimó mediante test de remuestreo (*bootstrap*) no paramétrico de 1000 réplicas.

La edición de la topología y de los nodos terminales se realizó mediante el programa Dendroscope V2.7.4 [160].

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron según se mencionó en el punto 3.1.

3.3. Epidemiología molecular del HCV genotipo 1a

Con el objetivo de realizar una vigilancia epidemiológica del HCV-1a en pacientes coinfectados con HIV mediante el análisis de la diversidad molecular de las cepas argentinas del HCV-1a y su relación filogenética con secuencias del HCV-1a de aislamientos identificados en todo el mundo, se estudió una población conformada por 25 pacientes argentinos, previamente diagnosticados, infectados con el HCV-1a y coinfectados con HIV, obtenidos de la base de datos mencionada en el punto 3.1.

Las muestras de plasma de dichos pacientes fueron tomadas antes del inicio del tratamiento con peg-IFN+RBV con el fin de evitar la generación de relaciones filogenéticas forzadas ante la instauración del tratamiento por la eventual aparición de mutantes de escape al tratamiento. De los 25 pacientes, 5 resultaron ser respondedores y 20 no respondieron al tratamiento.

Detección de viremia del HCV en pacientes infectados por HIV

La presencia de ARN se determinó para todas las muestras bajo seguimiento. Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos cualitativos: (a) un método comercial de RT-PCR AMPLICOR HCV, (Roche, versión 2.0, USA), con bajos niveles de detección (50 UI/ml), llevado a cabo según las instrucciones del fabricante; y (b) un método desarrollado en nuestro laboratorio consistente en una RT-*nested* PCR de la región 5'UTR.

Extracción de ARN, transcripción reversa, amplificación y secuenciación

Se analizaron 3 regiones genómicas del HCV, la correspondiente a la 5' no codificante (5'UTR) y las regiones codificantes de la glicoproteína de envoltura 2 (E2) y la proteína no estructural 5A (NS5A). A su vez, se realizó la amplificación de la región codificante de la proteína *pol* de HIV, en aquellos pacientes con viremia detectable para dicho virus, con el fin de determinar el subtipo y en el caso que fueran genomas recombinantes, definir el mosaico génico de las cepas de HIV con las que se hallaban coinfectados los pacientes.

La región 5'UTR se amplificó únicamente para la pesquisa cualitativa del material genómico, sin realizarse posteriores análisis filogenéticos basados en esta región.

La extracción del ARN y la retro-transcripción de cada fragmento amplificado se realizaron según los protocolos previamente explicados.

Para la región *pol* de HIV se utilizó un *primer* específico:

Primer reverse: 5'-GCT CCT ACT ATG GGT TCT TTC TCT AAC TGG-3'

Reacciones de PCR

Para cada región analizada se llevaron a cabo reacciones diferentes.

5'UTR

La amplificación de las muestras se logró con el uso de 1,25 U de T-PLUS DNA polimerasa (Inbio-Highway, Tandil, Argentina), 250 ng/μl de cada uno de los *primers*, 1mM de MgCl₂, 10mM de dNTPs, *buffer* 10X, 5 μl de ADN copia obtenido con la retro-transcripción y agua hasta completar un volumen final de 50 μl por tubo de reacción.

Las condiciones del ciclado fueron:

(1 ciclo) 94° C 5 min

(40 ciclos) 94° C 45 seg → 55° C 45 seg → 72° C 45 seg

(1 ciclo) 72° C 10 min

Los *primers* fueron previamente publicados [40]:

Forward: 5' CGT TGA GGA ACT ACT GTC TT 3'

Reverse: 5' ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA GAC CT 3'

NS5A

La reacción de amplificación se realizó empleando 1U de *Taq* DNA Polimerasa Recombinante (Invitrogen, USA), 5 µl de buffer 10X sin Mg, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 0,4 pmol/µl de cada *primer*, 5 µl de ADNc, y un volumen de agua tridestilada estéril que complete los 50 µl finales de reacción por muestra.

La amplificación se realizó siguiendo el ciclado detallado:

(1 ciclo) 94° C 5 min

(35 ciclos) 94° C 45 seg → 60° C 45 seg → 72° C 2 min

(1 ciclo) 72° C 10 min

Los *primers* utilizados fueron previamente publicados [161]:

Forward: 5´ CTC ACY GTR ACC CAG CTC CTG AG 3´

Reverse: 5´ GTC CAG AAC YTG CAG TCT GTC AA 3´

E2

Las concentraciones utilizadas en este ensayo fueron, 1 U de *Taq* DNA Polimerasa Recombinante (Invitrogen, USA), 5 µl de buffer 10X sin Mg, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 0,4 pmol/µl de cada *primer*, 5 µl de ADNc y un volumen de agua tridestilada estéril que complete los 50 µl finales de reacción por muestra.

El ciclado del ensayo consiste en:

(1 ciclo) 94° C 2 min

(35 ciclos) 94° C 30 seg → 60° C 50 seg → 72° C 2 min

(1 ciclo) 72° C 5 min

Los *primers* de este ensayo fueron diseñados en nuestro laboratorio:

Forward: 5´ TCC AGC TKA TMA ACA CCA ACG GCA 3´

Reverse: 5´ AGY ARC ATC ATC CAC AAG CAG G 3´

HIV-pol

La región se amplificó siguiendo el siguiente protocolo. Los reactivos y concentraciones utilizadas son los siguientes: 5 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA), 0,4 pmol/µl de cada uno de los *primers*, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, buffer 10X, 20 µl del producto de RT y agua hasta completar un volumen de 50 µl por tubo de reacción.

El ciclado utilizado fue el detallado a continuación:

(1 ciclo) 95°C 3 min

(5 ciclos) 95° C 15 seg, → 56° C 15 seg → 72° C 1.40 min

(30 ciclos) 90° C 15 seg, → 56° C 15 seg → 72° C 1.40 min

(1 ciclo) 72° C 10 min

Los *primers* utilizados se detallan a continuación:

Forward: 5´-GAA GGG CAC ACA GCC AGA AAT TGC AGG G-3´

Reverse: 5´-GCT CCT ACT ATG GGT TCT TTC TCT AAC TGG-3´

Segunda amplificación (nested- PCR)

A partir del producto de primera amplificación por PCR, se realizaron, para cada región, segundas rondas de amplificación (PCR anidada o *nested* PCR), para optimizar tanto la sensibilidad de detección como la especificidad de la región genómica de interés. Posteriormente, los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio.

5´UTR

Al igual que en la reacción de PCR, se utilizaron 1,25 U de Taq-PLUS DNA polimerasa (Inbio-Highway, Tandil, Argentina), 250 ng/µl de cada uno de los *primers*, 1 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, *buffer* 10X, 5 µl de ADN obtenido por PCR y agua hasta completar un volumen de 50 µl por tubo de reacción.

El ciclado utilizado para este ensayo fue el siguiente:

(1 ciclo) 94°C 5 min

(35 ciclos) 94° C 45 seg, → 53° C 45 seg → 72° C 45 seg

(1 ciclo) 72° C 10 min

Primers utilizados:

Forward: 5´ TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG 3´

Reverse: 5´ CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT 3´

El producto esperado para este ensayo, visualizado en gel de agarosa teñido bromuro de etidio, tiene un tamaño de 250pb.

NS5A

La región se amplificó siguiendo el siguiente protocolo. Los reactivos y concentraciones utilizadas son los siguientes: 1 U de Taq-PLUS DNA polimerasa (Invitrogen, USA), 0,4 pmol/μl de cada uno de los *primers*, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, buffer 10X, 5 μl del producto de PCR y agua hasta completar un volumen de 50 μl por tubo de reacción.

El ciclado utilizado fue el detallado a continuación:

(1 ciclo) 94° C 5 min

(35 ciclos) 94° C 25 seg → 65° C 25 seg → 72° C 1,30 min

(1 ciclo) 72° C 10 min

Los *primers* utilizados fueron:

Forward: 5´ TAA GGG ACA TCT GGG ACT GGA 3´

Reverse: 5´ CCT GGT GAT GTT GCC GCC CAT C 3´

El producto esperado para es 450pb

E2

Los amplicones se obtienen con el mismo ensayo realizado para la PCR, tanto para las concentraciones como para el ciclado.

Los *primers* para la amplificación son, también, de diseño propio:

Forward: 5´ ACA CCA ACG GCA GYT GGA CAT CAA 3´

Reverse: 5´ GCA GGM RCA GAC CGC GCG CGT C 3´

El producto obtenido en este ensayo es de 380pb.

HIV-pol

La amplificación se realizó en las mismas condiciones que la PCR, utilizando 3 sets de *primers* internos solapados con el objetivo de facilitar su posterior secuenciación.

Primers forward: 5´-CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC-3´

Primers reverse: 5´-CAT TGT TTA ACT TTT GGG CC-3´

Tamaño esperado: 478pb

Primers forward: 5´-ATT GGT TGC ACT TTA AAT TTT CCC ATT AGC CCT ATT-3´

Primers reverse: 5´-CGA CCT GAC AGT TAC TGT ATG TCT TCA ATC ACC-3´

Tamaño esperado: 867pb

Primers forward: 5´-AAC ATC AGA AAG AAC CTC CAT T-3´

Primers reverse: 5´-CAA ACT CCC ACT CAG GAA TCC A-3´

Tamaño esperado: 590pb

Tamaño total del amplicón analizado: 1656pb

Todos los *primers* fueron previamente descriptos por Dilernia y colaboradores en el año 2011 [162].

Secuenciación y análisis filogenéticos del HCV y HIV

La secuenciación y edición de las secuencias se realizaron de igual manera a la expuesta en el punto anterior, usándose el programa Sequencher v.4.10.1 (GeneCodes) para la edición de las secuencias. Las referencias de los distintos genotipos y subtipos tanto para HCV como para HIV se obtuvieron de GenBank [151, 163] y los alineamientos se realizaron mediante el programa Mafft [152, 153].

Se utilizaron 3 sets de datos con secuencias del HCV para realizar los análisis filogenéticos. En todos los sets se incluyeron 260 secuencias de referencias de las diferentes regiones analizadas del HCV (E2, NS5A y E2-NS5A concatenadas) más las 25 secuencias de cada región amplificadas de los pacientes argentinos coinfectados con HIV.

Para el análisis filogenético de HIV otros 3 sets de datos se analizaron, uno correspondiente al amplicón total de la región *pol* de HIV y los otros dos correspondientes a las fracciones puras (sin recombinación) B y F. Distintas secuencias de referencia fueron incluidas en los alineamientos. Las fracciones separadas B y F no incluyeron secuencias de referencias del subtipo recombinante BF con el fin de determinar y confirmar la distribución de cada fracción.

La búsqueda de los modelos de evolución molecular y los árboles por Máxima Verisimilitud se hicieron según lo previamente explicado.

Análisis de recombinación

Se realizó la búsqueda de secuencias recombinantes del HCV en las regiones E2-NS5A concatenadas de los 25 aislamientos del HCV-1a de Argentina mediante el programa SimPlot [164]. Este software se basa en un método de ventana deslizante y

constituye una forma de mostrar gráficamente la conexión en la relación de secuencias en toda la longitud de un conjunto de secuencias homólogas alineadas. El ancho de la ventana y el tamaño del paso se establecieron en 100 y 20bp, respectivamente. Los resultados obtenidos en el análisis de recombinación fueron confirmados por análisis de *bootscanning* [165]. En este caso, una ventana deslizante de 100 nucleótidos fue utilizada, pasando de a 20 nucleótidos a la vez.

Los análisis recombinantes para la región *pol* de HIV se llevaron a cabo usando un acercamiento probabilístico *on-line* basado en el modelo de Markov (jpHMM). Se utilizaron los parámetros por *default* [166-168].

Análisis de aminoácidos

El programa VESPA [169] se utilizó para caracterizar los diferentes patrones aminoacídicos (aminoácidos atípicos) en un set de secuencias incógnita en relación con un set de secuencias de referencia. El programa calcula la frecuencia de cada aminoácido en cada posición del alineamiento incógnita y de referencia y selecciona las posiciones en donde el carácter más común en el set incógnita difiere del set de referencia. La secuencia del HCV, H77 (GenBank AF009606) fue utilizada como referencia y las posiciones aminoacídicas se numeraron de acuerdo a la posición de esta secuencia en la estructura poliproteica.

Análisis comparativo *in silico* de la unión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) a los péptidos del HCV.

Asumiendo las diferentes composiciones aminoacídicas de los péptidos derivados de las regiones genómicas E2 y NS5A de las cepas del HCV-1a de Argentina, se determinó en forma teórica la capacidad de unión de los péptidos al CMH-I usando el programa *on-line* NetMHC (www.cbs.dtu.dk). Este programa presenta la mayor cobertura de alelos a estudiar [170]. Esta herramienta predice la unión de los péptidos a diferentes alelos HLA usando redes neuronales diferenciales (ANNs) y matrices de peso [171]. Se enfrentaron ANNs de 57 alelos HLA, representando los 12 subtipos de los HLA A y B [172]. Las secuencias de epitopes HCV-1a de linfocitos T citotóxicos (CTL) se definieron de acuerdo a los incluidos en la base de datos inmunológicos del HCV [173] disponible *on-line* de Los Alamos (www.hcv.lanl.gov) y en la base de datos de epitopes

inmunológicos (<http://www.immuneepitope.com>) [174] y se eligieron aquellos en donde las posiciones aminoacídicas diferían entre los grupos de las secuencias del HCV-1a de pacientes argentinos.

Análisis de Coalescencia Bayesiana

Las tasas de sustitución por sitio por año y los tiempos de divergencia se estimaron utilizando el algoritmo Bayesiano MCMC que permite la estimación de la distribución posterior de los parámetros y que se implementa en el programa BEAST v1.5.4 [175].

La distribución posterior de los árboles se estimó utilizando el modelo de evolución molecular (calculado según lo explicado previamente) Tamura-Nei con distribución gamma (TrN+G).

Se compararon tres modelos de relojes moleculares para construir el árbol bajo el modelo evolutivo más apropiado: un modelo de reloj estricto y dos modelos de reloj relajado, asumiendo una distribución anterior tanto con correlación exponencial como con distribución logarítmica normal de las tasas de sustitución entre los linajes [176]. La implementación del Factor de Bayes indicó que el mejor modelo evolutivo para los sets de datos analizados era el reloj molecular relajado asumiendo una distribución lognormal y un crecimiento constante de la población. El análisis se corrió dos veces con 10^6 generaciones, guardando árboles cada 1000 pasos y descartando un 10% como *burn-in*. La convergencia de MCMC y el tamaño de la población efectiva (ESS) se examinaron usando el programa TRACER v1.5 [175]. Se consideró que los análisis han llegado a la convergencia y que se alcanzó la estabilidad luego de haber pasado el período de *burn-in*, cuando ESS es superior a 200. La incertidumbre de los parámetros estimados se evaluó en el intervalo de densidad posterior mayor al 95% (HPD95%).

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron según lo ya explicado.

3.4. Impacto de las mutaciones en regiones genómicas asociadas a resistencia antiviral como elemento pronóstico de respuesta sostenida a la terapia antiviral interferón-basada

Para cumplir con este objetivo se analizaron dos poblaciones de pacientes HCV positivos coinfectados con HIV. El primer grupo de pacientes surge de una colaboración con el Centro de Ciencias para la Salud, en la Universidad de Texas, Houston, Estados Unidos; mientras que la segunda es producto de una colaboración con el Hospital Juan A. Fernández de la ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Población bajo estudio (I)

Se analizó un grupo de 10 pacientes HIV-HCV coinfectados bajo seguimiento en el Centro de Ciencias para la Salud, en la Universidad de Texas, Houston, EE.UU.

Todos los pacientes recibieron peg-IFN alfa-2a, 180mg/semana más RBV, 1000-1200 mg/día ajustado al peso corporal, durante 48 semanas como tratamiento recomendado, excepto que los pacientes presentaran efectos adversos o no respondan luego de 12 semanas. Se consideró como respuesta virológica sostenida (RVS) la ausencia de ARN del HCV en plasma luego de 6 meses luego de finalizado el tratamiento. Aquellos pacientes en donde la carga viral plasmática del HCV no variaba a lo largo del tratamiento o que recaían durante el período de seguimiento fueron considerados como no respondedores (NR).

Se analizaron muestras de plasma y CMSP a tiempos basales, antes del inicio del tratamiento.

Extracción del ARN, amplificación y secuenciación

La extracción del ARN se llevó a cabo en todas las muestras de los pacientes con serología reactiva para el HCV, a partir de 200 µl de plasma o 10⁶ células y siguiendo las instrucciones del método comercial utilizado (TRIzol, Invitrogen, USA). El producto obtenido se resuspendió en 25µl de agua, libre de enzimas que degradan al ARN.

Las amplificaciones de las regiones genómicas 5'UTR, E2 y NS5A se describieron en la sección 3.3, mientras que, tanto la amplificación para la región NS5B como la técnica de secuenciación han sido descritas en la sección 3.2.

Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP)

Este ensayo se realizó para todas las muestras que pudieron ser amplificadas por RT-*nested* PCR en la región genómica 5' UTR, tanto para los aislamientos obtenidos de plasma como aquellos de CMSP.

El ensayo consiste en digerir, mediante el uso de enzimas de restricción, la fracción amplificada de la región 5'UTR, para poder identificar y diferenciar los diferentes genotipos y subtipos del HCV. Para ellos se usaron 15 µl del producto de amplificación obtenido por RT-*nested* PCR de la región 5'UTR, cortados con 10 U de las siguientes combinaciones de enzimas de restricción: *HaeIII/RsaI*, *ScrFI/HinfI* y *BstNI/HinfI*. La restricción se realizó a 37° C durante 2 horas, seguidas de una segunda etapa a 60° C durante 2 horas más (necesarias para el corte con las enzimas *BstNI/HinfI*). Esta primera digestión permite establecer el genotipo del HCV. Para determinar el subtipo, se prosiguió a digerir una nueva alícuota del amplicón con las enzimas *BstUI* (para la determinación de los subtipos del genotipo 1) o *ScrFI* (para subtipificar a los genotipos 2 y 3). La reacción con *BstUI* se mantiene a 60°C durante 2 horas, mientras que la de *ScrFI* se hace a 37°C por 2 horas.

Todos los productos de digestión se visualizan en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio.

Determinación de la carga viral plasmática y recuento de linfocitos T CD4+

Carga viral: Tanto para HIV como para HCV se utilizó un método comercial, basado en hibridaciones sucesivas de ADN (o *branched* DNA “bDNA”) VERSANT® HCV RNA 3.0 (Siemens) que posee un rango de 615 hasta 7.700.000 UI/ml de ARN plasmático del HCV.

Recuento de linfocitos T CD4+: Se determinó por citometría de flujo (Coulter, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) a partir de sangre entera anticoagulada con EDTA.

Secuenciación nucleotídica

La secuenciación de las regiones genómicas, la edición y el alineamiento de las mismas fueron previamente descritos en las secciones 3.2 y 3.3.

Análisis de mutaciones e inferencias filogenéticas

El análisis de mutaciones se llevó a cabo mediante la inspección visual en cada secuencia comparando los cambios aminoacídicos con respecto a la secuencia de referencia HCV-J con número de acceso a GenBank D90208 (subtipo 1b).

Las inferencias filogenéticas se llevaron a cabo mediante un método de distancia (Neighbor-joining), utilizando los parámetros por *default* incluido dentro del programa MEGA 4.0 [177].

Análisis estadístico

Se utilizó *Student t-test* para comparar las variables. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS para Windows versión 13.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Un valor de p de 2 colas menor a 0.05 se consideró como estadísticamente significativo.

Población bajo estudio (II)

Debido a que el subtipo 1a del HCV es el más abundante en la población HIV positiva en Argentina [178] y el hallado en mayor proporción en la base de datos realizada en el punto 3.1, se estudió una segunda población de 19 pacientes argentinos, HCV positivos genotipo 1a coinfectados con HIV. Todos los individuos estudiados, se encuentran en seguimiento en el Hospital Juan A. Fernández de la ciudad de Buenos Aires y procedían de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y sus alrededores.

Se analizaron muestra de plasma antes del inicio del tratamiento con peg-IFN alfa-2b (Peg-Intron-A, Schering Corp, Kenilworth, NJ, USA) subcutáneos (80mcg-150mcg, dosis ajustada al peso corporal) cada semana más RBV oral (Rebetol, Schering Corp, Kenilworth, NJ, USA) diariamente.

Extracción, amplificación, secuenciación y análisis de mutaciones

Las extracciones de ARN a partir de las muestras de plasma de los 19 pacientes, la amplificación de las regiones E2 y NS5A, la secuenciación de los productos amplificados y el análisis de las mutaciones aminoacídicas se llevó a cabo de igual manera que las expuestas para la población anterior, pero utilizando como referencia la secuencia

prototipo del subtipo 1a correspondiente a la cepa HCV-1 con número de acceso al GenBank M62321.

Análisis estadístico

Se utilizaron curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para evaluar el punto de mayor sensibilidad y especificidad, con el más adecuado valor predictivo y negativo del número de mutaciones en NS5A y E2 y la respuesta viral sostenida. Las curvas ROC se construyeron siguiendo el método empírico, que consiste en representar todos los pares de bases de especificidad y sensibilidad para todos los posibles valores de corte. Se definió para el cálculo una tasa teórica de respuesta viral sostenida de 40%.

3.5. Evolución molecular del HCV y análisis de la compartimentalización durante el tratamiento con peg-IFN+RBV

A partir de la base de datos detallada en la sección 3.1 se reclutaron y se estudiaron los pacientes HCV positivos coinfectados con HIV para cumplir con este objetivo. Los pacientes fueron tratados de manera subcutánea con peg-IFN alfa-2b (Peg-Intron-A, Schering Corp, Kenilworth, NJ, USA) (80mcg-150mcg) cada semana más RBV de manera oral todos los días, o con peg-IFN alfa-2a (Pegasys, Roche Corp, Hertfordshire, UK) (180mcg) cada semana más RBV oral todos los días (Copegus, Roche Corp, Hertfordshire, UK). El tratamiento variaba según la disponibilidad de drogas en el Ministerio de Salud de la Nación. Las dosis de RBV se ajustaron al peso corporal en todos los casos. Cuando la caída de la carga viral (ARN plasmático) era de al menos 2 logaritmos en la semana 12, los pacientes continuaban el tratamiento y eran re-evaluados a la semana 24. Muestras de sangre se colectaron antes de empezar la terapia con peg-IFN+RBV, a las 24hs y semanas 4, 12 y/o 24 durante el tratamiento, de acuerdo a la continuidad del mismo según criterio médico. De las muestras de sangre se separaron, por medio de un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) las CMSP. Las células fueron lavadas 3 veces con solución fisiológica con el fin de desprender las partículas lábilmente adsorbidas a la superficie. La carga viral plasmática (Siemens VERSANT® HCV RNA 3.0 Assay) y la PCR cualitativa del HCV (Cobas Amplicor HCV 2.0) se evaluaron en cada tiempo de muestreo.

Extracción de ARN, amplificación y secuenciación

La extracción, amplificación del material genómico y secuenciación de las regiones 5'UTR, E2 y NS5A, tanto de plasma como de CMSP se realizó de igual manera a lo detallado con anterioridad.

Clonado

Para llevar a cabo el análisis de cuasiespecies virales del HCV a lo largo del tratamiento antiviral de pacientes no respondedores, se procedió a clonar los productos de *nested*-PCR de NS5A en los distintos tiempos. Se clonó únicamente esta región debido a que es la de mayor variabilidad. El clonado se realizó en el plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega) con posterior transformación de bacterias *E. coli* DH5 α . A partir de las colonias obtenidas luego de la transformación y, mediante la realización de la PCR de colonias (*Colony* PCR), se obtuvieron los amplicones de interés utilizando el mismo ciclo térmico que para la amplificación directa de NS5A.

Posteriormente se secuenciaron y analizaron entre 15-24 clones de cada muestra como se indicó anteriormente. Dicho número de clones fue considerado adecuado de manera de poder inferir la composición de cuasiespecies [179].

Análisis de secuencias

El análisis del número de mutaciones se realizó de manera visual, comparando las secuencias obtenidas de cada región con la correspondiente a la de referencia del subtipo 1a, M62321.

Con el fin de comparar la evolución del HCV entre pacientes no respondedores coinfectados con HIV frente a aquellos no respondedores mono infectados con HCV, se analizaron secuencias del HCV del estudio multicéntrico Virahep-C en el cual se estudia la respuesta de 400 pacientes HCV mono infectados y se analiza el genoma completo del HCV antes y después del tratamiento con peg-IFN+RBV [180]. Las regiones correspondientes al IRES, PePHD y PRKBD se compararon antes y después del tratamiento de 12 pacientes mono infectados y los 11 pacientes coinfectados con HIV.

Con el objetivo de analizar la evolución de NS5A durante cada tiempo del tratamiento anti HCV, se obtuvieron secuencias de 12 pacientes HCV mono infectados no respondedores a la terapia del estudio multicéntrico HALT-C [181]. En este estudio se

analiza la evolución de la región NS5A de pacientes HCV mono infectados en los tiempos previos al tratamiento y a semanas 4, 12 y 24 luego de iniciado el mismo.

Análisis filogenético y de coalescencia Bayesiana

Se estudiaron las relaciones filogenéticas entre los aislamientos del HCV-1a de pacientes HCV mono infectados y HIV coinfectados mediante el método probabilístico de Máxima Verosimilitud para las regiones E2 y NS5A como previamente se explicó. El modelo de evolución molecular utilizado para ambas regiones fue en GTR+I+G.

El análisis de coalescencia bayesiana se utilizó para determinar la tasa de sustitución de las tres regiones en estudio a lo largo del tratamiento de los pacientes HIV coinfectados y se compararon con las determinadas para NS5A de los pacientes HCV mono infectados del estudio HALT-C. El modelo de evolución utilizado fue el TrN+G. Se siguió el protocolo detallado con anterioridad.

Análisis de la heterogeneidad del HCV

El análisis de la diversidad a nivel nucleotídico se evaluó a nivel inter e intra paciente:

Análisis inter-paciente: Se realizó un análisis comparativo de la heterogeneidad en la región NS5A de aislamientos de pacientes HCV mono infectados de ambos estudios multicéntricos (ViraHep y HALT-C) y HIV coinfectados de nuestra población de estudio. Se evaluó la distancia genética media (d) basada en las secuencias directas de NS5A, de manera de inferir la diversidad entre ambos grupos de pacientes en el tiempo pre tratamiento. La distancia genética media fue calculada a nivel nucleotídico utilizando el modelo Tamura-Nei [177] y un valor Gamma para la distribución de las tasas de sustitución en cada sitio implementando el programa MEGA 4.0 [177].

Análisis intra-paciente: Se evaluó la heterogeneidad de cuasiespecies de la región NS5A del HCV de pacientes HIV coinfectados antes y durante el tratamiento con peg-IFN+RBV. El análisis de heterogeneidad viral incluyó el estudio de la complejidad viral y la distancia genética en todos los tiempos de muestreo. La distancia genética intra-paciente del HCV se estimó utilizando el modelo Tamura-Nei y la distribución Gamma para la

heterogeneidad en la velocidad de cambios en cada sitio, como se indicó para en análisis inter-paciente.

La “complejidad” se midió mediante el cálculo de la *Entropía de Shannon* (S_n) a nivel nucleotídico. Este parámetro indica la cantidad de variantes virales identificadas en una muestra y toma valores en un rango entre 0 (cuando todos los genomas son iguales) y 1 (cuando los genomas son diferentes entre sí). Fue calculado bajo la siguiente fórmula matemática: $S_n = -\sum_i [(p_i \times \ln p_i) / \ln N]$ [182] donde p_i es la frecuencia de cada secuencia en la distribución de mutantes y N es el número total de secuencias que se comparan [183].

Selección positiva y negativa

El análisis de cuasiespecies incluyó el cálculo de la relación entre el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (dN) y el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (dS) a nivel intra-paciente. La relación dN/dS fue calculada con los clones obtenidos de los aislamientos de NS5A de pacientes HIV coinfectados, antes y durante la terapia basada en el IFN. Se realizó a nivel nucleotídico mediante el programa MEGA 4.0 bajo el modelo Tamura Nei [177].

Esta relación determina el grado de selección natural. Así, dN/dS >1 indica selección positiva mientras que valores menores a 1 indican presión de selección negativa.

Además, para evaluar la selección positiva y negativa en cada codón, se utilizó el programa *HyPhy* [184]. La selección positiva ocurre cuando un cambio aminoacídico confiere una ventaja adaptativa mientras que la selección negativa implica la eliminación de cambios en aminoácidos que puedan conferir una desventaja. El programa *HyPhy* permite la comparación estadística del número de sustituciones sinónimas y no sinónimas en cada posición de un grupo de secuencias alineadas.

Se utilizó el algoritmo SLAC (*single likelihood ancestor counting*) del mencionado programa [185] para evaluar la selección intra-paciente (análisis de clones de cada paciente en cada tiempo). Dicho algoritmo permite la detección de la selección no neutral basado en el modelo de Suzuki y Gojobori. Los sitios identificados por SLAC con un nivel de significancia de $p < 0,01$ fueron considerados como sitios seleccionados positiva o negativamente según corresponda.

Análisis de poblaciones virales minoritarias en E2-PePHD por pirosecuenciación ultra-profunda (UDPS)

La pirosecuenciación es un método de secuenciación de alto rendimiento que permite inferir las secuencias mayoritarias y minoritarias en un mismo amplicón, sin realizar previamente el ensayo de clonado.

Esta técnica se utilizó para analizar las poblaciones minoritarias en el dominio PePHD y sus regiones flanqueantes y su posible efecto en la resistencia al tratamiento. Para esto, se estudió una población de 15 pacientes infectados con el genotipo 1 (tanto 1a como 1b) del HCV, antes del inicio del tratamiento con peg-IFN+RBV y a las 24hs, 4 y 12 semanas de haber iniciado el mismo.

A partir del producto de PCR se realizó una *nested*-PCR según el protocolo previamente descrito para la región a excepción del agregado de un Tag en la región 5' de cada *primer*. Estos Tags permiten la identificación de la región secuenciada, del paciente y del tiempo de estudio.

Los tags se detallan a continuación:

Forward-Tag 5'- CACGACGTTGTAACCGA-3'

Reverse-Tag 5'- CAGGAAACAGCTATGACC-3'

Los productos de *nested*-PCR fueron pirosecuenciados en la plataforma 454 Life Science, GS-FLX, Roche Applied Science (Instituto de Agrobiotecnología de Rosario, INDEAR) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Esta técnica permite incrementar la probabilidad de detectar variantes minoritarias, pobremente representadas, existentes en la población viral heterogénea circulante del paciente.

Para distinguir las variantes minoritarias auténticas de los artefactos técnicos, se utilizó un umbral de estimación del 1%. Las mutaciones detectadas por encima de ese umbral resultan poco probables de ser un artefacto de técnicas basadas en cálculos teóricos reportados previamente utilizando un enfoque estadístico [186].

Se analizaron un total promedio de 872 secuencias para cada tiempo de estudio de cada paciente, haciendo un total de 39.364 secuencias analizadas en todo el estudio. Las secuencias se editaron individualmente, de manera manual, eliminando aquellas secuencias incompletas o erróneas. Una vez editadas las secuencias de cada tiempo de cada paciente, se prosiguió al análisis de la conservación del dominio PePHD.

Análisis de aminoácidos

El grado de conservación de cada aminoácido que compone el PePHD se determinó mediante la implementación de programa BioEdit [187]. Este programa posee una utilidad basada en la determinación de la proporción de aminoácidos en cada posición. Las secuencias de cada tiempo de cada grupo de pacientes se analizaron de manera separada, obteniéndose valores de proporción de aminoácidos a los tiempos basales y 24hs, 4 y 12 semanas de tratamiento, para los pacientes respondedores, no respondedores y para aquellos que recaen durante la terapia con peg-IFN+RBV.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron según lo ya explicado.

4. RESULTADOS

4. Resultados

En esta sección se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos planteados en esta tesis.

4.1. Distribución de genotipos del HCV en pacientes infectados por HIV. Relación con los niveles de carga viral plasmática

Recientemente ha sido publicada por nuestro grupo de trabajo la distribución de genotipos desde 85 pacientes virémicos para HCV coinfectados con HIV asistidos en un mismo Hospital de la Ciudad de Buenos Aires [178]. Profundizando dicha investigación, se analizó retrospectivamente la distribución de genotipos del HCV y los niveles de carga viral desde pacientes naïve de tratamiento anti-HCV, coinfectados con HIV, provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Buenos Aires y del conurbano bonaerense. Todos ellos asistían al Centro Nacional de Referencia para el SIDA para su determinación genotípica y de carga viral del HCV. Se analizaron un total de 221 pacientes HIV-HCV coinfectados.

La prevalencia del genotipo 1 alcanzó el 71% (n=157), en tanto que los genotipos 2, 3 y 4 se hallaron en el 2% (n=5), 18% (n=40) y 2% (n=4), respectivamente (Figura 4.1). Se caracterizaron 15 (7%) infecciones mixtas, implicando al menos dos genotipos diferentes. Los aislamientos virales pertenecientes al genotipo 1 (n=157) incluyeron un 42% (n=92) del subtipo 1a, 11% (n=27) del subtipo 1b, 6% (n=13) y el 12% (n=25) restante no pudo discernirse entre ambos subtipos. Paralelamente los niveles de carga viral plasmática se determinaron empleando la técnica de ADN ramificado o *bdNA*. Los valores promedio se muestran en la Tabla 4.1, no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre los distintos genotipos ($p>0.05$).

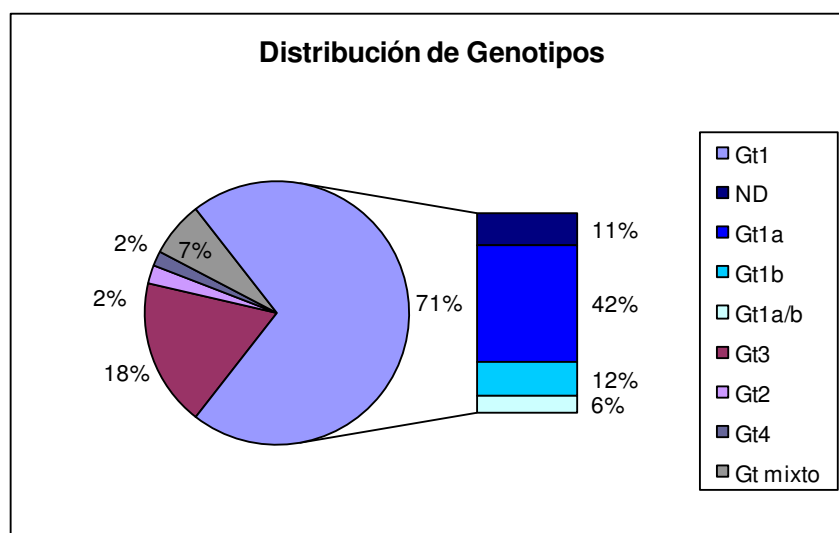


Figura 4.1: Distribución de genotipos y subtipos del HCV en pacientes coinfectados con HIV.

Tabla 4.1: Prevalencia de genotipos del virus de la hepatitis C y niveles de carga viral plasmática hallados en la población estudiada (N=221).

Genotipo	N	% (IC 95%)	Media (UI/mL)	Desvío estándar
1a	92	41 (34-48)	2.277.000	8.255.000
1b	27	12.2 (7.6-16.7)	1.216.000	1.457.000
1ab	13	4.9 (1.8-8)	2.007.000	2.017.000
1 (NS)	25	11.3 (6.9-15.7)	1.106.000	1.316.000
2	5	2.26 (0.73-5.2)	2.309.000	374.781
3	40	18.1 (12.8-23.4)	949.586	1.457.000
4	4	1.8 (0.5-4.5)	667.541	3.980.000
Mixto	15	6.7 (3.2-10.3)	1.312.000	1.685.000

NS: no subtipificable

Aún sin evidenciar diferencias significativas en la eficiencia replicativa de los distintos genotipos evaluada a partir los niveles de carga viral plasmática, persiste la elevada prevalencia de los genotipos 1a y 3a, con menor aporte de los genotipos 1b y 2. Estos resultados remarcan las diferencias respecto de la distribución de genotipos hallada en pacientes mono infectados por HCV en donde el genotipo más abundante es el 1b [40].

4.2. Epidemiología molecular del HCV genotipo 4

En un relevamiento de la base de datos realizada en el punto anterior se analizó un total de 383 nuevos estudios de carga viral y genotipo para HCV.

La distribución de los genotipos del HCV entre 383 pacientes HIV positivos mostró que 14 aislamientos resultaron ser genotipo 4, observándose un incremento de 4 veces ($p=0.01$) respecto lo previamente publicado por nuestro grupo de trabajo en el año 2007 [178].

Para el análisis de epidemiología molecular del HCV-4 se incorporaron 4 secuencias de genotipo 4 halladas en la base de datos previamente descripta, analizándose un total de 18 secuencias HCV-4 aislados de pacientes coinfectados con HIV.

Caracterización molecular y análisis filogenético de los aislamientos del HCV genotipo 4

La distribución del HCV-4, de acuerdo a las características epidemiológicas de los pacientes, mostró diferencias significativas con respecto a la edad del Gt2 (45.5 ± 1.7 vs. 65.0 ± 3.2 , respectivamente; $p < 0.005$) y a la carga viral del Gt1 (5.49 ± 0.27 vs. 5.85 ± 0.33 , respectivamente; $p < 0.003$). El genotipo 4 fue más frecuente en hombres (56%) que en mujeres (Tablas 3.1 y 4.2)

El resultado de las cepas del HCV-4 que fueron secuenciadas y subsecuentemente analizadas filogenéticamente por Máxima Verosimilitud (Figura 4.2), Máxima Parsimonia (Figura 4.3) y análisis Bayesiano (Figura 4.4) muestra el agrupamiento de todas las secuencias con un grupo de secuencias de referencia determinada, pudiendo así inferirse el subtipo de los aislamientos. Las secuencias de aislamientos de Argentina se clasificaron como subtipo 4d (67%), 4a (22%), y 4m (11%).

Todos los pacientes informaron ser argentinos y no haber viajado a áreas endémicas. Diferentes conductas de riesgo de infección fueron identificadas desde los pacientes. De aquellos cuatro infectados con el Gt4a, dos notificaron ser usuarios de drogas inyectables, una trabajadora sexual y el restante declaró haber recibido una transfusión sanguínea. Con respecto a los 12 pacientes infectados con el genotipo 4d, 4 fueron usuarios de drogas inyectables, 4 hombres declararon tener sexo con hombres y entre los 4 restantes, 3 refirieron conductas heterosexuales y 1 declaró no conocer la vía

de transmisión. Finalmente, aquellos infectados con el subtipo 4m informaron una posible transmisión sexual. No se halló una asociación estadística entre las vías de transmisión declaradas y la distribución de los diferentes subtipos del HCV-4 hallados ($p>0.05$), no obstante el número de pacientes analizado es pequeño y amerita un futuro estudio.

Tabla 4.2: Características demográficas y vías de transmisión del genotipo 4 del HCV en pacientes coinfectados con HIV.

Características	Pacientes, N (%)
N total	18 (100)
Género	
Masculino	10 (56)
Femenino	8 (44)
Edad (Años)	
Media (IQR)	43.5 (39-45)
Vía de transmisión	
Usuario de droga inyectable	6 (33)
Transfusión sanguínea	1 (6)
Contacto sexual	
Heterosexual	6 (33)
MSM	4 (22)
Desconocido	1 (6)
Subtipos	
4a	4 (22)
4d	12 (67)
4m	2 (11)

IQR, Rango Intercuartil

MSM, Hombres que tienen sexo con hombres

Comparación con secuencias de bases de datos

Con el fin de comparar las vías de transmisión mundiales con los aislamientos argentinos, se realizaron análisis filogenéticos de las cepas del HCV-4 de Argentina junto con otras cepas de diferentes partes del mundo obtenidas de las bases de datos de secuencias disponibles (GenBank y la base de datos Europea) [151, 154]. Este análisis no relevó ninguna asociación entre las cepas del HCV de Argentina y las caracterizadas en otros países. En el mismo sentido, las cepas 4d (Pat 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 18) y 4a (Pat 1, 11, 14, 17) de pacientes de Argentina caracterizadas de pacientes coinfectados con HIV se asociaron en los árboles filogenéticos de NS5B con las cepas 4d (AF308574 y AF308575) y 4a (AF308573) de pacientes argentinos HCV mono infectados

previamente caracterizados para la misma región [188], así como con cepas de Francia y Egipto. Las secuencias de los subtipos 4m (Pat 2 y 15) se hallaron cercanamente relacionadas a aislamientos de Egipto (Figuras 4.2, 4.3 y 4.4).

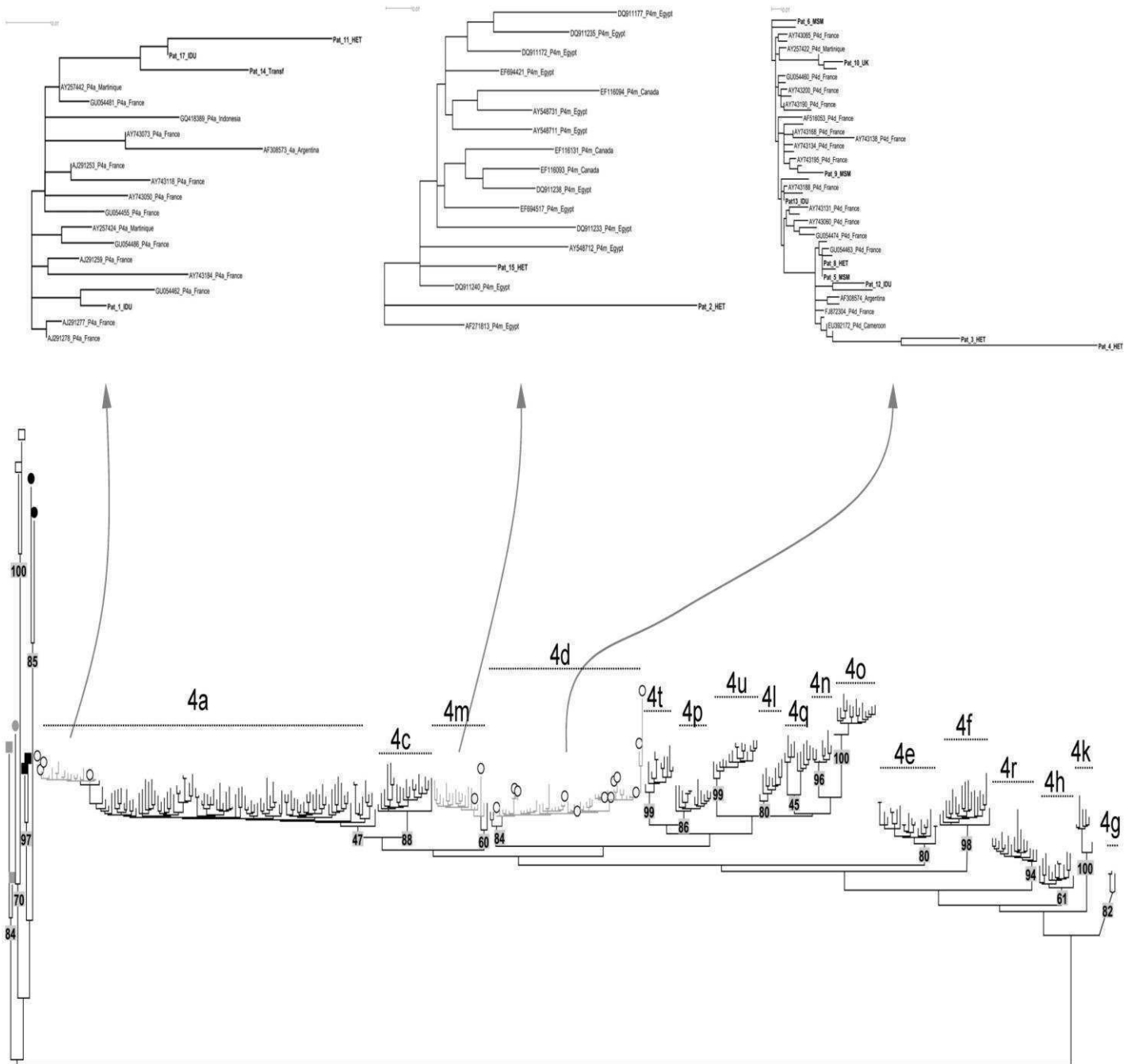


Figura 4.2: Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de secuencias nucleotídicas de la región NS5B mostrando la distribución de los geno/subtipo de los 18 aislamientos del HCV de Argentina (fondo gris); la vía de transmisión está definida en cada aislamiento. Otras 3 secuencias de Argentina (fondo negro) publicadas por otro estudio [188] también se hallan representadas (AF308573; AF308574; AF308575). Las secuencias de referencia del Gt4 fueron obtenidas de GenBank y se indican por su número de acceso y en los casos que fue posible, el país de origen o el país de toma de muestra. El soporte de *bootstrap* (n=100) de las ramas más relevante se muestran en fondo gris. El largo de las ramas es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas por sitio del alineamiento (bar=0.1 sustituciones).



Figura 4.3: Árbol filogenético de Máxima Parsimonia de secuencias nucleotídicas pertenecientes a la región NS5B mostrando la distribución genotípica de los 18 aislamientos del HCV de Argentina (fondo rojo). Otras 3 secuencias de Argentina publicadas por otro estudio [188] también se hallan representadas (ARG45, ARG46, ARG47). El soporte de *bootstrap* ($n=100$) de las ramas más relevante se muestran en fondo gris.



Figura 4.4: Árbol filogenético basado en análisis Bayesianos de la región NS5B mostrando la distribución genotípica de los aislamientos de Argentina genotipo 4. Otras 3 secuencias de aislamientos argentinos publicadas por otro estudio [188] también se hallan representadas

(ARG45, ARG46, ARG47). Secuencias de referencia de los diferentes subtipos se hallan denotadas con círculos abiertos. Las secuencias del *outgroup* se indican con cuadrados negros (Gt1), grises (Gt3) y círculos negros (Gt6) y grises (Gt5). Los subgrupos dentro del Gt4 se denotan con líneas verticales. Las probabilidades posteriores de las ramas más relevantes se muestran en fondo gris. El largo de las ramas es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas por sitio del alineamiento (bar=0.1 sustituciones).

4.3. Epidemiología molecular del HCV genotipo 1a

A partir de la base de datos realizada en el punto 4.1 se estudió la epidemiología molecular de 25 pacientes infectados con el subtipo 1a del HCV, coinfectados con HIV.

De acuerdo a los datos epidemiológicos aportados por los pacientes, la vía de transmisión más frecuente del subtipo 1a del HCV fue la de uso de drogas inyectables (Tabla 4.3). No se hallaron diferencias significativas en la respuesta final al tratamiento y el género, la edad, el grupo de riesgo, el recuento de células CD4+, la carga viral plasmática y los años estimados de infección con HIV o HCV ($p>0.05$). Todos los pacientes residen en la ciudad de Buenos Aires y expusieron no haber estado en el extranjero.

Tabla 4.3: Características demográficas y bioquímicas de los 25 pacientes HCV-1a.

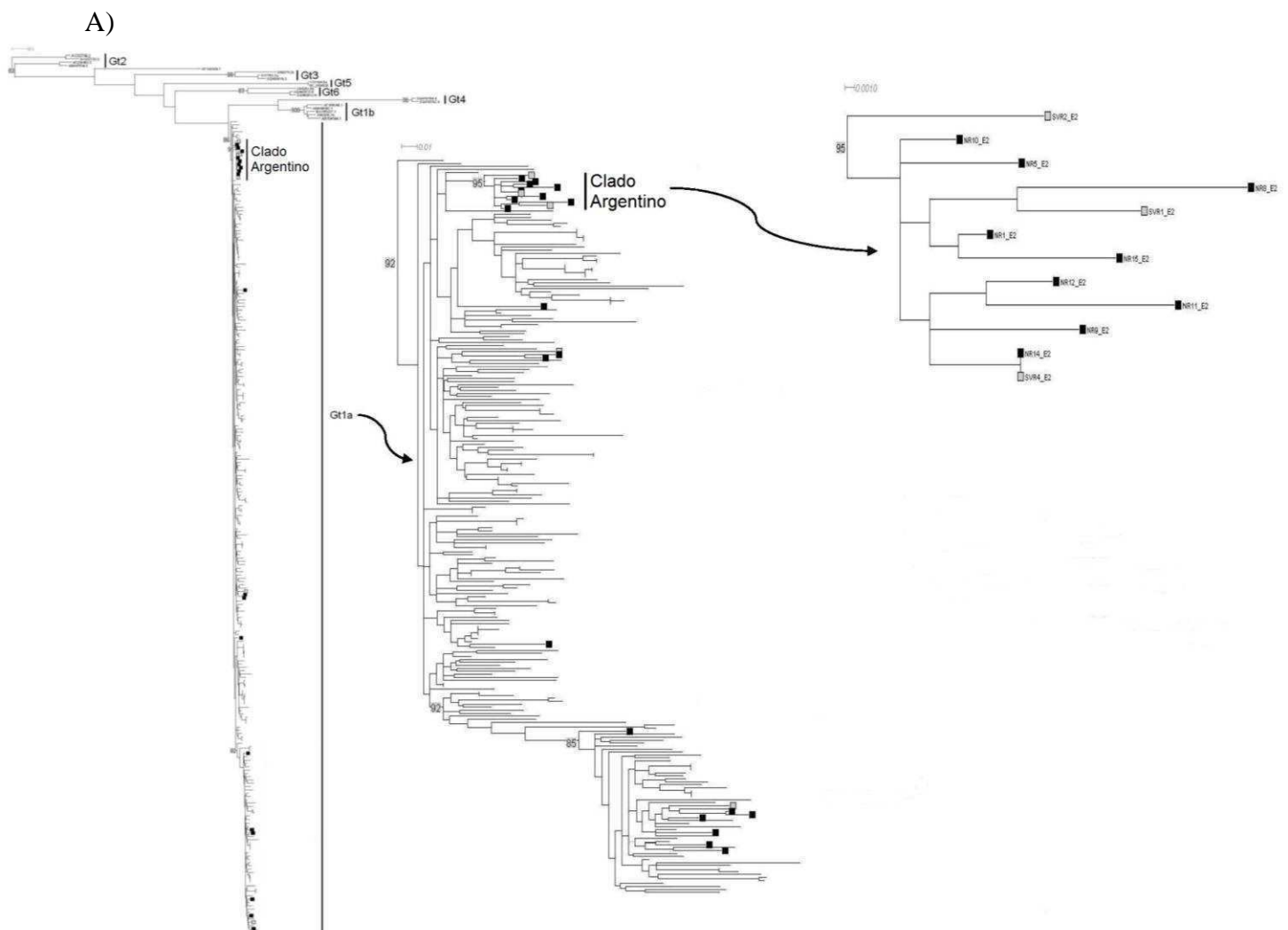
Paciente	Género	Edad (Años)	Peso (Kg)	Grupo de Riesgo	tpg (UI/ml)	CD4 (cel/ml)	Carga Viral HCV (copias/ml)	Estado de Fibrosis	Años con HIV*	Años con HCV*
NR1	M	47	73	IDU	49	400	482301	4	16	16
NR2	M	37	77	IDU	66	522	1016630	1	2	16
NR3	M	35	67	IDU	99	817	2395250	1	15	8
NR4	M	39	76	IDU	48	414	405739	3	8	12
NR5	M	42	83	IDU	60	130	2462780	0	12	21
NR6	F	51	ND	HTS	ND	547	178000	ND	5	ND
NR7	M	33	64	IDU	53	479	49311	4	3	13
NR8	M	33	72	IDU	124	376	1210710	2	5	5
NR9	M	51	65	HTS	105	625	4597530	3	10	7
NR10	M	40	75	IDU	97	303	727493	2	21	10
NR11	F	38	50	IDU	59	644	949673	4	16	8
NR12	M	45	70	HTS	50	483	249421	1	1	5
NR13	M	42	81	MSM	191	957	266123	3	21	21
NR14	M	41	58	MSM	92	262	3385810	1	ND	ND
NR15	M	42	95	IDU	59	ND	2372610	2	5	12
NR16	M	51	ND	IDU	ND	482	500000	ND	7	ND
NR17	M	42	ND	MSM	ND	468	500000	ND	7	ND
NR18	F	50	ND	IDU	ND	661	500000	ND	5	ND
NR19	M	55	ND	IDU+MSM	ND	422	329000	ND	23	ND
NR20	M	40	ND	MSM	ND	510	500000	ND	9	ND
SVR1	F	37	54	HTS	29	476	665641	0	6	15
SVR2	M	41	80	HTS	145	329	148881	ND	12	12
SVR3	M	34	67	IDU	41	1448	5506420	ND	25	25
SVR4	M	45	65	MSM	115	989	57629	ND	22	22
SVR5	M	41	ND	IDU+MSM	ND	471	433000	ND	17	ND

MSM: Hombres que tienen sexo con hombres; IDU: Usuario de drogas inyectables; HTS: Heterosexuales; ND: No determinado

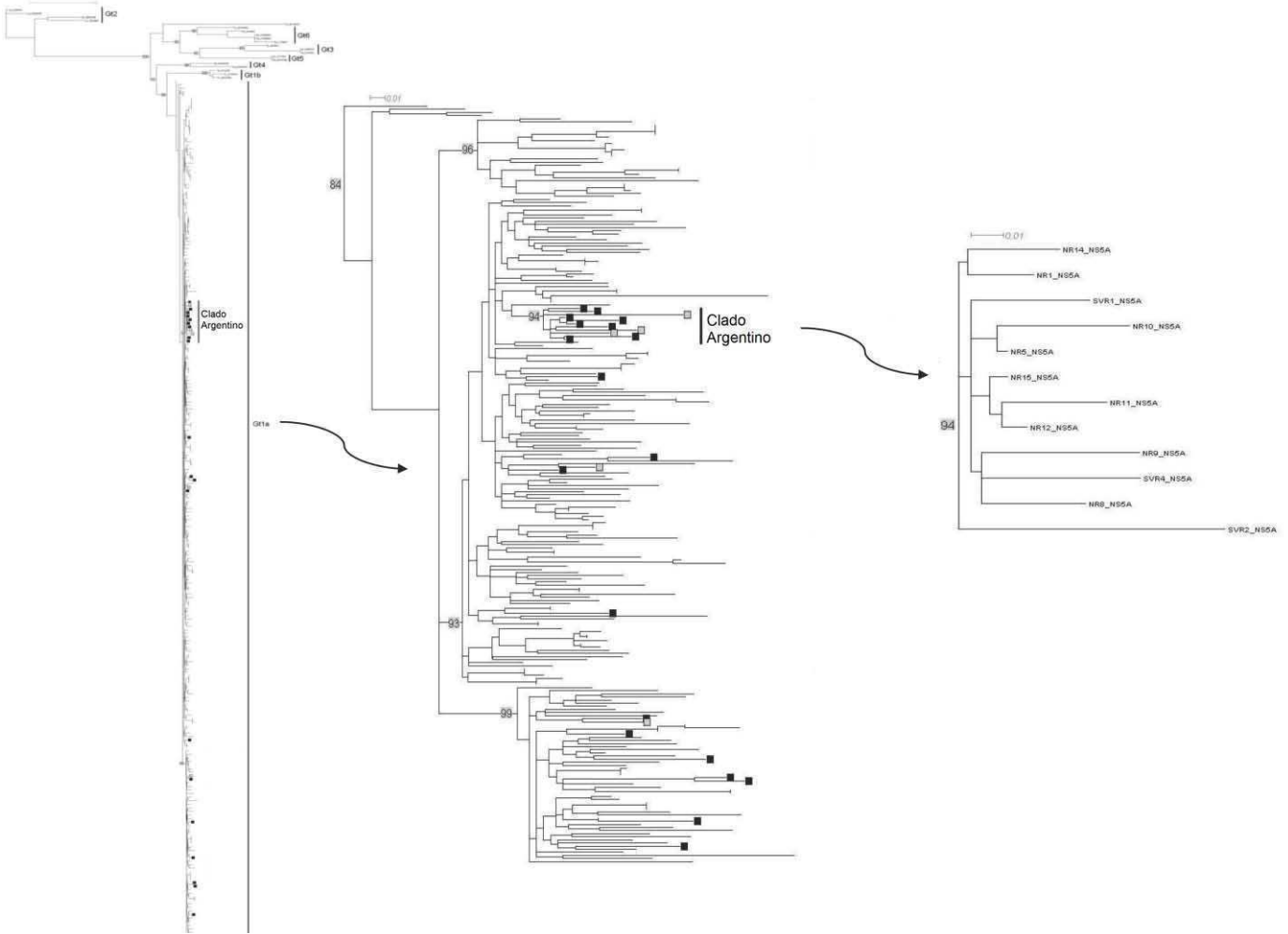
*Considerado a partir del resultado serológico.

Análisis filogenético del HCV

Los árboles filogenéticos de las regiones E2, NS5A y E2-NS5A concatenadas mostraron la misma distribución de las secuencias del HCV-1a de Argentina, con respecto al resto de las secuencias de referencia. Se observó que un grupo de 12 secuencias HCV-1a se hallaban cercanamente relacionadas formando un clado monofilético que se denominó como “*Clado Argentino*”. Este clado se halló en los tres árboles filogenéticos y en todos ellos el soporte de las ramas presentaba altos valores de *bootstrap*. Las 13 secuencias restantes se dispersaron dentro del subtipo 1a y se las denominó como “*Otras Secuencias Argentinas*” (Figura 4.5).



B)



C)

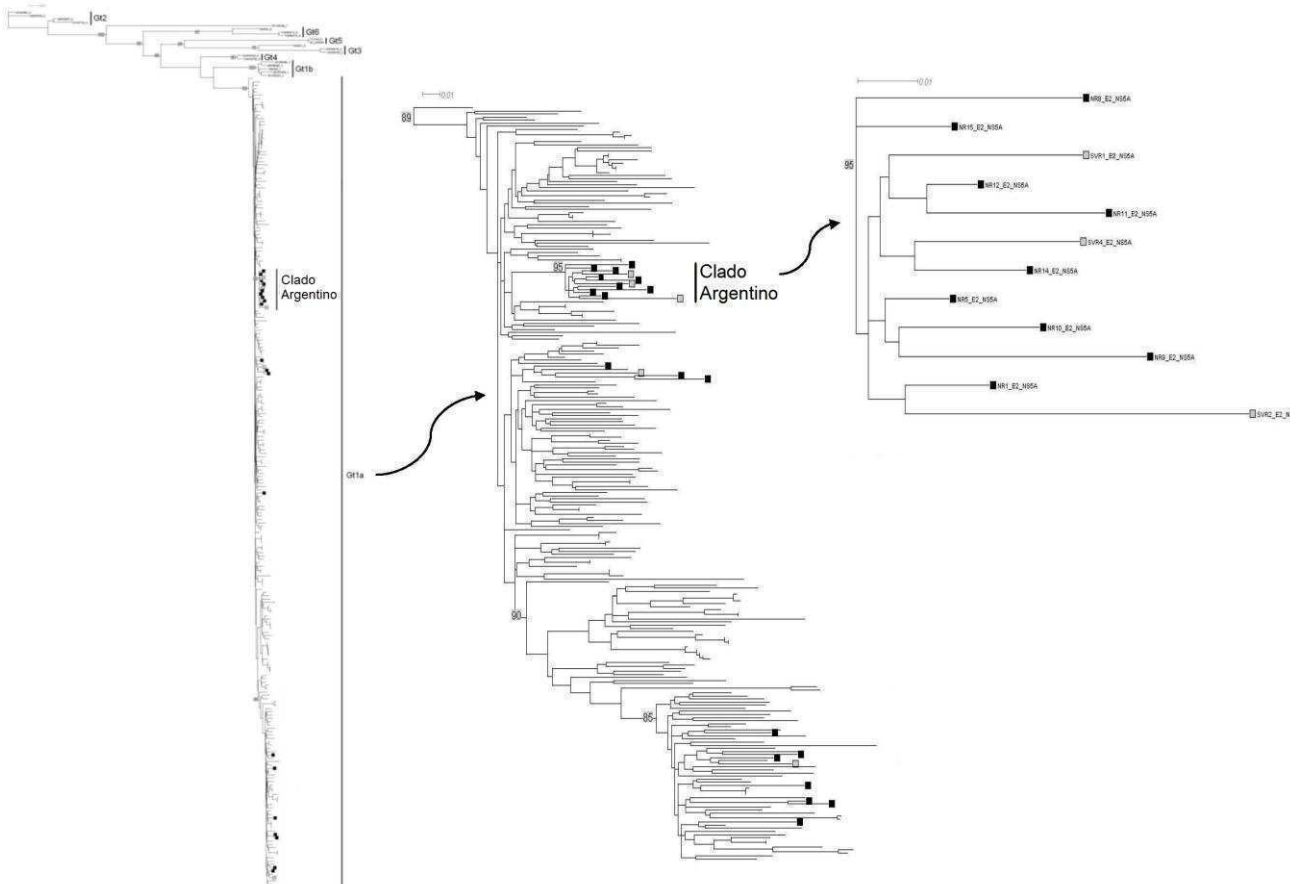
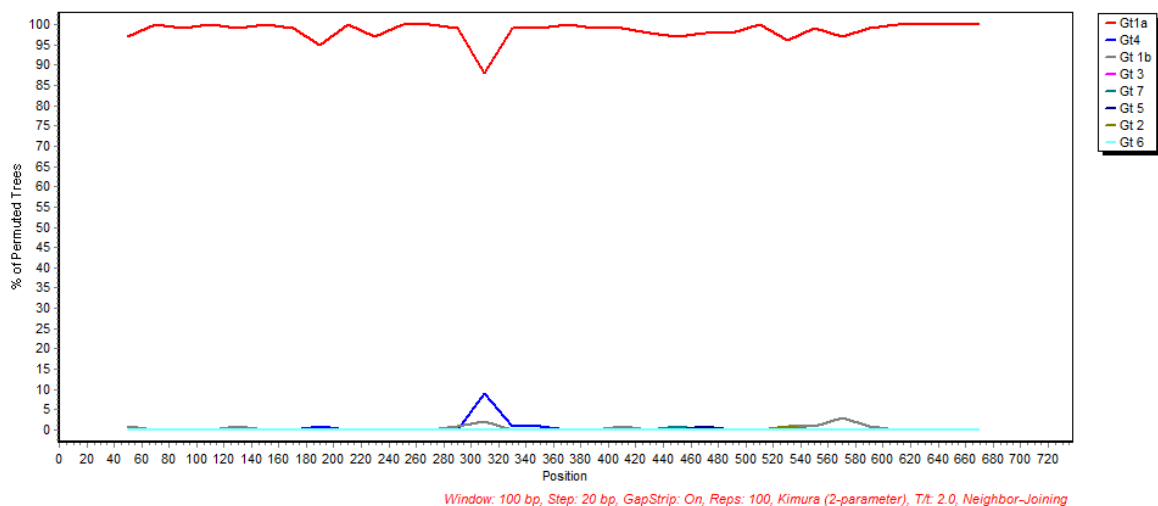


Figura 4.5: Árbol filogenético basado en el método probabilístico de Máxima Verosimilitud de secuencias nucleotídicas correspondientes a las regiones genómicas del HCV E2 (A), NS5A (B) y E2-NS5A concatenadas (C) de los aislamientos del HCV de Argentina. En cuadrados negros se hallan representadas las secuencias HCV-1a locales de pacientes que no responden al tratamiento y en cuadrados grises las que sí responden. El soporte de *bootstrap* ($n=100$) de las ramas más relevante se muestran en fondo gris. El largo de las ramas es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas por sitio del alineamiento (bar=0.1 sustituciones).

No se detectaron aislamientos del HCV-1a de Argentina que presentara eventos de recombinación en alguna de las dos regiones genómicas estudiadas. En la figura 4.6 se muestran dos ejemplos, uno por de cada grupo, de los análisis de recombinación para las regiones E2-NS5A concatenadas.

A)



B)

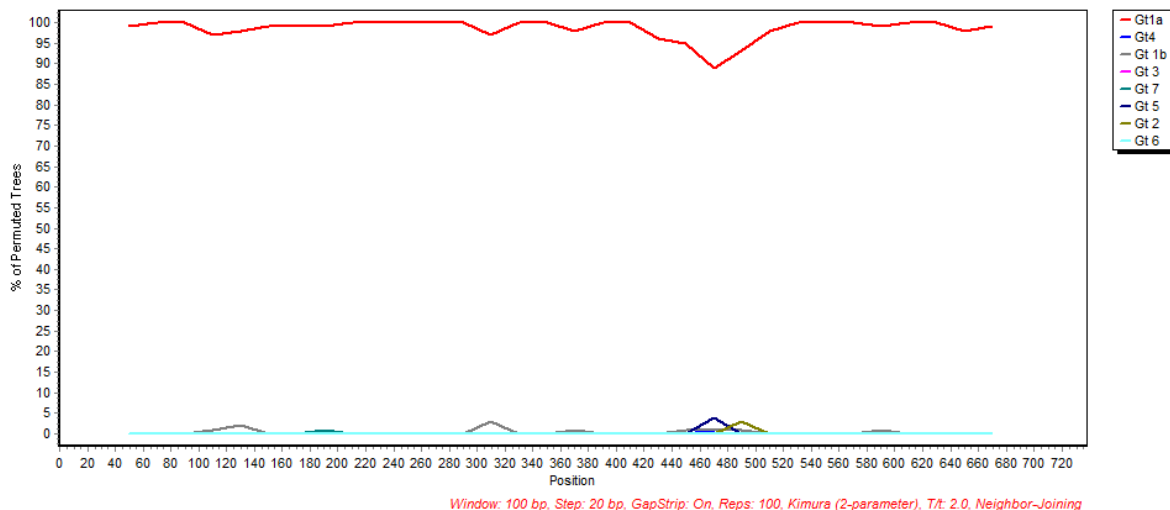


Figura 4.6: Ejemplo representativo de análisis de recombinación para las regiones E2-NS5A concatenadas para un paciente incluido dentro del “Clado Argentino” (A) y uno incluido en el grupo de “Otras Secuencias Argentinas” (B). En todos los casos se utilizó un ancho de ventana de 100pb y un tamaño del paso de 20bp. Los diferentes genotipos y subtipos se hallan representados en diferentes colores.

No se hallaron relaciones estadísticas entre la distribución de las secuencias del HCV-1a de Argentina y el sexo, la vía de infección o la respuesta final al tratamiento con peg-IFN+RBV ($p>0.05$) (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Características basales de los pacientes incluidos en cada grupo

Características		Clado Argentino (n=12)	Otras secuencias Argentinas (n=13)
Género	Masculino	10	11
	Femenino	2	2
Grupo de Riesgo	IDU	6	9
	HTS	4	1
	MSM	2	3
No Respondedor (NR)		9	11
Respondedor Viroológico Sostenido (RVS)		3	2
Fibrosis METAVIR 3-4 score		1.4	2.4
Edad \pm DS (años)		41 \pm 5	42 \pm 6
ALT \pm DS (IU/mL)		82 \pm 36	83 \pm 56
CD4 \pm DS (cel/ml)		456.1 \pm 232.8	630.6 \pm 293.1
CV-HCV \pm DS (Log copias/ml)		6.16 \pm 6.16	6 \pm 6.17
Años con HIV \pm DS ¥		11.5 \pm 6.9	11.3 \pm 7.9
Años con HCV \pm DS ¥		12.1 \pm 5.9	15.8 \pm 6.2

IDU: Usuario de droga inyectable; HTS: heterosexual; MSM:hombre que tiene sexo con hombre; CV: Carga Viral

ALT (alanine-amino transferasa)

¥ Desde el diagnóstico serológico

Análisis de la composición de aminoácidos y de la predicción de la unión de los péptidos derivados del HCV-1a con el CMH clase I

Se utilizó el programa VESPA para caracterizar los patrones aminoacídicos de las regiones E2 y NS5A del *Clado Argentino* y de las secuencias incluidas dentro de *Otras Secuencias Argentinas* (Tabla 4.5).

Las secuencias del *Clado Argentino* difirieron de aquellas pertenecientes a *Otras Secuencias Argentinas* en la posición y frecuencia de 10 aminoácidos (N653D, E655D,

S686T y A710V para E2; y L2198V, Q2228E, I2268V, Q2283P, V2287I y Q2320R para NS5A). De estos 10 aminoácidos hallados, 6 presentaron diferencias en la unión a los epitopes CTL, exhibiéndose cambios de unión en 11 epitopes CTL (Tabla 4.6).

Tabla 4.5: Resumen de la frecuencia de aminoácidos del *Clado Argentino* y *Otras Secuencias Argentinas* obtenidos con el VESPA

Posición	E2			
	653	655	686	710
Clado Argentino	N 83% ; D 8%	E 92% ; D 8%	S 100% ; T 0%	A 92% ; V 8%
Otras secuencias Argentinas	D 77% ; N 8%	D 54%; E 38%	T 54%; S 46%	V 62%; A 38%

Posición	NS5A					
	2198	2228	2268	2283	2287	2320
Clado Argentino	L 100% ; V 0%	Q 75% ; E25	I 83% ; V 8%	Q 58%; P 41%	V 67%; I25%	Q 83% ; Q 17%
Otras secuencias Argentinas	V 46%; L 23%	E 62%; Q15%	V 70% ; I23%	P 92% ; Q 7%	I 70% ; V23%	R 54%; Q 23%

Los aminoácidos con frecuencias $\geq 70\%$ se hallan resaltados en negro ($p \leq 0.05$)

Tabla 4.6: Variaciones de aminoácidos en las secuencias de E2 y NS5A del HCV de aislamientos de Argentina de cada grupo y su relación con la unión a los alelos HLA. En gris están marcados aquellos alelos que cambian su unión a los péptidos del HCV.

Posición	Péptido	Alelos HLA													
		A0202	A0203	A0250	A6801	A6802	B150	B1501	B1517	B4001	B4002	B4403			
H77	654-662	L EDRDRSEL													
Clado Argentino		*****	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	NB	NB	NB
Otras secuencias Argentinas		*D*****	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
H77	686-701	S TGLIHLHQNIVDVQ													
Clado Argentino		*****	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Otras secuencias Argentinas		T*****	NB	NB	NB	NB	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
H77	701-716	YLYGVGSS I ASWAIK													
Clado Argentino		*****	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Otras secuencias Argentinas		*****V*****	NB	NB	NB	NB	B	B	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB
H77	708-716	SI A SWAIKW													
Clado Argentino		*****	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	NB	NB	NB	NB	NB
Otras secuencias Argentinas		**V*****	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
H77	2197-2205	S VASSASQ													
Clado Argentino		*L*****	B	B	B	NB	NB	NB	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Otras secuencias Argentinas		*****	NB	NB	NB	B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
H77	2266-2275	RE I SVPAEIL													
Clado Argentino		*****	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	B	B	NB
Otras secuencias Argentinas		**V*****	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	B	NB	NB	NB

NB: No unión a alelos HLA ; B: Unión a alelos HLA

* Igual secuencia aminoacídica

Tasas de sustitución y tiempos de evolución del HCV-1a

Los análisis de reconstrucción ancestro común se realizaron con el fin de determinar el origen y la distribución de las 25 cepas HCV-1a de Argentina. El reloj

molecular relajado se utilizó para todos los *sets* de datos por ser el que mejor se ajusta a las muestras.

El tiempo del ancestro común más cercano (tMRCA) de las secuencias incluidas dentro del *Clado Argentino* se estimó alrededor de 1991 para E2 y 1990 para NS5A, mientras que para las *Otras Secuencias Argentinas* fue cerca de 1973 para E2 y 1976 para NS5A (Tabla 4.7). El análisis de las tasas de sustitución por sitio por año no mostró diferencias entre las dos regiones analizadas ni entre los grupos del *Clado Argentino* y el de *Otras Secuencias Argentinas*.

Tabla 4.7: Parámetros evolutivos de las secuencias del HCV-1a de Argentina incluidas en los diferentes grupos para las dos regiones en estudio, E2 y NS5A.

Región	Description	Tasa de Sustitución ^a	tMRCA (95% HPD)
E2	Clado Argentino	9,2E-3 (1,68E-5/ 2E-2)	1991 (2003-1973)
	Otras Secuencias Argentinas	5,2E-3 (1,3E-3/ 9,5E-3)	1977 (1999-1941)
NS5A	Clado Argentino	1,04E-2 (1,2E-5 /2E-2)	1990 (2006-1971)
	Otras Secuencias Argentinas	7,01E-3 (4,8E-3 /9,2E-3)	1976 (2000-1931)

HPD: Maxima densidad posterior

Todos los valores poseen un ESS>200

^a Sustitución por sitio por año

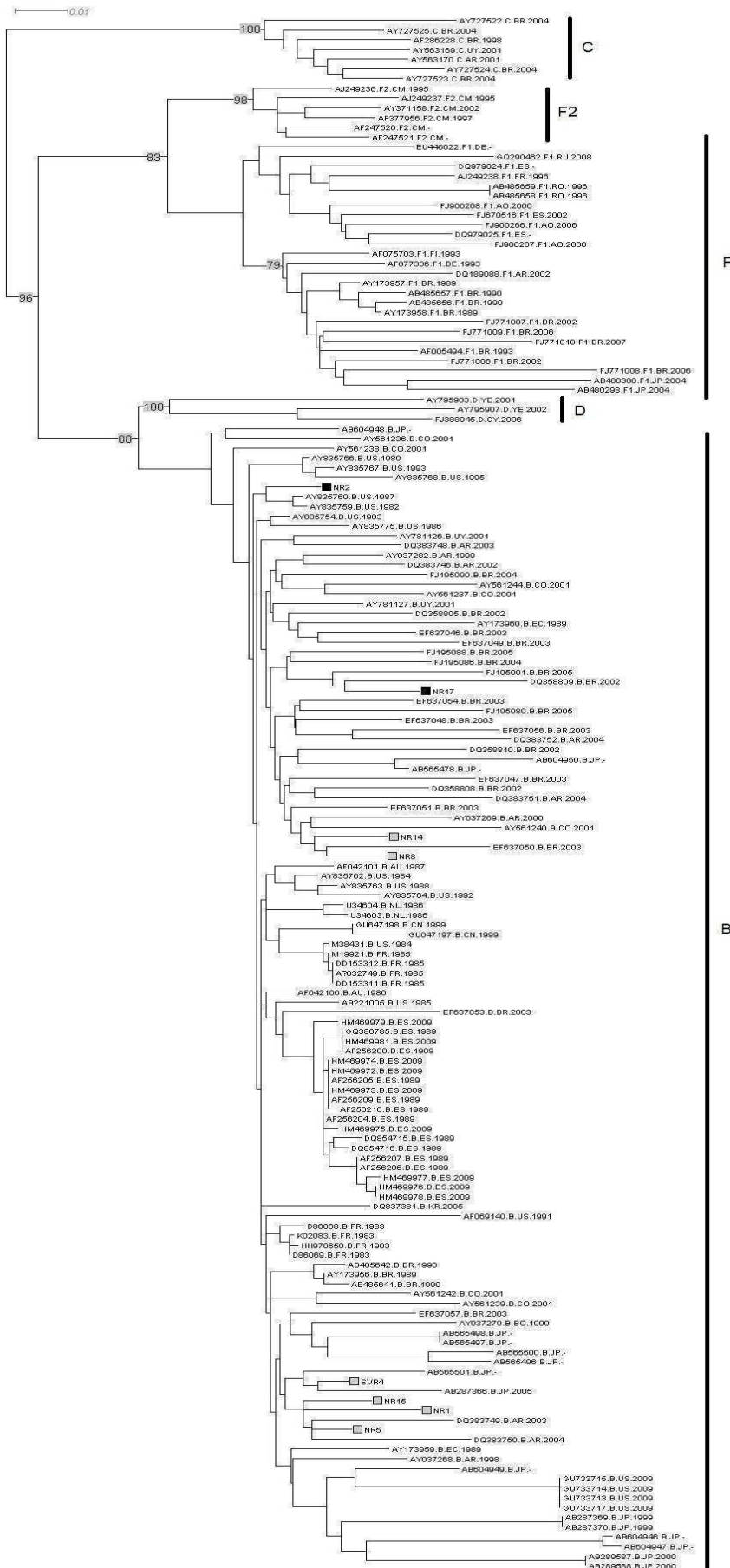
Análisis filogenético y de recombinación de los aislamientos de HIV caracterizados a partir de pacientes coinfectados

Teniendo en cuenta que HIV y HCV coexisten en un mismo hospedador y que pueden influir recíprocamente entre ellos, se estudiaron las secuencias de la región *pol* de HIV obtenidas de los mismos pacientes incluidos en el estudio. Considerando que todos los pacientes se hallaban bajo tratamiento antirretroviral, la detección de ARN (límite de detección menor a 50 copias/ml) pudo realizarse en 8 de 25 pacientes. Entre ellos, 6 estaban coinfectados con HCV-1a incluidos dentro del *Clado Argentino*, mientras que las dos restantes pertenecían a aislamientos de *Otras Secuencias Argentinas*. Las relaciones filogenéticas de HIV mostraron que los 6 aislamientos antes descriptos se incluían en el subtipo recombinante BF, mientras que las restantes dos secuencias amplificadas se incluían en el subtipo B (Figura 4.7).

A)



B)



C)

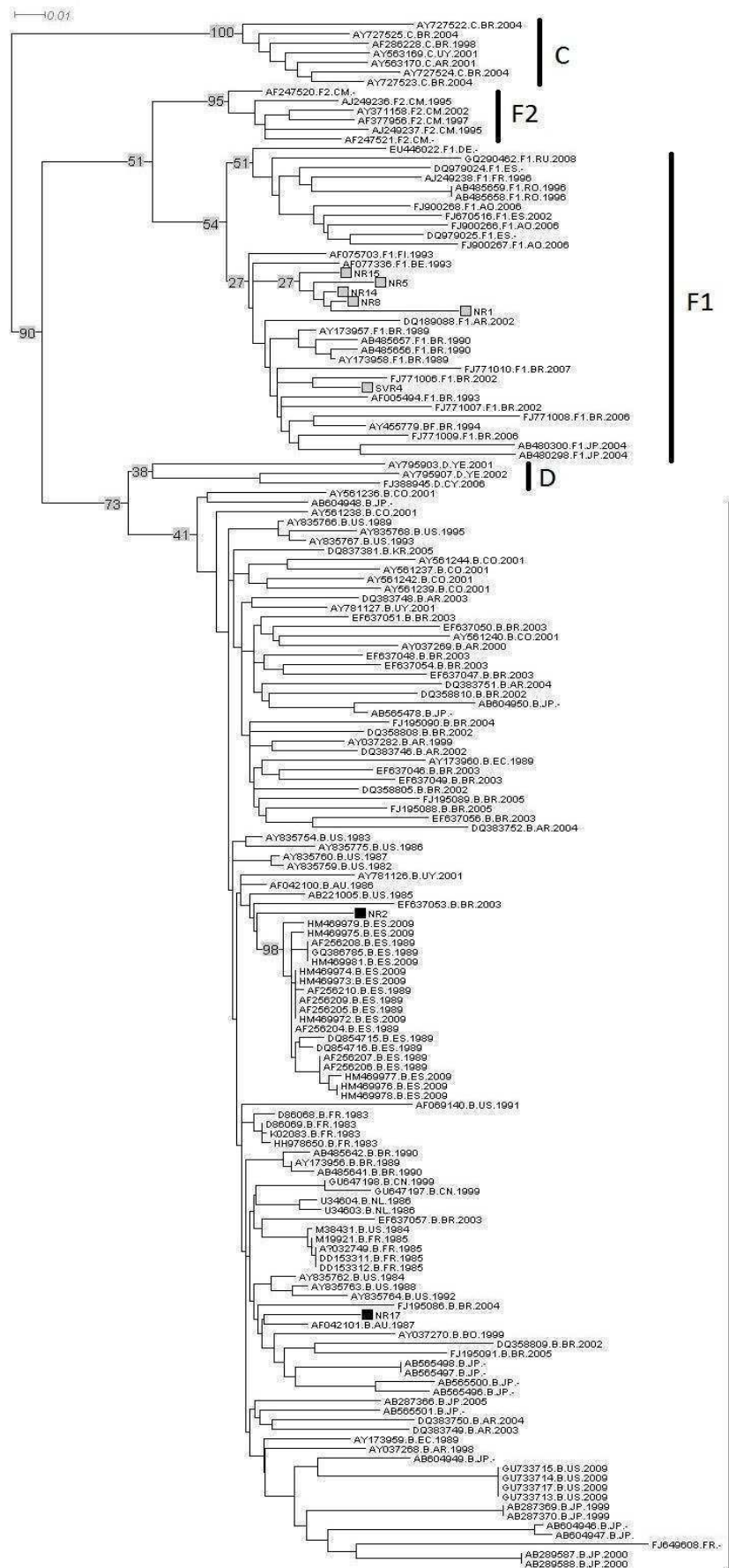
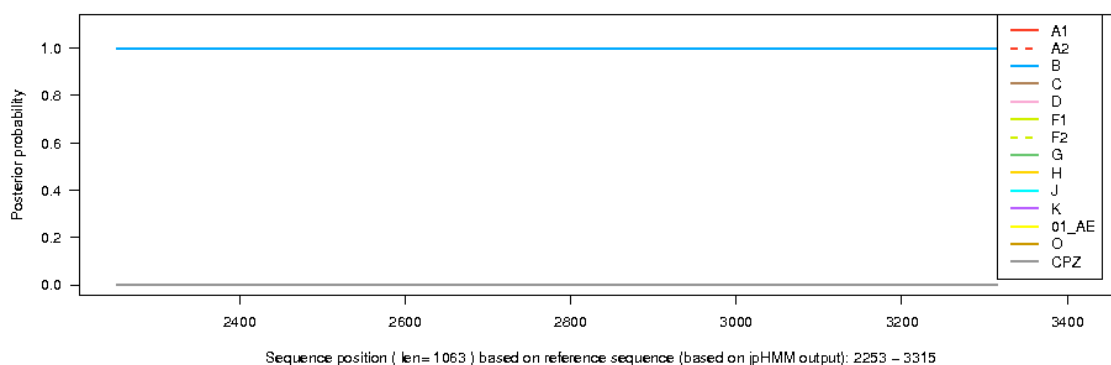


Figura 4.7: Árbol de Máxima Verosimilitud realizado con las secuencias obtenidas de la región *pol* de HIV completa (A) y de las fracciones B (B) y F (C) por separado. En cuadrados negros se muestran los aislamientos caracterizados como B puro y en gris los aislamientos recombinantes. El soporte de *bootstrap* ($n=100$) de las ramas más relevante se muestran en fondo gris. El largo de las ramas es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas por sitio del alineamiento ($\text{bar}=0.1$ sustituciones).

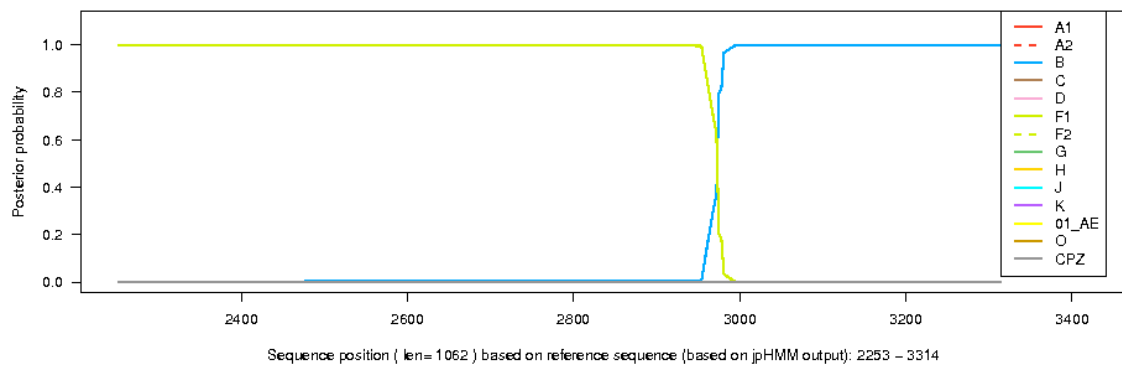
El análisis de recombinantes mostró que 5 de los 6 aislamientos recombinantes presentaban el mismo patrón, mientras las cepas identificadas como subtipo B no presentaron mosaicos recombinantes (Figura 4.8 A).

Debido a que los análisis filogenéticos no tienen en consideración los eventos de recombinación, se analizaron las relaciones filogenéticas de las fracciones recombinantes B y F por separado. El árbol realizado por Máxima Verosimilitud con la fracción B (Figura 4.7 B) no mostró relación entre las secuencias de HIV de Argentina, aunque el realizado con la fracción F (Figura 4.7 C) exhibió una relación filogenética entre las 5 secuencias locales con el mismo patrón recombinante (NR1, NR5, NR8, NR14 and NR15). Interesantemente, estos aislamientos fueron obtenidos de pacientes infectados con cepas del HCV-1a incluidas en el *Clado Argentino*.

A)



B)



C)

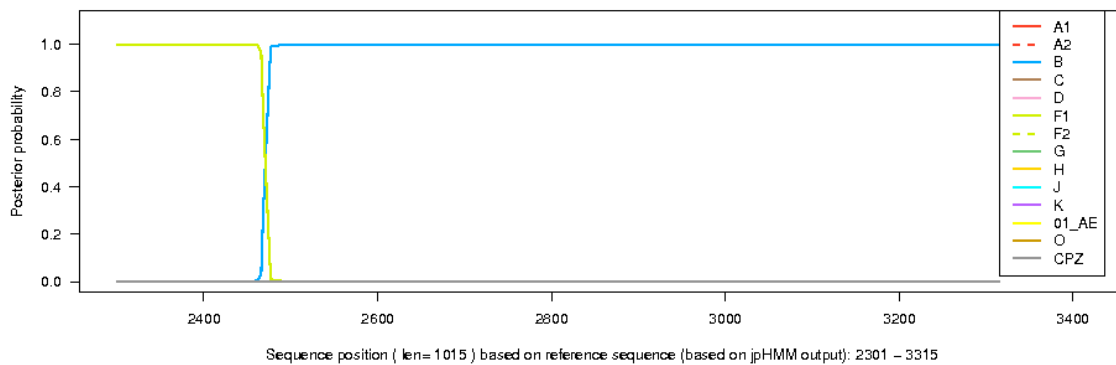


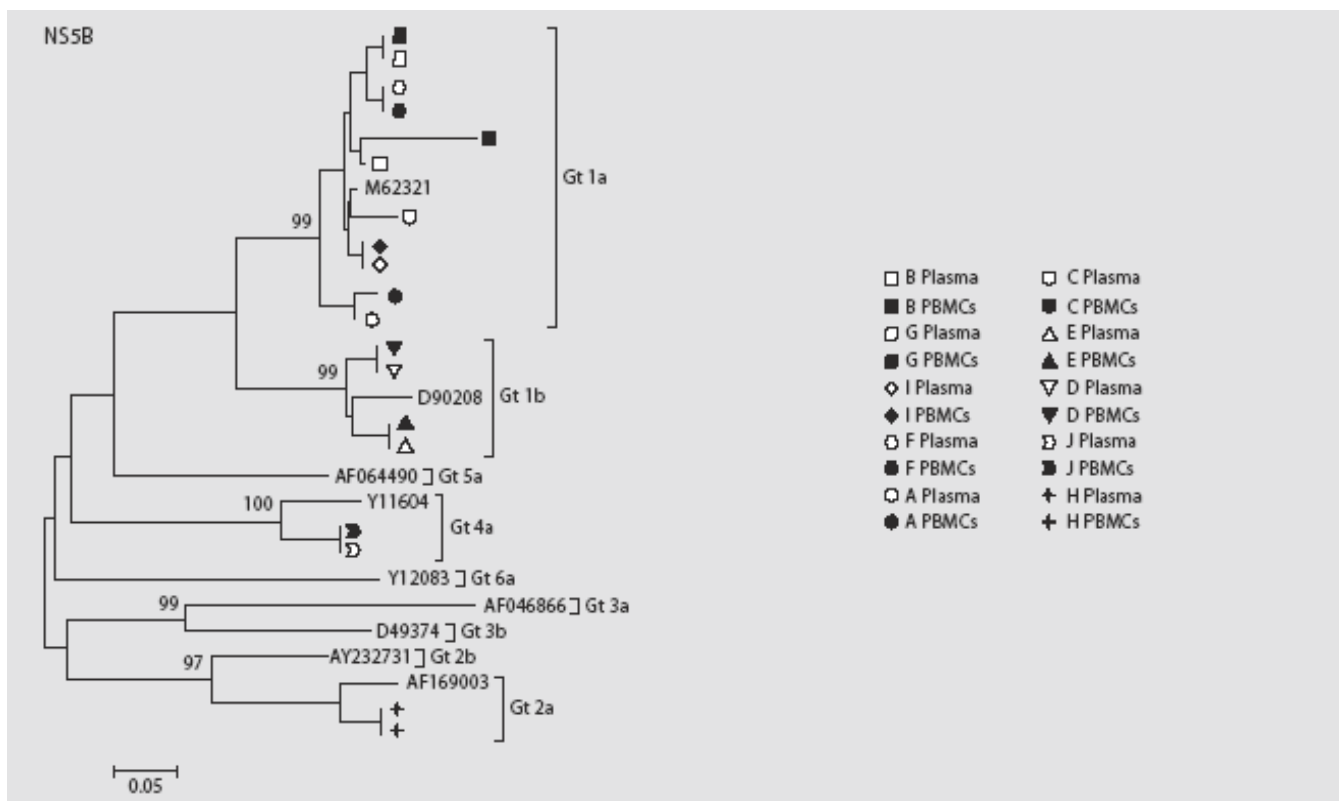
Figura 4.8: Gráficos representativos de los 3 patrones genómicos hallados para la región *pol* de HIV de los aislamientos B de NR2 y NR17 (A), NR1, NR8, NR12, NR14 y NR15 (B) y SVR4 (C). Los diferentes subtipos analizados se hallan representados en distintos colores.

4.4. Impacto de las mutaciones en regiones genómicas del HCV asociadas a resistencia antiviral como elemento pronóstico de respuesta sostenida a la terapia antiviral basada en el interferón

Para cumplir con este objetivo se estudiaron dos poblaciones de pacientes coinfectados con HIV. La primera de ellas surge de un trabajo en colaboración con el Centro de Ciencias para la Salud, en la Universidad de Texas, Houston, Estados Unidos, mientras que la segunda población procede de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y sus alrededores, en un trabajo en colaboración con el Hospital Juan A. Fernández de la ciudad de Buenos Aires.

Población bajo estudio (I)

En la población estudiada el genotipo más abundante en los pacientes coinfectados fue el 1, siendo el subtipo 1a el predominante. Entre los pacientes con RVS los genotipos hallados por RFLP fueron el Gt1 (n=3, incluyendo el 1a [n=1- y el 1b -n=2]) y el Gt4a (n=1). Los NR se hallaban infectados con Gt1a (n=5) y Gt2a (n=1). Por medio de inferencias filogenéticas de las tres regiones genómicas analizadas (E2, NS5A y NS5B) se confirmaron los genotipos del HCV, pudiéndose descartar así, un posible evento de recombinación. Para la región NS5A sólo pudieron amplificarse secuencias del genotipo 1 ya que los *primers* resultaron ser específicos únicamente para este genotipo. A su vez, los dos compartimentos en estudio, plasma y CMSP, presentaron el mismo genotipo, observándose una relación filogenética entre las secuencias de cada compartimento (Figura 4.9). Estas relaciones entre las secuencias obtenidas de plasma y de CMSP se mantuvieron en las tres regiones genómicas estudiadas, demostrando que las secuencias halladas en CMSP de un paciente se encuentran más cercanamente relacionadas a las halladas en plasma para un mismo paciente que a una secuencia de otro paciente.



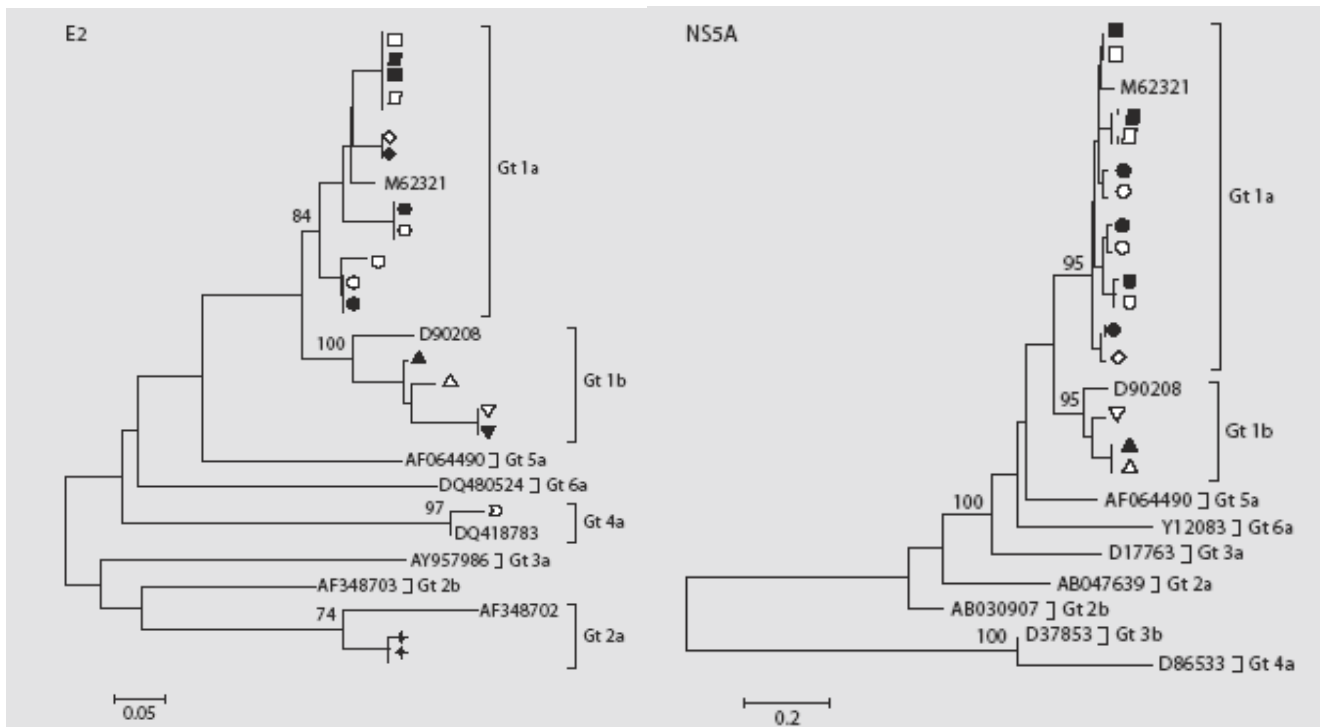


Figura 4.9: Árbol filogenético mediante el método de distancia *Neighbour Joining* de las secuencias de las regiones parciales del HCV E2, NS5A y NS5B de pacientes HIV coinfectados de la población I. Los largos de las ramas están dibujados a escala. Se incluyeron secuencias consenso de cada genotipo. Los valores de *bootstrap* se hallan representados como soporte de ramas luego de 1000 remuestreos. Cada símbolo (cuadrado, triangulo, rombo, circulo y estrella) corresponde a la muestra de plasma (blanco) y PBMCs (CMSP, en negro) de cada paciente.

En la tabla 4.8 se muestran las características basales de los pacientes y de los aislamientos del HCV mostrando además el número de mutaciones en el PePHD y el PKRBD. En general, el número total de mutaciones fue significativamente mayor en el PKRBD que en el PePHD ($p < 0.05$). Cada región por separado no presentó diferencias significativas en el número de mutaciones entre los grupos de pacientes RVS y NR ($p > 0.05$). Las tres regiones genómicas analizadas no mostraron diferencias en las secuencias obtenidas de las muestras de plasma y las de células de los mismos pacientes. A su vez, no se encontraron diferencias en el número de mutaciones determinadas para cada región en los dos compartimentos analizados, con lo cual, tampoco se halló asociación en el número de mutaciones en el ISDR, el PKRBD y el PePHD de las CMSP y la respuesta final al tratamiento (Figura 4.10).

De la misma manera, al comparar los promedios de carga viral del HCV, de HIV, de células CD4+ y CD8+ entre los pacientes NR y los RVS, no se hallaron diferencias entre ellos ($p>0.05$) (tabla 4.8).

Tabla 4.8: Características inmunológicas, virológicas (inherentes a HIV y HCV) y de respuesta a la terapia de las muestras basales de los pacientes, según el compartimiento.

Paciente	Compartimento	Genotipo	Nº de mutaciones en el PKRBD	Nº de mutaciones en el PePHD	Respuesta final al tratamiento	Carga viral de HCV Log copias/ml	Carga viral de HIV Log copias/ml	CD4	CD8
A	Plasma	1a	7	0	NR	>5.7	<2.6	462	849
	PBMC	1a	9	ND					
B	Plasma	1a	6	0	NR	>5.7	<2.6	491	766
	PBMC	1a	6	0					
C	Plasma	1a	8	0	NR	>5.7	<2.6	593	855
	PBMC	1a	8	ND					
D	Plasma	1b	2	0	SVR	>5.7	<2.6	511	4649
	PBMC	1b	ND	0					
E	Plasma	1b	6	0	SVR	>5.7	<2.6	547	ND
	PBMC	1b	6	0					
F	Plasma	1b	11	1	NR	5.6	<2.6	422	1258
	PBMC	1b	10	1					
G	Plasma	1a	10	0	SVR	5.6	<2.6	431	2167
	PBMC	1a	10	0					
H	Plasma	2a	ND	3	NR	5.2	<2.6	1449	ND
	PBMC	1a	ND	3					
I	Plasma	1a	6	0	NR	>5.7	<2.6	728	1381
	PBMC	1a	6	0					
J	Plasma	4a	ND	1	SVR	5.3	<2.6	550	1127
	PBMC	4a	ND	ND					

ND= no detectable

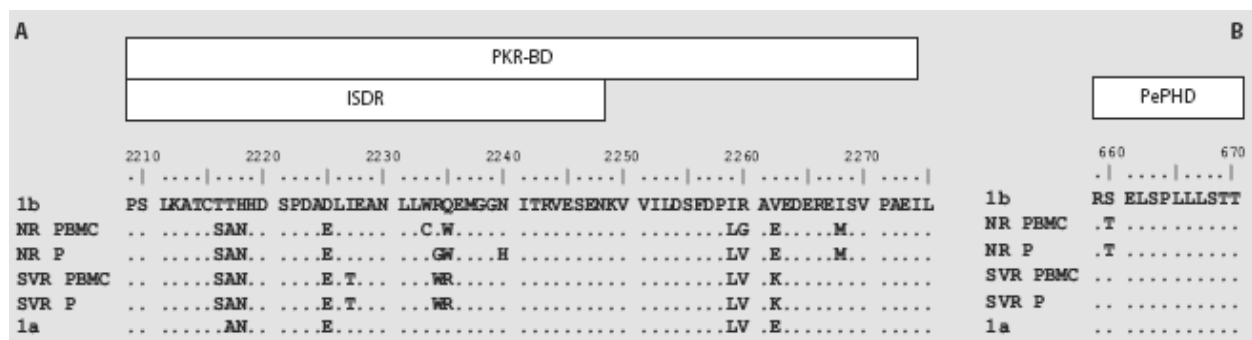


Figura 4.10: Secuencias parciales de aminoácidos de la proteína NS5A, incluyendo los dominios PRKBD y el ISDR (A) y de la región E2, incluyendo el PePHD (B) de dos pacientes representativos HCV1a-HIV coinfectados, uno con respuesta sostenida al tratamiento (SVR) y otro no respondedor (NR). Se hallan diferenciados los compartimentos de plasma (P) y de células mononucleares (PBMC). Se incluyeron dos secuencias prototipos como referencia los genotipos 1b (D90208) y 1a (M62321).

Población bajo estudio (II)

Debido a que el subtipo 1a del HCV es el de mayor frecuencia hallado en la población de pacientes HIV coinfectados de Argentina [178], y el más prevalente observado en la base de datos realizada en el punto 4.1, se planteó el estudio de mutaciones en NS5A y E2 de 19 pacientes antes del tratamiento con peg-IFN+RBV.

Las características basales y demográficas de los 19 pacientes estudiados se detallan en la tabla 4.9. No se hallaron diferencias significativas entre la respuesta final al tratamiento y la edad, el sexo, el peso, el grupo de riesgo y el recuento de células CD4 ($p>0.05$).

Tabla 4.9: Características basales y demográficas de los pacientes bajo estudio.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Peso (KG)	CD4 (Cel/ml)	CV-HCV (UI/ml)	Estado	Grupo de Riesgo	Nº mut ISDR	Nº mut PKRBD
1	M	47	73	400	482301	NR	IDU	2	2
2	M	37	77	522	1016630	NR	IDU	2	4
3	M	35	67	817	2395250	NR	IDU	1	3
4	M	39	76	414	405739	NR	IDU	2	3
5	M	42	83	130	2462780	NR	IDU	2	2
6	F	37	54	476	665641	SVR	IDU	2	3
7	M	33	64	479	49311	NR	IDU	1	3
8	M	33	72	376	1210710	NR	IDU	2	2
9	M	51	65	625	4597530	NR	HTS	0	0
10	M	40	75	303	727493	NR	IDU	1	1
11	F	38	50	644	949673	NR	IDU	2	2
12	M	35	60	860	1210020	NR	IDU	2	5
13	M	48	80	691	121912	SVR	HTS	5	7
14	M	41	80	329	148881	SVR	MSM	5	8
15	M	45	70	483	249421	NR	MSM	2	2
16	M	41	58	262	3385810	NR	MSM	2	2
17	M	42	81	957	266123	NR	IDU	3	4
18	M	45	65	989	57629	NR	MSM	4	5
19	M	42	95	ND	2372610	NR	IDU	2	2

IDU: Usuario de droga inyectable; MSM: Hombre que tiene sexo con hombre; HTS: Heterosexual

NR: no respondedor; SVR: respondedor

M:Masculino; F: Femenino

Se contó el número de aminoácidos en las secuencias correspondientes al ISDR y al PKRBD que diferían de la secuencia de referencia M62321. Se observó que los aislamientos virales del HCV de los pacientes que alcanzaban una respuesta viral sostenida presentaron un mayor número de sustituciones de aminoácidos en ambas regiones, siendo tal asociación estadísticamente significativa ($p<0.05$). En la figura 4.11 se

muestra el alineamiento de las 19 secuencias de NS5A obtenidas de los pacientes coinfectados.

Los aislamientos virales de los pacientes respondedores mostraron una media de 4 (DS=1,7) sustituciones de aminoácidos en la ISDR y 6 (DS=2,3) en el PKRBD, mientras que los pacientes no respondedores presentaron un promedio de 1,7 (DS=0,7) y 2,7 (DS=1,4) mutaciones respectivamente, hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,03$).

Mediante el uso de las curvas ROC se identificó que la presencia de 5 o más sustituciones aminoacídicas en el PKRBD tenían un 100% de valor predictivo positivo y un 94,1% de valor predictivo negativo de alcanzar una respuesta sostenida. En cuanto a las mutaciones en el ISDR, los mismos valores predictivos positivos y negativos fueron hallados cuando 4 o más sustituciones estuvieron presentes (Figura 4.12).



Figura 4.11: Secuencias aminoacídicas de las regiones ISDR y PKRBD de los 19 pacientes HIV-HCV coinfectados. Los pacientes 6, 13 y 14 resultaron con RVS, mientras que los pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 y 19 fueron NR. La secuencia de referencia M62321 se utilizó para comparar el número de mutaciones. La secuencia HCV-J (D90208) también se incluyó en el alineamiento.

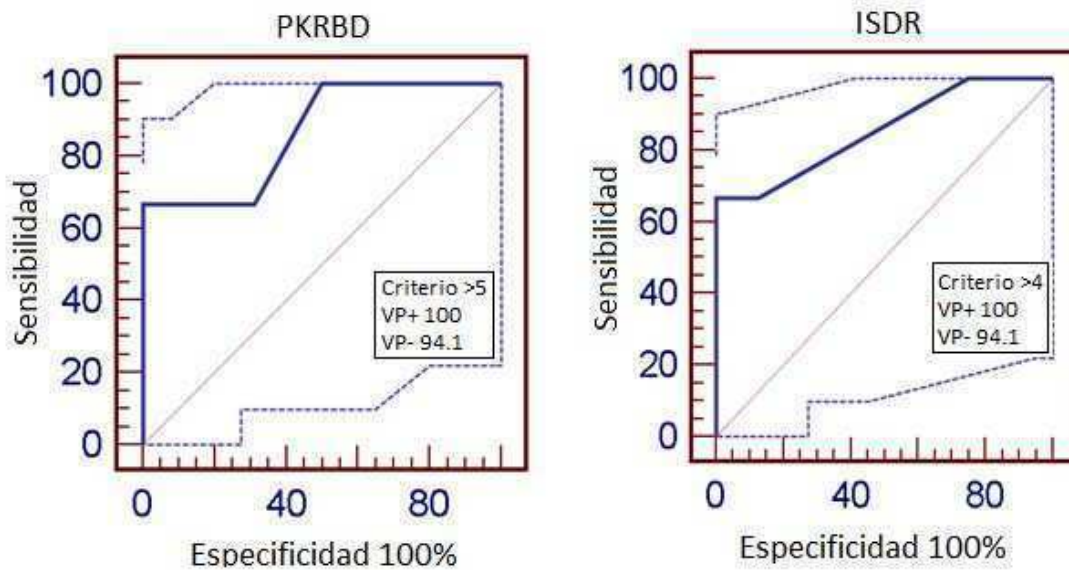


Figura 4.12: Curva ROC. Área bajo la curva del número de mutaciones en el PKRBD y el ISDR respectivamente antes del tratamiento con peg-IFN+RBN y su relación con la respuesta virológica. El criterio determina el número de mutaciones. VP+ =valor predictivo positivo; VP-= valor predictivo negativo.

A diferencia de lo hallado para NS5A, la glicoproteína de envoltura E2 del HCV no mostró diferencias aminoacídicas entre pacientes RVS y NR en el dominio PePHD (Figura 4.13) no hallándose asociación en el número de mutaciones y la respuesta al tratamiento ($p>0.05$). Se observó además, un alto grado de conservación del dominio entre los diferentes aislamientos de los pacientes bajo estudio, mientras que en las regiones flanqueantes se pueden apreciar variaciones entre las secuencias.

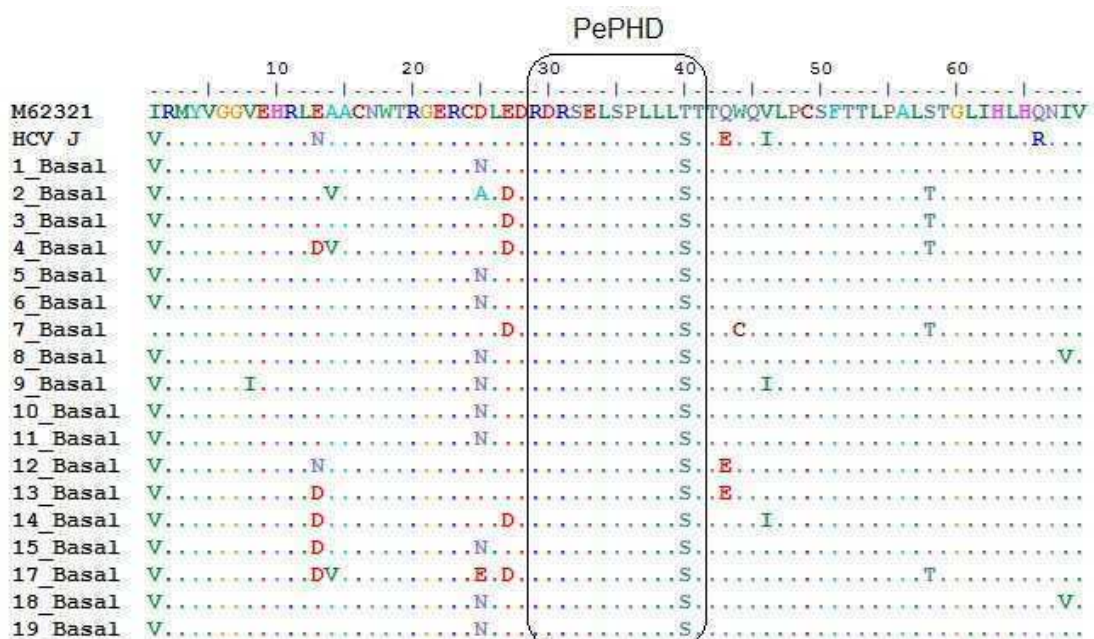


Figura 4.13: Secuencias aminoacídicas de la porción amplificada de la región E2 de los 19 pacientes HIV-HCV coinfectados. El dominio PePHD se halla encuadrado. Los pacientes 6, 13 y 14 resultaron ser RVS, mientras que los pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 y 19 fueron NR. La secuencia de referencia M62321 se utilizó para comparar el número de mutaciones. La secuencia HCV-J (D90208) también se incluyó en el alineamiento.

4.5. Evolución molecular del HCV y análisis de la compartimentalización durante el tratamiento con peg-IFN+RBV

Con el objetivo de analizar la evolución molecular del HCV-1a en pacientes con HIV durante la terapia con peg-IFN+RBV, se estudiaron antes y durante el tratamiento 11 pacientes infectados con el HCV-1a, no respondedores, coinfectados con HIV y se los comparó con un conjunto de pacientes HCV monoinfectados incluidos en estudios multicéntricos previamente publicados [180, 181].

Las características basales de los 11 pacientes HIV-HCV coinfectados de Argentina se detallan en la tabla 4.10.

Tabla 4.10: Características basales de los 11 pacientes HCV-HIV coinfectados

Paciente	Sexo	Edad (años)	Peso (Kg)	Grupo de Riesgo	ALT	CD4 (cel/ml)	Estado de Fibrosis	Años con HIV*	Años con HCV*
1	H	47	73	IDU	49	400	4	16	16
2	H	37	77	IDU	66	522	1	2	16
3	H	35	67	IDU	99	817	1	15	8
4	H	39	76	IDU	48	414	3	8	12
5	H	42	83	IDU	60	130	0	12	21
9	H	51	65	HTS	105	625	3	10	7
10	H	40	75	IDU	97	303	2	21	10
11	M	38	50	IDU	59	644	4	16	8
16	H	41	58	MSM	92	262	1	ND	ND
17	H	42	81	MSM	191	957	3	21	21
19	H	42	95	IDU	59	ND	2	5	12

*Estimado desde el diagnóstico serológico

IDU: Usuario de drogas inyectables; HTS: Heterosexual; MSM: Hombre que tiene sexo con hombres; H: Hombre; M: Mujer

Evolución del HCV basado en el análisis de secuencias de la región 5'UTR

Se estudiaron 3 regiones genómicas del HCV (5'UTR, E2 y NS5A) asociadas con la tasa de respuesta al tratamiento con peg-IFN+RBV en muestras de pacientes

coinfectados con HIV y se las comparó longitudinalmente con datos obtenidos de pacientes HCV mono infectados.

La región 5'UTR que contiene al IRES ha sido caracterizada como una de las regiones que favorece el escape a las acciones antivirales del IFN [189-191]. El estudio de esta región durante el tratamiento podría ayudar a identificar mutaciones adaptativas que favorezcan la resistencia. La figura 4.14 muestra una porción del fragmento amplificado para 5'UTR en donde se observa una alta conservación nucleotídica tanto dentro de un mismo paciente (antes y durante el tratamiento) como entre pacientes coinfectados con HIV. Al analizar secuencias de pacientes HCV mono infectados se observó el mismo resultado, una alta conservación nucleotídica entre pacientes y la misma secuencia nucleotídica antes y después del tratamiento con peg-IFN+RBV. Al comparar las secuencias nucleotídicas entre las dos poblaciones se divisaron diferencias en la posición 204, observándose una mayor proporción de citosina en pacientes HIV coinfectados, mientras que para los HCV mono infectados el nucleótido más prevalente fue la adenina (Figura 4.14).

Se estudiaron, además, mutaciones asociadas a la replicación facilitada en células linfocitarias [192]. De las tres mutaciones descritas, asociadas al linfotropismo, ninguna secuencia poseía las tres mutaciones concomitantemente; la mutación G107A no se halló en los aislamientos de pacientes HIV coinfectados ni HCV mono infectados. La mutación G243A se observó únicamente en 2 pacientes coinfectados (Figura 4.12).



Figura 4.15: Alineamiento nucleotídico de una fracción amplificada de la región 5'UTR de aislamientos del HCV de pacientes HIV coinfectados antes (Basal) y durante el tratamiento con peg-IFN+RBV (24hs, 4, 12 y/o 24 semanas) y de secuencias obtenidas de pacientes HCV mono infectados del estudio ViraHep antes y después del tratamiento. Se hallan recuadradas las 3 posiciones asociadas a linfotropismo. PT: post-tratamiento.

Evolución del HCV basado en el análisis de secuencias del gen E2

El seguimiento aminoacídico de E2 durante el tratamiento mostró que el dominio PePHD se mantuvo constante, con la misma composición aminoacídica. Además, al comparar las secuencias aminoacídicas entre pacientes se observó la misma secuencia, que a su vez, también se mantuvo entre los pacientes mono infectados (Figura 4.15).



Figura 4.15: Secuencias aminoacídicas de aislamientos del HCV de pacientes HIV coinfectados antes (Basal) y durante el tratamiento con peg-IFN+RBV (24hs, 4, 12 y/o 24 semanas) y de secuencias obtenidas de pacientes HCV mono infectados del estudio ViraHep antes y después del tratamiento. Se demarca el dominio PePHD. PT: post-tratamiento.

El análisis filogenético por Máxima Verosimilitud de las secuencias obtenidas durante el seguimiento mostró que las secuencias de cada paciente se hallaban más cercanamente relacionadas a secuencias del mismo paciente que a secuencias de otros pacientes, formándose así un clado filogenético para cada paciente (Figura 4.16). No se observaron diferencias filogenéticas entre los aislamientos de pacientes mono infectados y HIV coinfectados, infiriéndose que los aislamientos de pacientes mono infectados y coinfectados poseen un origen en común y no divergen en el tiempo.

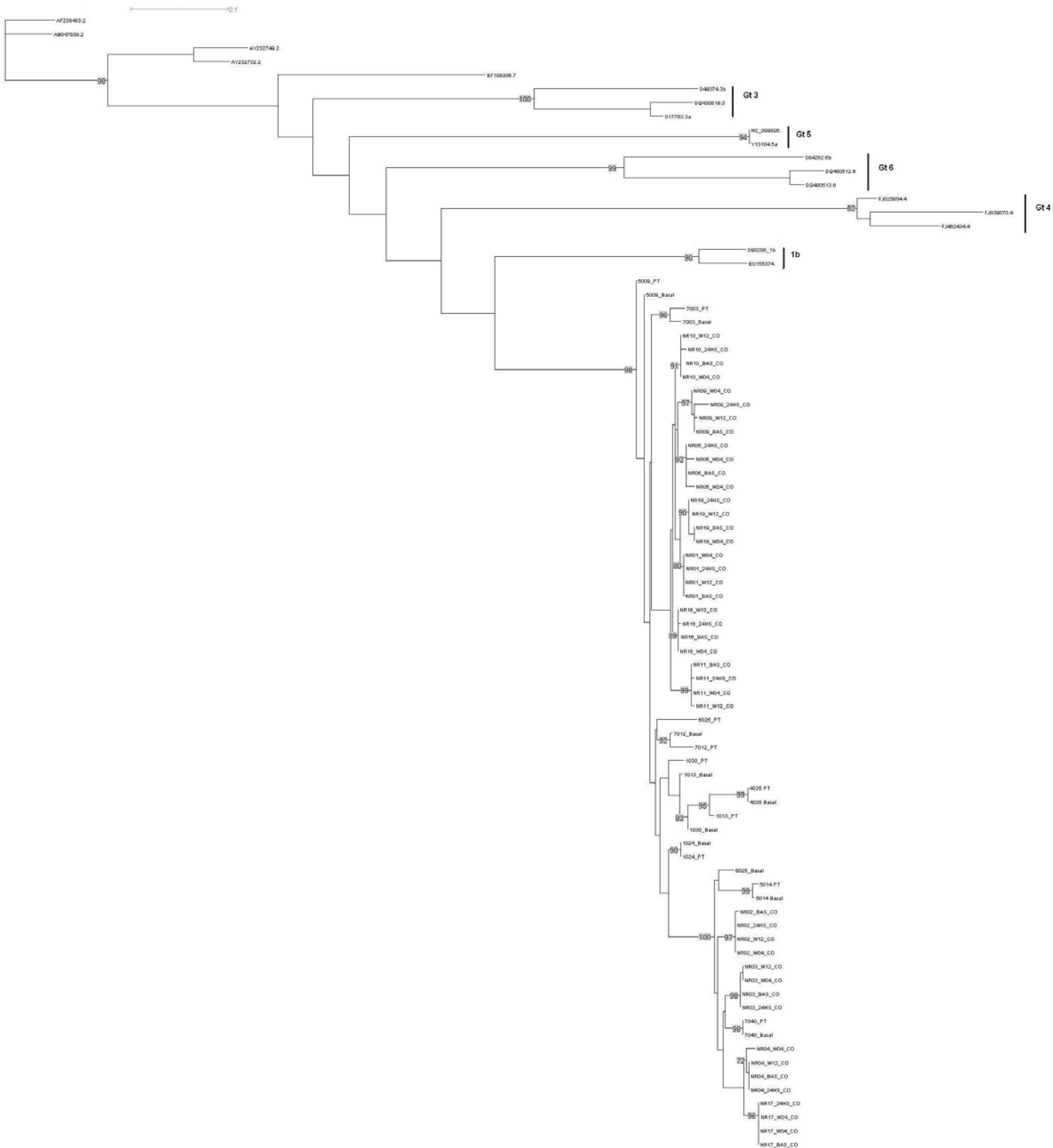


Figura 4.16: Árbol filogenético por Máxima Verosimilitud de secuencias nucleotídicas de la región E2. Se muestran los aislamientos de pacientes HIV coinfectados durante el seguimiento y de los pacientes HCV mono infectados previo y post tratamiento (PT). El soporte de *bootstrap* ($n=100$) de

las ramas más relevante se muestran en fondo gris. El largo de las ramas es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas por sitio del alineamiento (bar=0.1 sustituciones).

Evolución del HCV basado en el análisis de secuencias del gen NS5A

Las secuencias aminoacídicas de aislamientos del HCV de algunos pacientes dentro del PKRBD mostraron variaciones a lo largo del tratamiento, no uniformemente distribuidas entre los pacientes (Figura 4.17). Las secuencias aminoacídicas de aislamientos de cada paciente parecieran tener un patrón característico, tanto aquellos pacientes mono infectados como coinfectados. Este patrón se puede apreciar en el árbol filogenético por Máxima Verosimilitud en donde, al igual que con E2, se observa un clado independiente para cada paciente (Figura 4.18). De la misma manera que para E2, no se observa un clado diferencial que distinga entre los aislamientos de pacientes HCV mono infectados respecto a los HIV coinfectados.

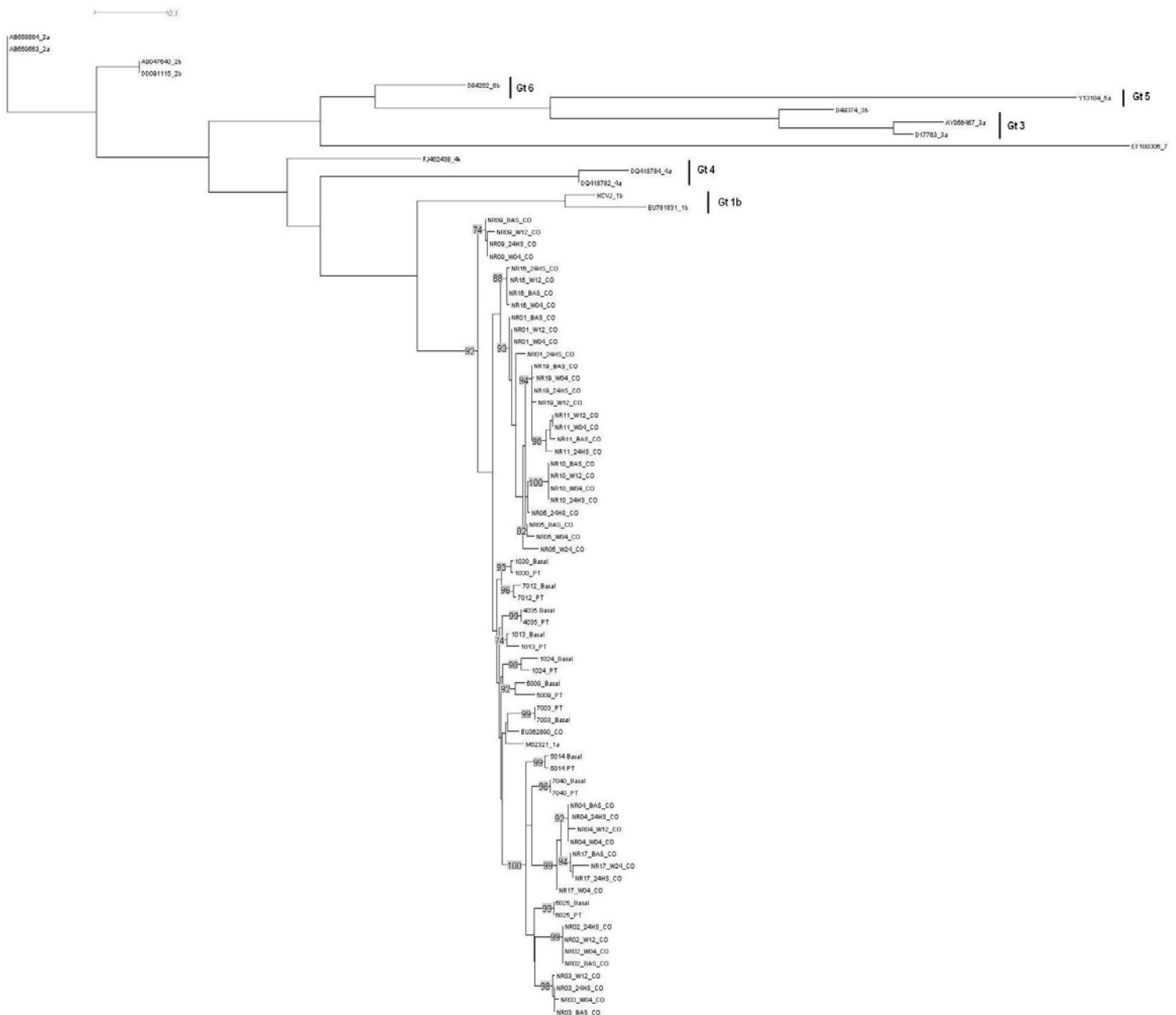


Figura 4.18: Árbol filogenético por Máxima Verosimilitud de secuencias nucleotídicas de la región NS5A. Se muestran los aislamientos de pacientes HIV coinfectados durante el seguimiento y de los pacientes HCV mono infectados previo y post tratamiento. El soporte de *bootstrap* ($n=100$) de las ramas más relevante se muestran en fondo gris. El largo de las ramas es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas por sitio del alineamiento (bar=0.1 sustituciones).

Utilizando las secuencias obtenidas de GenBank del estudio HALT-C [181] del seguimiento de NS5A durante el tratamiento con peg-IFN+RBV, se comparó el número de mutaciones en el PKRBD para cada tiempo (Figura 4.19). El número de mutaciones en el PKRBD, comparado con la secuencia de referencia M62321, de aislamientos de

pacientes HIV coinfectados es mayor que en pacientes HCV mono infectados y va aumentando a los largo del tratamiento, aunque en ningún caso las diferencias son estadísticamente significativas ($p>0.05$)

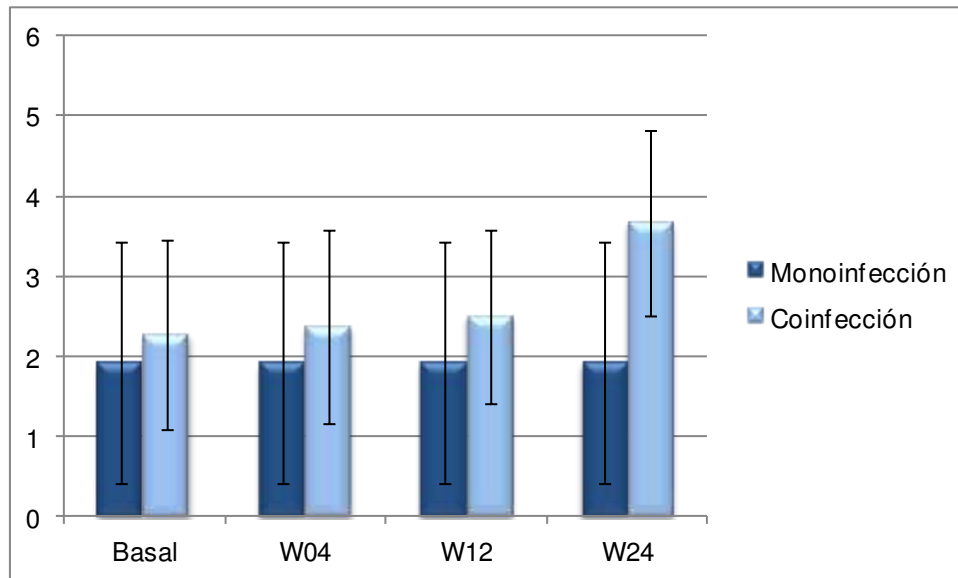


Figura 4.19: Número de mutaciones aminoacídicas promedio de cada tiempo de seguimiento en pacientes HIV coinfectados y en HCV mono infectados del estudio HALT-C.

Se calculó la *heterogeneidad* del HCV en base a la región NS5A en las muestras basales pre-tratamiento tanto para aislamientos de pacientes mono infectados de ambos estudios multicéntricos como de aislamientos de pacientes coinfectados. No se hallaron diferencias significativas en la heterogeneidad de pacientes HCV mono infectados y la de pacientes HIV coinfectados, aunque pareciera que en aquellos pacientes coinfectados con HIV la diversidad del HCV sería menor (Figura 4.20). No obstante, futuros estudios son necesarios para acceder a resultados más concluyentes.

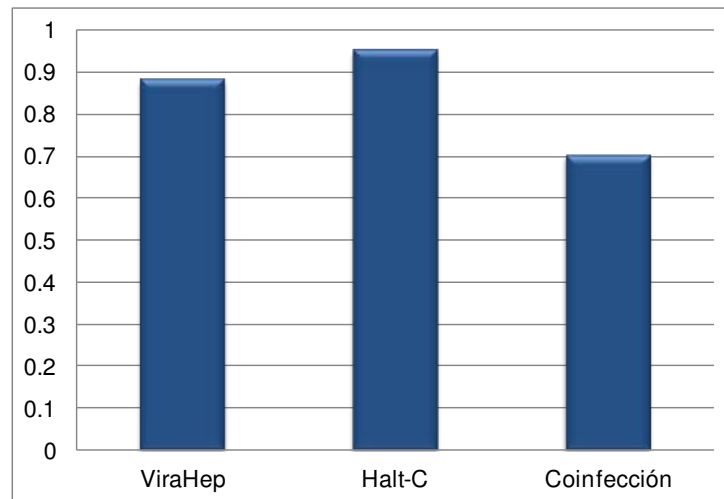


Figura 4.20: Heterogeneidad (como entropía de Shannon) de cuasiespecies del HCV basado en el análisis de secuencias genómicas del gen NS5A previa al tratamiento en pacientes HCV mono infectados de ambos estudios multicéntricos, ViraHep y HALT-C, y de pacientes coinfectados con HIV.

Relación entre el número de mutaciones en E2 y NS5A y los niveles de carga viral

De acuerdo con algunos autores [4, 193], y como se mencionó con anterioridad, el número de mutaciones en el dominio PKRBD de NS5A estaría asociado a la respuesta a la terapia basada en el interferón. El mismo razonamiento fue estudiado para el dominio PePHD de E2 [15, 194]. En secciones anteriores se estudió la relación entre el número de mutaciones en el PKRBD y el PePHD a tiempos basales y la respuesta final al tratamiento. En esta sección se analiza el número de mutaciones a lo largo del tratamiento antiviral con el fin de correlacionarlos con los niveles de carga viral de cada tiempo y analizar el punto en el que aparece una posible mutación de escape. A su vez, se analiza el número de mutaciones nucleotídicas en el IRES de la región 5'UTR, que también ha sido propuesta como una de las regiones que define la tasa de respuesta al IFN [189-191] (Figura 4.21).

Se puede ver que a lo largo del tratamiento antiviral el número de mutaciones en 5'UTR y el PePHD se mantiene constante mientras que para el PKRBD aumenta a medida que los valores de ARN plasmático disminuyen. Coincide ello con lo previamente publicado, en donde a mayor número de mutaciones en el PKRBD mayor probabilidad de respuesta a la terapia. Hay que destacar que los valores de caída de carga viral son menores a 2 logaritmos y que el promedio de mutaciones cae solo en 1, siendo necesarios más estudios para poder sacar conclusiones definitivas.

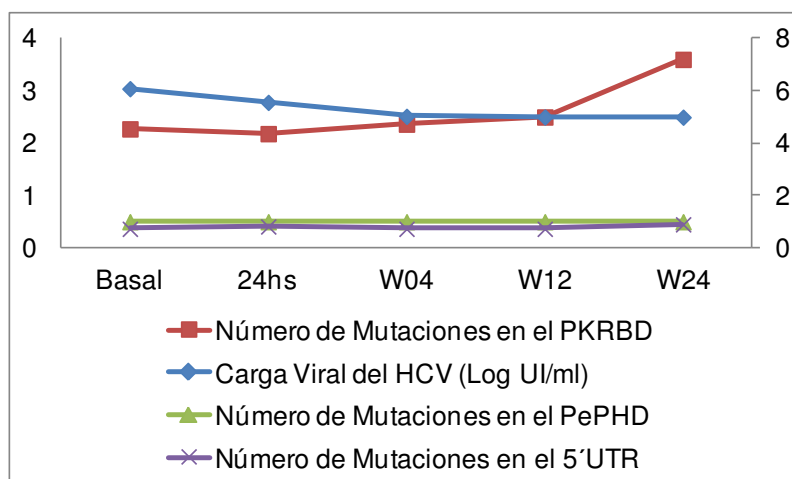


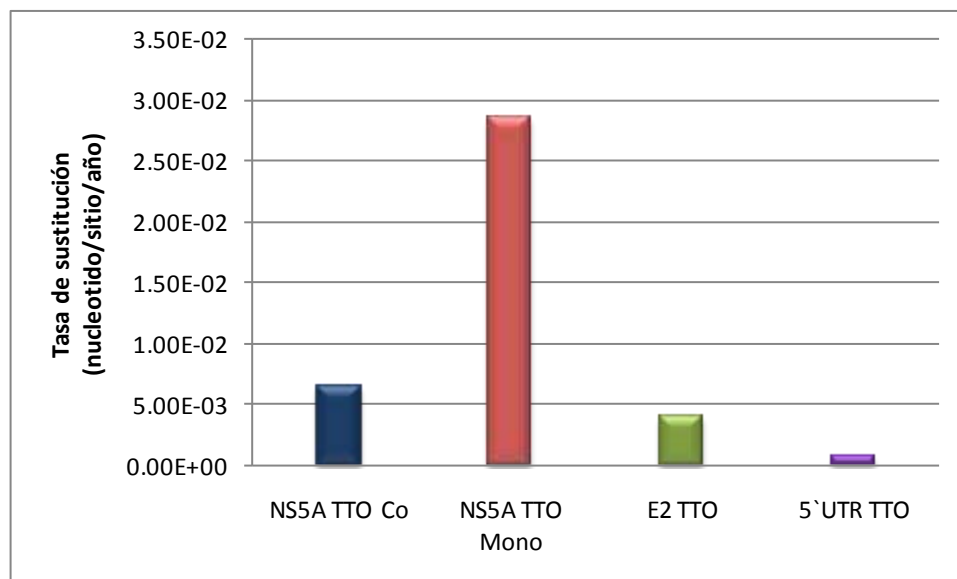
Figura 4.21: Correlación entre la carga viral del HCV previo y durante el tratamiento (Basal, 24hs, 4, 12 y 24 semanas) y el número de mutaciones de 5'UTR (violeta) y de los dominios PePHD de E2 (Verde) y PKRBD de NS5A (Rojo).

Tasas de sustitución del HCV

La figura 4.22 muestra la tasa de sustitución nucleotídica del HCV obtenido para cada región (5'UTR, E2 y NS5A) durante todo el tratamiento. A su vez, se compararon las tasas de sustitución de NS5A de los pacientes coinfectados con las de NS5A de los pacientes mono infectados del estudio HALT-C. En concordancia con los resultados anteriores, las tasas de sustitución durante el tratamiento desde 5'UTR exhibió los valores más bajos seguido de E2 y NS5A (Figura 4.22 A). Interesantemente, la tasa de sustitución más alta se observó durante el tratamiento de los pacientes HCV mono infectados.

Se determinó también la variación de las tasas de sustitución en cada punto del seguimiento, a tiempo basal, 24hs, 4 semanas y a fin de tratamiento (Figura 4.22 B). No se hallaron diferencias dentro de una misma región en los distintos puntos de seguimiento, aunque las diferencias entre las regiones estudiadas se mantienen.

A)



B)

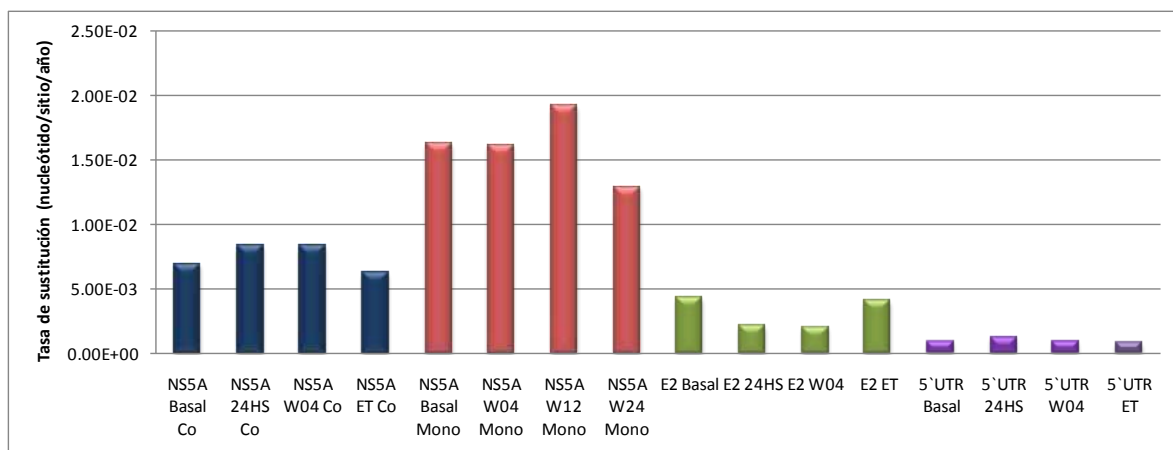


Figura 4.22: Tasas de sustitución del HCV basado en el análisis de las regiones 5'UTR (violeta), E2 (verde) y NS5A de pacientes coinfectados (azul) y mono infectados (rojo) durante todo el tratamiento (A) y a los tiempos previo al tratamiento (basal) y 24hs, 4 semanas (W04) 12 semanas (W12), 24 semanas (W24) de empezado el tratamiento y a fin del tratamiento (ET) (B). Las tasas se determinaron como sustitución por sitio por año. CO: coinfectado; Mono: mono infectado.

Compartimentalización del HCV

Ha sido publicado que el HCV puede infectar y replicar en células linfoides [137]. Por tal motivo se decidió estudiar las variantes del HCV en CMSP de aquellos 2 pacientes que presentaron mutaciones asociadas a linfotropismo en 5'UTR (Figura 4.14), como mecanismo de escape al tratamiento. Dada la alta conservación de la región E2 intra e

inter-pacientes, se resolvió no analizar esta región en este compartimento. Tanto la región 5'UTR como NS5A no mostraron diferencias a nivel nucleotídico ni aminoacídico, respectivamente, entre los distintos compartimentos (Figura 4.23). El tratamiento de los pacientes tampoco reflejó cambios en las secuencias obtenidas a partir de CMSP respecto de las obtenidas de plasma. Incluso, los cambios observados en la secuencia obtenida de plasma durante el tratamiento se observaron en la secuencia de CMSP (Figura 4.23 B).

A)

	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	
M62321	TTAGTATGAGTGTGTCGACGCTCCAGGACCCCGCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGAACCGGTGAGTACACCGGAAATGGCCAGGACGCCGGTCTCTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGCGTGCCCGCCGAAAGACTGCTAGCCGAGTACTGTTGGGTCGCGAAAGCCCTTGTGGTACTGCCTGAT																					
HCVJ 1bT.....G.....																					
NR02_BAS_COAT.....G.....																					
NR02_BAS_PPMCAT.....G.....																					
NR02_24HS_COAT.....G.....																					
NR02_24HS_PPMCAT.....G.....																					
NR02_W04_COAT.....G.....																					
NR02_W04_PPMCAT.....G.....																					
NR02_W12_COAT.....G.....																					
NR02_W12_PPMCAT.....G.....																					
NR11_BAS_COG.....																					
NR11_BAS_PPMCG.....																					
NR11_24HS_COG.....																					
NR11_24HS_PPMCG.....																					
NR11_W04_COG.....																					
NR11_W04_PPMCG.....																					
NR11_W12_COG.....																					
NR11_W12_PPMCG.....																					

B)

	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270
M62321_1a	PSLKATCTANEDSPDAELIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSYFDPLVAEEDEREISVPAEIL						
HCVJ 1bTH.....D.....IR.V.....						
NR02_BAS_CO	T		Q		V		V
NR02_BAS_PPMC	T		Q		V		V
NR02_24HS_CO	T		Q		V		V
NR02_24HS_PPMC	T		Q		V		V
NR02_W04_CO	T		Q		V		V
NR02_W04_PPMC	T		Q		V		V
NR02_W12_CO	T		Q		V		V
NR02_W12_PPMC	T		Q		V		V
NR11_BAS_CO	T		Q				
NR11_BAS_PPMC	T		Q				
NR11_24HS_CO	T		MQ				
NR11_24HS_PPMC	T		MQ				
NR11_W04_CO	T		Q				
NR11_W04_PPMC	T		Q				
NR11_W12_CO	T		Q				
NR11_W12_PPMC	T		Q				

Figura 4.23: Comparación de las secuencias obtenidas de aislamientos de plasma (CO) versus las obtenidos de CMSP (PBMC) antes y durante el tratamiento antiviral para dos pacientes en las regiones 5'UTR (A) y NS5A (B). La secuencia prototipo del subtipo 1a (M62321) se utilizó como referencia. También se incluyó la referencia 1b (D90208).

Selección positiva y negativa y, análisis de la heterogeneidad del HCV basado en las secuencias de NS5A durante el tratamiento

Dado que en los pacientes HIV-HCV coinfectados la región NS5A fue la más variable durante el seguimiento, se decidió clonar y analizar la selección positiva, negativa y la heterogeneidad de esta región en cada punto del seguimiento de cada paciente. No se observó selección positiva de variantes dentro del ISDR ni del PKRBD a lo largo de la terapia, aunque si se determinó selección negativa de algunos aminoácidos en modo limitado a algunos aislamientos del HCV (Figura 4.24).

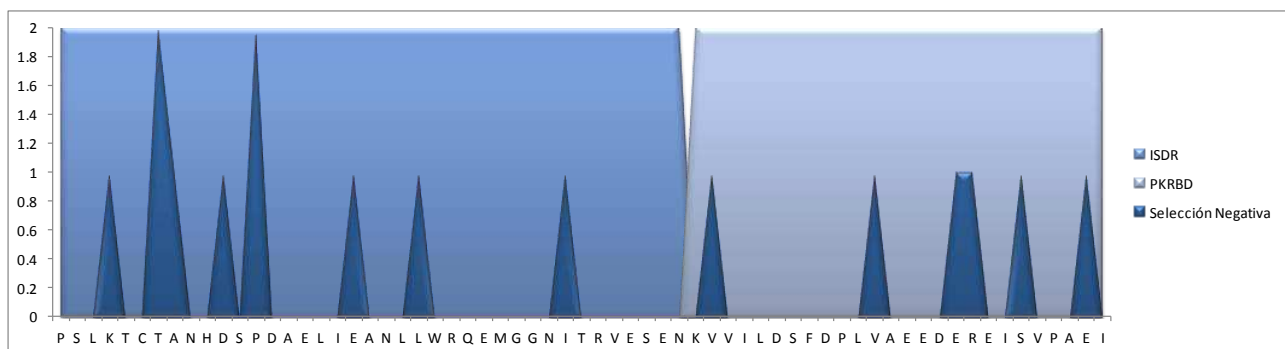


Figura 4.24: Selección negativa de aminoácidos durante el tratamiento con peg-IFN+RBV de los 11 pacientes HIV-HCV coinfectados. Se representa el número de pacientes que seleccionan negativamente un aminoácido en una determinada posición. Se destacan las regiones correspondientes al ISDR y al PKRBD.

Con el fin de estudiar la variación de las cuasiespecies del HCV en base a las secuencias de NS5A a lo largo del tratamiento se determinó la heterogeneidad para cada punto del seguimiento. En la figura 4.25 se muestra como varía la heterogeneidad en cada tiempo sin observarse diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

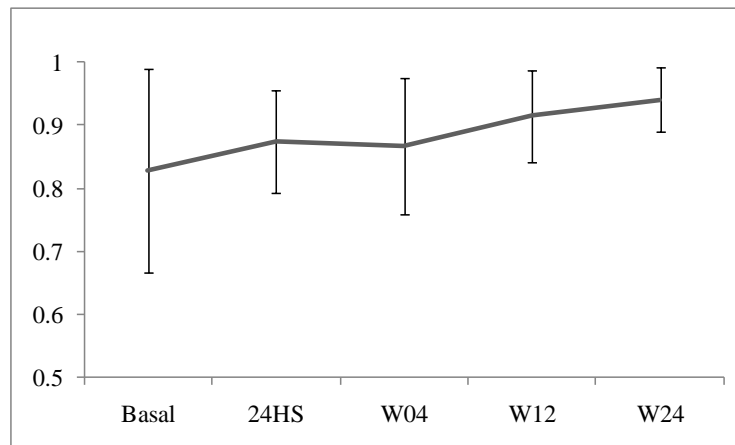


Figura 4.25: Heterogeneidad de cuasiespecies del HCV en base a las secuencias de NS5A de los pacientes no respondedores, determinada mediante la entropía de Shannon, antes (basal) del tratamiento y a las 24 horas (24HS), 4 semanas (W04), 12 semanas (W12) y 24 semanas (W24) de iniciado el mismo.

Conservación aminoacídica en la constitución de la glicoproteína E2-Análisis por UDPS

Dada la gran conservación aminoacídica del PePHD a lo largo del tratamiento irrespectivamente de la coexistencia de HIV, se decidió analizar las variaciones de las cuasiespecies del HCV basado en el análisis de este dominio mediante la técnica de pirosecuenciación ultra profunda, ya que por medio de este método se podrán analizar las secuencias minoritarias y la evolución de las mismas a lo largo del tratamiento. Para este análisis se analizó una población de 15 pacientes antes y durante (24hs, 4 y 12 semanas) la terapia con peg-IFN+RBV. De estos, 7 resultaron no respondedores (NR), 4 respondedores (RVS) y 4 recayeron a las 12 semanas de tratamiento (BT). En la tabla 4.11 se muestran las características basales y de laboratorio de los 15 pacientes sin hallarse diferencias significativas entre los promedios de edad, peso, niveles de CD4+ y carga viral de los tres grupos de pacientes estudiados ($p > 0.05$). Tampoco se halló asociación entre el género, el grupo de riesgo y la respuesta final al tratamiento ($p > 0.05$).

Tabla 4.11: Características demográficas y basales de laboratorio de los pacientes estudiados.

Paciente	Género	Edad (Años)	Peso (Kg)	Grupo de Riesgo	tgp (UI/ml)	CD4 (cel/ml)	Carga Viral HCV (copias/ml)	Estado de Fibrosis	Años con HIV*	Años con HCV*
BT1	H	35	60	IDU	51	860	1210020	ND	8	11
BT2	H	48	80	HTS	55	691	121912	3	ND	12
BT3	H	42	81	MSM	191	957	266123	3	21	21
BT4	H	33	72	IDU	124	376	1210710	2	5	5
NR1	H	40	75	IDU	97	303	727493	2	21	10
NR2	M	38	50	IDU	59	644	949673	4	16	8
NR3	H	41	58	MSM	92	262	3385810	1	ND	ND
NR4	H	42	95	IDU	59	ND	2372610	2	5	12
NR5	H	37	77	IDU	66	522	1016630	1	2	16
NR6	H	33	64	IDU	53	479	49311	4	3	13
NR7	H	51	65	HTS	105	625	4597530	3	10	7
SVR4	H	49	64	MSM	36	300	5296140	ND	25	25
SVR1	M	37	54	HTS	29	476	665641	0	6	15
SVR2	H	41	80	HTS	145	329	148881	ND	12	12
SVR3	H	34	67	IDU	41	1448	5506420	ND	25	25

BT: Relapser; NR: No respondedor; SVR; Respondedor; H: Hombre; M: Mujer

IDU: Usuario de drogas inyectables; MSM; Hombres que tienen sexo con hombres; HTS: Heterosexual

ND: No determinado

*Estimado desde el diagnóstico serológico

Se compararon las secuencias aminoacídicas parciales de la glicoproteína E2 obtenidas por secuenciación directa de cada grupo de pacientes antes y durante el tratamiento, observándose una alta conservación, independientemente del grupo analizado. No se observan cambios aminoacídicos en el PePHD ni en las regiones flanqueantes, en un mismo paciente, durante el tratamiento con peg-IFN+RBV.

Al igual que en las secuencias de la región E2 previamente analizadas, en las regiones flanqueantes al PePHD se observó un motivo aminoacídico característico de cada paciente (Figura 4.26). Tal fenómeno se advierte al visualizar el árbol filogenético por Máxima Verosimilitud (Figura 4.27). Las secuencias de cada paciente forman un clado diferencial con un origen monofilético, observándose una distribución de secuencias independiente de la respuesta alcanzada frente al tratamiento.

En la tabla 4.12 se muestran los tiempos de estudio de cada paciente dentro de cada grupo. Se analizaron tiempos previos al tratamiento (Basal), a las 24hs, 4 y 12 semanas de haber iniciado con el mismo.

Tabla 4.12: Carga viral y viremia cualitativa del HCV para cada tiempo de estudio para cada paciente de los tres grupos bajos estudio según respuesta frente a la terapia.

	Basal		24hs		W04		W12	
	CV-HCV (Log IU/ml)	PCR	CV-HCV (Log IU/ml)	PCR	CV-HCV (Log IU/ml)	PCR	CV-HCV (Log IU/ml)	PCR
BT1	6.14	POS	4.61	POS	<3.5	NEG	6.60	POS
BT2	6.80	POS	5.25	POS	<3.5	NEG	6.00	POS
BT3	6.24	POS	5.94	POS	<3.5	NEG	6.69	POS
BT4	7.44	POS	5.18	POS	<3.5	NEG	7.32	POS
SVR1	6.54	POS	5.64	POS	<3,5	POS	<3.5	NEG
SVR2	7.46	POS	6.12	POS	4.99	POS	<3.5	NEG
SVR3	5.89	POS	<3.5	NEG	<3.5	NEG	<3.5	NEG
SVR4	5.80	POS	<3.5	NEG	<3.5	NEG	<3.5	NEG
NR1	7.11	POS	6.62	POS	5.32	POS	5.97	POS
NR2	6.58	POS	6.47	POS	6.21	POS	5.95	POS
NR3	7.09	POS	6.98	POS	6.60	POS	6.38	POS
NR4	7.38	POS	6.84	POS	6.62	POS	5.86	POS
NR5	7.25	POS	6.16	POS	5.80	POS	5.93	POS
NR6	6.69	POS	6.53	POS	5.45	POS	4.47	POS
NR7	6.70	POS	5.80	POS	5.91	POS	6.23	POS

SVR: Respondedor; BT: Relapser; NR: No respondedor

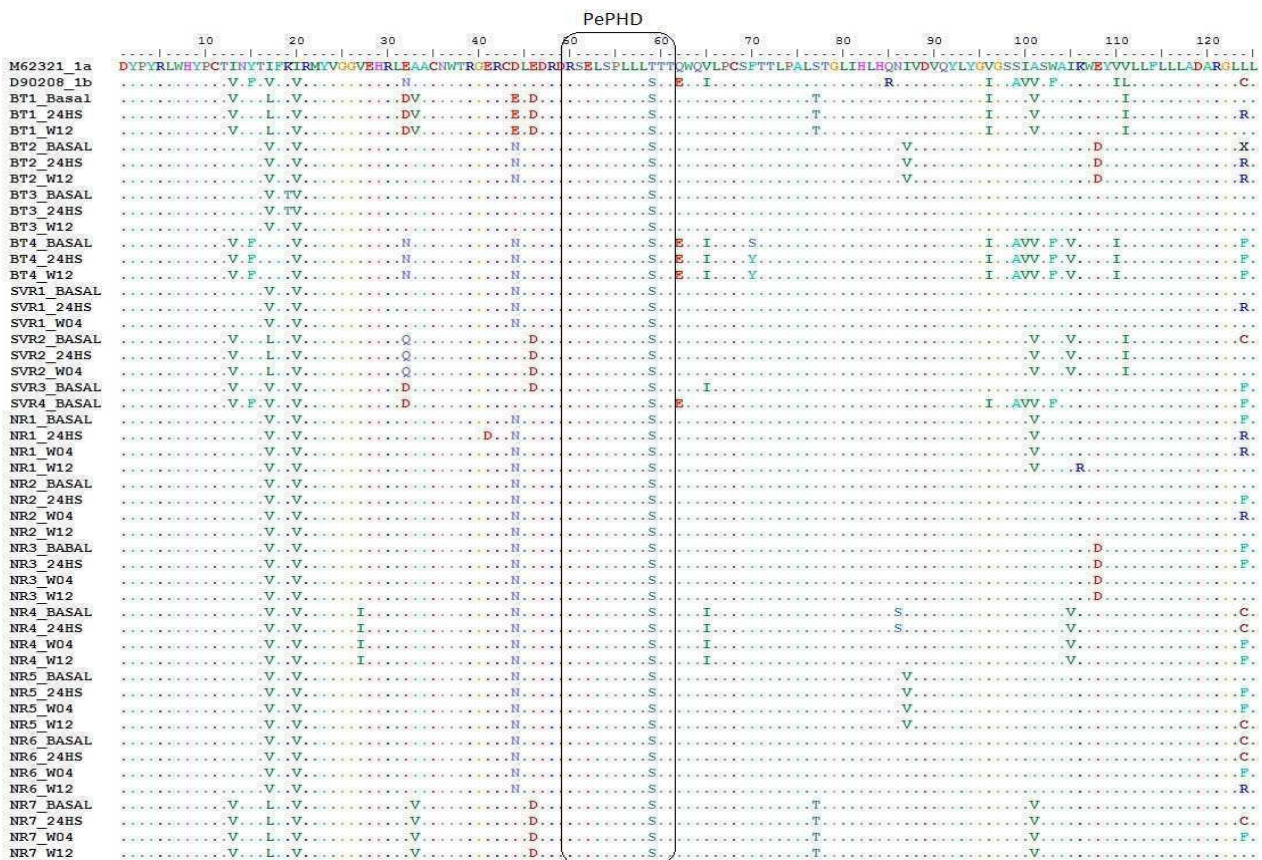


Figura 4.26: Secuencias aminoacídicas directas de la región amplificada para cada tiempo analizado de cada paciente. Se remarca el dominio PePHD. Secuencias prototipo 1a (M62321) y 1b (D90208) fueron utilizadas como secuencias de referencia.

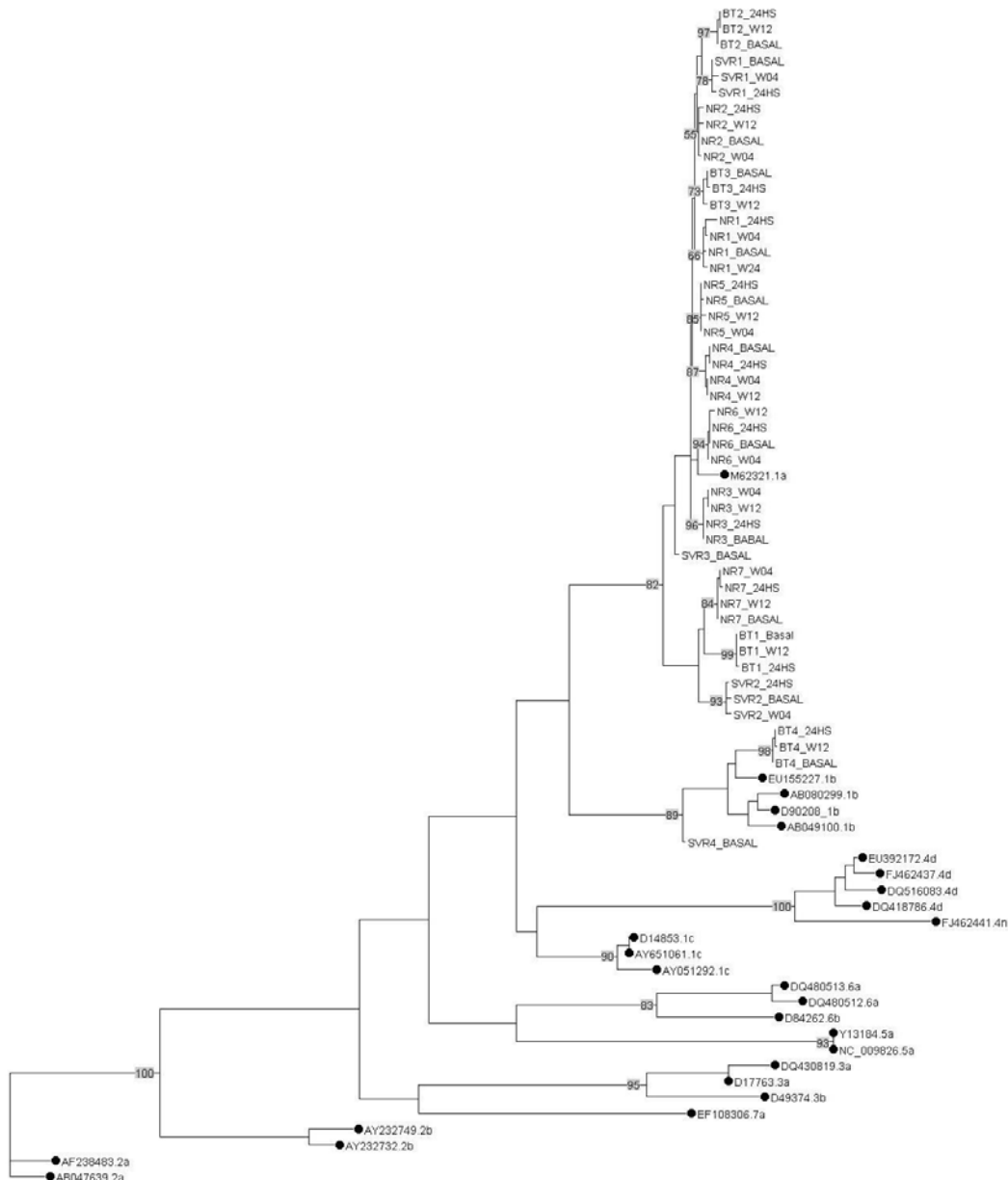


Figura 4.27: Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud a partir de las secuencias directas del gen E2 del HCV de los aislamientos de cada paciente a los diferentes tiempos del seguimiento. Secuencias de diferentes genotipos y subtipos se denotan con puntos negros. El soporte de *bootstrap* ($n=100$) de las ramas más relevante se muestran en fondo gris.

Al analizar la tasa de conservación aminoacídica en el PePHD del total de las secuencias analizadas (39.364 secuencias) se observó que los aminoácidos de cada posición se conservaban aproximadamente en un 99% (Tabla 4.13). Interesantemente, la tasa de conservación de cada posición se mantuvo constante a lo largo del tratamiento

con peg-IFN+RBV, y no se observaron diferencias entre los aislamientos de los diferentes grupos de respuestas estudiadas ($p>0.05$).

Tabla 4.13: Tasa de conservación de cada aminoácido del PePHD para cada tiempo de cada grupo. Se analizaron un promedio de 872 secuencias por paciente y un total de 39364 secuencias.

PePHD	Todas las secuencias (n=15)	SVR (n=4)			BT (n=4)			NR (n=7)			
		Basal (n=4)	24hs (n=2)	W04 (n=2)	Basal (n=4)	24hs (n=4)	W12 (n=4)	Basal (n=7)	24hs (n=7)	W04 (n=7)	W12 (n=7)
R	99.6	99.5	99.3	99.6	99.7	99.6	99.7	99.4	99.6	99.5	99.3
S	99.6	99.4	99.1	99.7	99.8	99.8	99.6	99.6	99.5	99.2	99.6
E	99.7	99.5	99.3	99.7	99.6	99.7	99.6	99.6	99.5	99.4	99.6
L	99.8	99.6	99.2	99.9	99.6	99.8	99.1	99.7	99.5	99.7	99.7
S	99.6	99.4	99.3	99.9	99.5	99.4	99.3	99.4	99.4	99.5	99.6
P	99.8	99.5	99.1	99.7	99.9	99.8	99.9	99.7	99.7	99.7	99.7
L	99.7	99.3	99.5	99.5	99.7	99.7	99.9	99.6	99.6	99.7	99.6
L	99.4	99.5	99.0	99.5	99.5	99.4	98.9	99.7	99.5	99.7	99.5
L	99.7	99.1	99.4	98.8	99.7	99.7	99.1	99.6	99.5	99.6	99.6
S	99.4	99.8	98.8	99.2	99.8	99.6	99.0	99.7	99.4	99.4	99.2
T	99.6	99.4	99.4	99.9	99.6	99.6	99.5	99.6	99.4	99.3	99.5
T	99.5	99.3	99.5	99.4	99.4	99.7	99.6	99.3	99.4	99.4	99.6

SVR: Respondedor; BT: Relapser; NR: No respondedor

n: Número de pacientes analizados

5. DISCUSIÓN

5. Discusión

La hepatitis C es una enfermedad curable [64]. Hoy en día, el tratamiento con interferón pegilado combinado con el análogo de nucleósido ribavirina, es el único tratamiento aprobado para tratar tanto a pacientes HCV monoinfectados como coinfectados con HIV. Sin embargo, las tasas de respuesta son sub-óptimas, observándose una respuesta virológica sostenida de un 36% para los genotipos 1 y 4 y, un 43-73% para los genotipos 2 y 3 [47]. El costo económico de esta terapia es una de las barreras principales para acceder al tratamiento en países en vías de desarrollo. El cumplimiento del tratamiento y la aparición de efectos adversos son cruciales para el éxito de la terapia. Los efectos secundarios más comunes del interferón/ribavirina son malestar general, fiebre, mialgias, dolor de cabeza, alteración del estado de ánimo (depresión, ansiedad) y hemólisis de glóbulos rojos [64]; que llevan a discontinuar la terapia en un 15-25% de los pacientes [65]. Es, por lo tanto, imperioso el estudio de factores pronósticos de respuesta al tratamiento que permitan estimar el resultado de la terapia y en base a ello, estipular el tiempo de tratamiento redundará en mejorar la calidad de vida del paciente así como disminuir los costos del tratamiento.

5.1. Distribución de genotipos del HCV en pacientes infectados por HIV. Relación con los niveles de carga viral plasmática

Desde 1996, el HAART ha permitido revertir la inmunodeficiencia en la mayoría de los individuos infectados por el HIV y ha disminuido drásticamente la incidencia de enfermedades oportunistas [195]. Como consecuencia, otras enfermedades hasta entonces poco relevantes, como las hepatitis crónicas virales, han tomado mayor relevancia. Debido a ello, el tratamiento de la hepatitis crónica C en los pacientes con HIV es una prioridad por dos motivos fundamentales. Primero, por la más rápida progresión a cirrosis; segundo, por la tolerancia disminuida y el mayor riesgo de hepatotoxicidad de los antirretrovirales en presencia de hepatitis crónica C [196].

Dado que los diferentes genotipos del HCV responden diferente al tratamiento con IFN, modificando así la duración de la terapia, y teniendo en cuenta los efectos adversos y lo oneroso del mismo [47, 60, 67], el conocimiento del genotipo a la hora de tratar al paciente es de suma importancia como factor pronóstico.

Los resultados de esta sección permiten ampliar y sostener los conocimientos sobre la epidemiología molecular del HCV ante la coinfección con HIV que fueran recientemente reportados [178]. Aún sin evidenciar diferencias significativas en la

eficiencia replicativa de los distintos genotipos evaluada a partir los niveles de carga viral, persiste la elevada prevalencia de los genotipos 1a y 3a, con menor aporte de los genotipos 1b y 2. Estos resultados remarcan las diferencias respecto de la distribución de genotipos hallada en pacientes mono infectados por HCV, en donde el subtipo más frecuente es el 1b [40]. Ha sido reportado que el subtipo 1a del HCV está sustituyendo al subtipo 1b a lo largo de los últimos 30 años [197].

El genotipo 4 ha sido previamente reportado con baja frecuencia en Argentina en pacientes con HIV [178], con lo cual era esperable la baja prevalencia hallada en esta cohorte aunque reportes recientes hablan de un aumento de este genotipo a nivel mundial [198-201].

No obstante, es necesario considerar que el mayor aporte de datos sobre la epidemiología molecular del HCV a nivel mundial proviene de estudios realizados en pacientes mono infectados con HCV; ante ello, la coexistencia en el mismo hospedador del HIV plantea la posibilidad que el subtipo 1a del HCV se vea favorecido por factores inherentes al hospedador (ruta de infección) y/o a posibles interacciones sinérgicas entre los dos virus.

5.2. Epidemiología molecular del HCV genotipo 4

El escenario del genotipo 4 del HCV es comparable a múltiples epidemias importadas en donde no hay evidencias de una red o clado de transmisión.

A diferencia de la sección anterior, en la cohorte analizada en este tópico, el HCV-4 se halló en una frecuencia mayor a la esperada, observándose un aumento en la prevalencia de este genotipo en pacientes HIV positivos de Argentina. Es de importancia mencionar que ambos estudios se realizaron en períodos de tiempo separados por 1 año y que en la cohorte aquí discutida no se incluyeron pacientes de la cohorte anterior, salvo aquellos infectados por el HCV genotipo 4 incorporados únicamente para los análisis de filogenia molecular.

En general, los datos de la prevalencia del genotipo 4 del HCV, junto con la comparación filogenética (y su acercamiento con las cepas del HCV-4 previamente reportadas en Argentina) sugiere que el HCV-4 no representa una introducción reciente en el país, que circula en todos los grupos de transmisión y que su presencia es cada vez mayor entre los pacientes infectados con HIV. Estos hechos se contraponen a la hipótesis que todas las cepas del HCV-4 tuvieran una fuente común.

Es preciso destacar que las distintas variantes del HCV-4 halladas en Argentina no presenta una ruta común de infección como fue previamente reportado en España [202] o, asociado a un perfil epidemiológico particular [198-201]. Sin embargo, considerando el reducido número de pacientes infectados con HCV-4 estudiados en este punto, la estimación de una red de infección puede verse obstaculizada.

Los diferentes subtipos del HCV-4 son variados entre los pacientes coinfectados con HIV, siendo el subtipo 4d el predominante. Las secuencias de los subtipos 4d, 4a y 4m obtenidas de pacientes HIV coinfectados no formaron un clado dentro de cada subtipo, lo que indicaría que estas cepas no poseen un origen en común. No obstante, el escaso número de pacientes incluidos dentro de cada subtipo posterga la posibilidad de alcanzar conclusiones definitivas.

La coexistencia de diversos subtipos de este genotipo fue descrita en regiones geográficas con una elevada prevalencia de infecciones con el HCV-4, como en el Medio Oriente y el norte y centro de África [203]. En Europa, la prevalencia del HCV-4 ha ido incrementándose en los últimos años debido a la inmigración de personas infectadas con este genotipo [198-201]. En América Latina la información sobre la prevalencia del HCV-4 y de los diferentes subtipos circulantes es todavía escasa. Los grupos filogenéticos de las secuencias de Argentina del HCV-4 parecerían tener un nexo con el HIV dado que las vías de transmisión más frecuentemente asociadas fueron el uso de drogas inyectables y los hombres que tienen sexo con hombres.

El genotipo 4 del HCV, junto con el 1, son lo que presentan tasas más bajas de respuesta al tratamiento antiviral. El genotipo 1 es el más prevalente en Argentina, tanto en pacientes HCV mono infectados como en HIV coinfectados y el genotipo 4 está incrementando su frecuencia en pacientes con HIV. Dado que las tasas de respuesta al tratamiento del HCV son aún menores en pacientes con HIV, conocer la prevalencia de los genotipos y los grupos de riesgo asociados, es de suma importancia.

Los hallazgos aquí presentados pueden ser útiles para la planificación de un control de las infecciones por el HCV en Argentina, en donde se reportó una baja prevalencia del HCV-4 hasta el momento. La detección y caracterización del genotipo 4 merecen una atención especial.

5.3. Epidemiología molecular del HCV genotipo 1a

En Argentina entre otros países del mundo, el genotipo 1 es el más abundante tanto para pacientes HCV mono infectados como en HIV coinfectados, siendo el subtipo 1b el más predominante en los primeros y el 1a en pacientes coinfectados con HIV. Para este objetivo particular se estudió una población de 25 pacientes HIV-HCV coinfectados de Argentina con el fin de determinar relaciones filogenéticas y filodinámicas entre las cepas del HCV-1a, basadas en las secuencias directas de las regiones codificantes para las proteínas E2 y NS5A.

Las relaciones filogenéticas mostraron evidencias de un clado bien definido de secuencias de Argentina (*Clado Argentino*) exhibiendo un origen monofilético. Este fenómeno de “clustering” ha sido previamente reportado en Argentina con secuencias de pacientes HCV mono infectados con el subtipo 1b. Interesantemente, y de forma contraria a lo que ocurrió en nuestro estudio, Di Lello y colaboradores [204], encontraron una asociación estadística entre el clado monofilético y la respuesta al tratamiento con peg-IFN+RBV. Por otro lado, y en concordancia con los puntos anteriores, no se hallaron diferencias en las características basales y demográficas de los respondedores y no respondedores al tratamiento.

La distribución de las cepas del HCV-1a no mostró asociación con la vía de transmisión, el tiempo de extracción o la respuesta final del tratamiento, aunque considerando la cantidad de aislamientos de pacientes respondedores, se impone incrementar el tamaño de la muestra para sacar conclusiones finales al respecto. Este escenario podría cambiar cuando un mayor número de datos y de secuencias sean analizados.

No se hallaron diferencias significativas entre la edad, el sexo, el valor de carga viral plasmática y los valores de células CD4+ entre los diferentes grupos de pacientes, indicando que el “clustering” estaría involucrado únicamente con la cepa viral que dio origen a la infección en cada paciente y no con el estado inmune, o características de los pacientes.

La aparición del *Clado Argentino* del HCV-1a en pacientes coinfectados con HIV podría resultar del efecto fundador de una cepa inusual y de su diversificación de un nuevo linaje dentro del subtipo 1a del HCV circulante en Argentina.

Las secuencias del HCV-1a incluidas dentro del *Clado Argentino* presentaron un patrón aminoacídico característico con diferencias en 10 posiciones (4 en E2 y 6 en NS5A) con respecto a las *Otras Secuencias Argentinas*. Estas diferencias se localizaron dentro de los dominios que podrían influenciar la tasa de respuesta al tratamiento (PePHD

de E2 y PKRBD de NS5A). Ello podría tener relación con la baja tasa de respuesta al tratamiento observada en los pacientes coinfectados con HIV [205, 206]. Esta diferencia aminoacídica también tuvo impacto en la unión de las moléculas de CMH-I a los péptidos del HCV, lo que podría favorecer el escape a la vigilancia inmune en otras regiones como fuerza de selección en la divergencia de los genotipos del HCV [207-209].

El análisis filodinámico de los aislamientos del HCV-1a de Argentina mostró diferentes estadios temporales. Aquellos incluidos dentro del *Clado Argentino* surgieron recientemente y el tMRCA fue estimado alrededor de 1990 con valores de HPD 95% entre el principio de los años '70 y comienzo del 2000. Estos resultados de tiempo de ancestro común y de densidad posterior concuerdan con resultados previamente publicados sobre el origen del HCV [203, 210-212]. Recientemente fue reportado que el subtipo recombinante BF de HIV apareció en Sud América en los años '70 [162, 213, 214]. Considerando que todas las secuencias de HIV obtenidas de aislamientos de pacientes con HCV-1a incluidos dentro del *Clado Argentino* fueron caracterizadas como recombinantes BF, exhibiendo además el mismo patrón recombinante, es tangible sugerir que el origen de este *Clado Argentino* del HCV está íntimamente relacionado al origen del subtipo BF de HIV en América del Sur.

De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer estudio en analizar de manera simultánea la filodinamia del HCV y el HIV coexistiendo en un mismo hospedador.

Los resultados aquí expuestos contribuirán a definir un panorama que permita estudiar como el HCV-1a evoluciona en pacientes coinfectados con HIV y la forma en la que se distribuye y se expande.

5.4. Impacto de las mutaciones en regiones genómicas asociadas a resistencia antiviral como elemento pronóstico de respuesta sostenida a la terapia antiviral interferón-basada

Diversos factores pronósticos de respuesta al tratamiento han sido estudiados en pacientes HCV mono infectados pero la aplicabilidad de los mismos en pacientes coinfectados con HIV no ha sido aún definida [215, 216]. En ambas poblaciones estudiadas para este objetivo no se hallaron asociaciones con los valores de carga viral plasmática del HCV, recuento de células CD4, sexo o edad en contraposición a los resultados obtenidos por otros grupos de trabajo en pacientes HCV mono infectados [215] y coinfectados con HIV [216]. Ha sido reportado que el HIV favorece la replicación del HCV en compartimentos extra-hepáticos, lo que generaría un aumento en la carga viral

plasmática del HCV [217]. Este hecho podría explicar la falta de correlación entre la viremia y la respuesta al tratamiento, ya que tanto los pacientes respondedores como no respondedores poseen elevados niveles de carga viral plasmática.

La infección por el HCV induce fuertemente la actividad antiviral de los ISGs que se expresan principalmente en el hígado [218]. Sin embargo, el virus persiste, lo que sugiere que el HCV puede bloquear o disminuir la función efectora de los ISGs. La infección por el HCV provoca la fosforilación y la activación de la PKR, que inhibe la iniciación de la traducción del factor eucariótico eIF2 α y atenúa la expresión de proteínas de los ISG a pesar de la inducción de los ARNm. La inducción proteica de los ISG se restablece y el efecto antiviral del interferón se incrementa cuando la expresión de la PKR es reprimida en las células infectadas tratadas con interferón. Mientras que la traducción de proteínas del huésped, incluyendo los ISGs antivirales, es suprimida por la activación de la PKR, el IRES del HCV no lo es. Por lo tanto, la capacidad del HCV para activar la PKR puede, paradójicamente, ser una ventaja para el virus durante la respuesta al IFN por la supresión preferencial de la traducción de los ISGs [89].

Diferentes estudios tendientes a explicar la resistencia del genotipo 1 a la terapia basada en IFN se han llevado a cabo [84]. Una fuerte correlación ha sido exhibida entre el número de mutaciones dentro de la región carboxilo terminal del gen codificante de la proteína NS5A, denominada región determinante de la sensibilidad al interferón (ISDR) y una serie de aminoácidos extras formando el dominio de unión a la PKR (PKRBD) [87], y la respuesta a la terapia con IFN. Así, pacientes infectados con virus HCV genotipo 1b del “tipo salvaje” en su secuencia ISDR no responden a la terapia basada en el IFN, mientras que sí lo hacen aquellos infectados con el “tipo mutado” del virus (definido por la presencia de 4 o más sustituciones aminoacídicas en ISDR) mostrando una respuesta virológica sostenida en el tiempo [4]. A pesar de algunos hallazgos controversiales reportados particularmente en Europa y EE.UU. [85, 219], el ISDR y el PKRBD proveen la primera clave sobre un potencial mecanismo específico por el cual genotipos particulares del HCV podrían escapar a la respuesta IFN-mediada [88]. A su vez, algunos estudios han reportado asociaciones entre la respuesta al tratamiento y mutaciones puntuales en las secuencias del ISDR/PKRBD [84, 220]. En concordancia con otros trabajos previamente publicados [85, 221], en este trabajo no se hallaron mutaciones puntuales responsables de la ausencia o no de respuesta al peg-IFN+RBV.

En modo semejante, la glicoproteína de envoltura E2 presenta una región con homología al sitio de fosforilación del factor eucariótico eIF-2 α o “PePHD” que podría operar como un sustrato alternativo para la PKR. De este modo el HCV disiparía su

acción enzimática sobre el verdadero blanco de acción antiviral, el eIF-2 α , permitiendo que la síntesis proteica prosiga. Esta estrategia ha sido postulada en modo restrictivo al genotipo 1 [15].

Contribuyendo en la misma dirección, la infección por HIV a través de la inducción de antagonistas de los interferones perturba la respuesta inmune antiviral innata que de otro modo podría inhibir la replicación del HCV, haciendo que algunos blancos celulares resulten más susceptibles a la infección por el HCV [146].

Los resultados correspondientes al primer grupo de estudio de este objetivo sugieren que en pacientes HCV positivos, coinfectados con HIV, el número de mutaciones aminoacídicas en el PKRBD y/o el PePHD, previo al tratamiento antiviral, relativo a la secuencia prototipo de un paciente no respondedor (HCV-J o D90208), no posee valor predictivo de respuesta virológica sostenida a la terapia basada en IFN. Por lo tanto, a pesar de la presencia de mutaciones en el PKRBD que puedan afectar la capacidad de NS5A de interactuar con la PKR celular e inhibirla como efector antiviral inducido por el IFN, otros factores podrían ser necesarios para aumentar el efecto del IFN y alcanzar una respuesta sostenida en pacientes HIV-HCV coinfectados.

En ausencia de una terapia antiviral específica, el HCV podría exhibir variantes genómicas homogéneas en los diferentes compartimentos. El grado de similitud entre las secuencias directas del HCV observadas en plasma y en CMSP merece considerar que los pacientes incluidos en este estudio se hallaban bajo terapia anti-retroviral, presentando un estado similar de la infección por HIV, sin severo inmunocompromiso, por lo que resulta esperable una baja variabilidad de cuasiespecies del HCV [147]. Sin embargo, es probable que este método subestime la verdadera probabilidad de detectar las diferentes variantes en CMSP dado que este es un enfoque muy conservador, sin seguimiento durante y después del tratamiento y sin analizar las variantes minoritarias en cada compartimento. Además, el fenómeno de compartimentalización debería ser analizado en otras regiones del genoma donde el tropismo viral posee una influencia crítica, como por ejemplo el HVR1 (región hipervariable 1) ubicada dentro de la región codificante para la proteína de envoltura E2. Debido a que las CMSP podrían servir como un punto crítico para la interacción directa entre HIV y HCV, un examen más detenido de este compartimento debería llevarse a cabo.

A su vez, dado el bajo número de pacientes analizados, con diferentes subtipos del genotipo 1 y sin seguimiento durante el tratamiento, es fundamental para poder obtener un acercamiento más acabado, estudiar una población con un mayor número de participantes infectados con un mismo subtipo del HCV.

Tanto en la población I como en la población II se observó que el dominio PePHD de la glicoproteína E2 en aislamientos del HCV de pacientes de Argentina es altamente conservado en el genotipo 1, no observándose diferencias estadísticamente significativas en el número de mutaciones y la respuesta final del tratamiento, lo cual coincide con los hallazgos descritos para la población de EE.UU. y por otros autores [206, 222]. Estos resultados sugieren que el dominio PePHD carece de valor para ser utilizado como marcador pronóstico de respuesta al tratamiento con peg-IFN+RBV.

De manera contraria, la región NS5A estudiada en la población II mostró una relación entre el número de mutaciones en el ISDR y el PKRBD y la respuesta al peg-IFN+RBV, contradiciendo los resultados expuestos para la primera población, pero concordando con otros autores respecto del número de mutaciones estimados para predecir una respuesta virológica [4, 223].

Diversos argumentos pueden describirse para salvar estas diferencias halladas en la región NS5A entre las dos poblaciones estudiadas, siendo una de ellas la diversidad de genotipos y subtipos hallados y comparados conjuntamente en la población I. En la población II se analizó un grupo homogéneo de pacientes infectados con el subtipo 1a del HCV, mientras que en la población I se analizaron 5 pacientes infectados con el subtipo 1a y 3 con el subtipo 1b. Las diferencias aminoacídicas basales entre los subtipos puede generar errores a la hora de diferenciar entre una mutación puntual o un cambio característicos de cada subtipo.

En el mismo sentido, el uso de diferentes secuencias de referencia (y de diferentes subtipos) para comparar el número de mutaciones puede generar discrepancias. Para la población de Estados Unidos se utilizó una secuencia de referencia caracterizada como subtipo 1b (HCV-J o D90208), mientras que para la población Argentina se utilizó una secuencia prototipo correspondiente al subtipo 1a (M62321).

El número de pacientes respondedores analizados en las dos poblaciones es muy bajo con respecto a los no respondedores (3 de 8 en el grupo de EE.UU. y 3 de 19 en el grupo de Argentina) lo que puede generar imprecisiones ante las estimaciones estadísticas por comparación entre las dos condiciones.

Además, han sido publicados resultados contradictorios entre el número de mutaciones en el ISDR y el PKRBD y la asociación con la respuesta al tratamiento, habiéndose publicado para poblaciones de Europa y EE.UU. la ausencia de correlación entre estos factores [85, 86]. A su vez, las cepas virales pueden adaptarse a una población particular y a un sistema inmune con implicancias asociadas a factores

poblacionales, dando lugar a la variabilidad y diversidad viral observada alrededor del mundo [37, 137].

Debido a esta variabilidad y diversidad viral y a los resultados contradictorios hallados entre la asociación del número de mutaciones en el ISDR y el PKRBD y la respuesta virológica, se podría plantear la posibilidad de utilizar las secuencias de NS5A como marcador pronóstico de respuesta al tratamiento en poblaciones particulares en donde haya sido confirmada esta asociación.

5.5. Evolución molecular del HCV y análisis de la compartimentalización durante el tratamiento con peg-IFN+RBV

Como se mencionó en otras oportunidades, la única terapia efectiva y permitida para tratar las infecciones por HCV en pacientes coinfectados con HIV es la combinación del interferón pegilado con la ribavirina. Sin embargo, la tasa de respuesta virológica sostenida es de aproximadamente un 36% para aquellos pacientes infectados con el genotipo 1, mientras que para los infectados con los genotipos 2 y 3 la tasa va de un 43 a un 73% [47].

Muchos investigadores han estudiado factores virales y del hospedador que podrían afectar la respuesta al tratamiento [224]. Los factores del hospedador, incluyendo la inmunidad innata y la variabilidad genética en el alelo IL28b, han mostrado un importante rol en el control de las infecciones por HCV [225]. Uno de los factores virales más influyente es el genotipo, aunque no es el único. Varias regiones genómicas del HCV fueron caracterizadas en afectar la respuesta final del tratamiento, siendo las regiones del IRES (en el 5'UTR), el PePHD (en la proteína E2) y el ISDR y el PKRBD (en la proteína NS5A) algunas de ellas [226-230].

En esta sección se analizó la evolución del IRES, el PePHD y el PKRBD del subtipo 1a del HCV en 11 pacientes coinfectados con HIV que no respondieron al tratamiento con peg-IFN+RBV con el fin de determinar la injerencia que tiene cada región en la resistencia.

En contraste con trabajos previos [182, 231, 232], aquí se muestra que las secuencias nucleotídicas del IRES y aminoacídicas del PePHD, permanecen sin cambios durante el tratamiento antiviral, siendo estas secuencias prácticamente idénticas entre los diferentes pacientes. De allí se desprende que estas regiones no tendrían relación directa con el escape a la terapia en aquellos pacientes no respondedores.

A diferencia de las dos regiones antes mencionadas, el PKRBD presentó cambios aminoacídicos durante el tratamiento, pero no se halló asociación entre ellos y la resistencia a la terapia, aunque todas las muestras poseían 4 o menos de 4 mutaciones en el mencionado dominio. Al compararse la diversidad de las secuencias basales del HCV entre pacientes mono infectados y coinfectados, se halló que aquellos aislamientos de pacientes mono infectados presentaban un mayor número de variantes que aquellos obtenidos de pacientes coinfectados. Estos resultados coinciden con los publicados por otros grupos de investigación en donde se observa que el HCV es menos variable cuando coexiste con HIV [147, 233, 234]. Esto podría deberse a que las células T anti-HCV específicas se hallan en menor proporción en pacientes coinfectados con HIV que en mono infectados con HCV [235]. Durante el tratamiento con peg-IFN+RBV, la presión de selección aumenta en tanto se recupere la respuesta celular T HCV-específica, facilitando así la emergencia de cuasiespecies, lo que explicaría el incremento de mutantes durante la terapia, aunque probablemente no sean responsables del escape y la resistencia al tratamiento.

El presente es el primer reporte donde se comparan concomitantemente las regiones genómicas correspondientes al IRES, el PePHD y el PKRBD entre pacientes HCV mono infectados y HIV coinfectados antes y durante el tratamiento con peg-IFN+RBV. Las relaciones filogenéticas basadas en las diferentes regiones genómicas del HCV analizadas por Máxima Verosimilitud a partir de pacientes NR coinfectados con HIV, aparecen cercanamente relacionadas con aquellas secuencias de pacientes NR de pacientes HCV mono infectados, lo que sugiere un origen filogenético común y la ausencia de divergencia en el tiempo.

Al comparar las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las porciones amplificadas para cada gen, tampoco se observaron diferencias entre los dos grupos estudiados. Estos resultados demuestran que la coinfección con HIV no favorece directa o indirectamente, la aparición de nuevas cepas del HCV. Teniendo en consideración que estos estudios fueron llevados a cabo con secuencias parciales de tres regiones genómicas, para obtener una conclusión definitiva se impone realizar estudios con secuencias completas del virus. A su vez, el número de secuencias de cada grupo debería incrementarse de modo tal que se aumenten las probabilidades de reconocimiento de secuencias emparentadas.

Ha sido reportada la replicación del HCV en reservorios extra-hepáticos, incluyendo a las células linfoides [217]. Así, tales sitios podrían actuar como reservorios de la infección por HCV y de esta manera escapar al tratamiento antiviral y contribuir a las

enfermedades observadas en pacientes infectados con HCV [100, 236]. Con el fin de determinar si cepas resistentes al peg-IFN+RBV se seleccionan en las CMSP, en este estudio se amplificaron las regiones genómicas 5'UTR y NS5A a partir de aislamientos de CMSP de pacientes coinfectados con HIV que presentaron mutaciones asociadas a linfotropismo en los aislamientos de plasma. El análisis de las regiones genómicas 5'UTR y NS5A así como el aminoacídico de ésta última puso en evidencia que las secuencias se mantenían invariantes, independientemente del compartimento analizado en los diferentes tiempos de análisis. Estos resultados sugieren que las CMSP se hallarían en contacto con las mismas cepas (según las regiones aquí analizadas), que el tratamiento con peg-IFN+RBV poseería el mismo efecto en ambos compartimentos y que la terapia no seleccionaría variantes resistentes existentes en las CMSP.

La replicación del HCV en sitios extra-hepáticos implica poner en evidencia la presencia de ARN de cadena negativa del HCV en estos tejidos, considerando a tal estado genómico como el intermediario replicativo. Sin embargo, muchos de estos estudios se han realizado en relativamente pocos pacientes mono infectados con HCV y han dado lugar a resultados contradictorios [93, 149, 237, 238]. Un estudio reciente, usando muestras longitudinales de 5 pacientes HIV-HCV coinfectados, mostró evidencias de compartimentalización y evolución del HCV en CMSP [217]. Aunque la replicación del HCV en CMSP ha sido previamente descrita, el significado y la relevancia de este reservorio no ha sido, todavía, bien establecido. Existe un nivel desproporcionadamente alto de detección de la cadena positiva del HCV en las células linfocíticas respecto al de cadena negativa [93]. Recientemente se ha reportado que el HCV en las CMSP de pacientes coinfectados con HIV se encuentra predominantemente adsorbido a la superficie de las células [239]. De esta manera, se podría suponer que las secuencias obtenidas de aislamientos virales desde células linfocíticas podrían ser el resultado de la caracterización de virus adsorbidos a la superficie celular, en lugar de ser variantes con tropismo por las CMSP. Esto podría explicar la similitud hallada en las secuencias de las regiones 5'UTR y NS5A para ambos compartimentos. A su vez, para poder determinar la diversidad en cada compartimento, el análisis de clones sería condición *sine qua non*, tanto para la región NS5A como para regiones hipervariables, como las existentes en las regiones codificantes para las glicoproteínas de envoltura E1 y E2.

En este estudio, se sugiere que el tratamiento con peg-IFN+RBV no impacta en la variabilidad de las regiones del IRES, el PePHD y el PKRBD de pacientes no respondedores coinfectados con HIV, con lo cual la respuesta sostenida podría estar más asociada a factores del hospedador que a factores virales.

Como se mencionó anteriormente, el HCV es un virus ARN y como tal posee una replicación rápida y dado a la falta de actividad *proofreading* en la ARN polimerasa, posee también una alta tasa de acumulación de mutaciones que va de 0.4×10^{-3} a 1.2×10^{-3} sustituciones por base, por sitio, por año [203, 240, 241]. Esta alta tasa de sustitución se vio reflejada en las secuencias flanqueantes al PePHD, en donde cada aislamiento poseía una secuencia aminoacídica característica, diferente a la de los otros aislamientos. Notablemente, el dominio aminoacídico PePHD se encontró extremadamente conservado, observándose menos de un 1% de cambios aminoacídicos por posición.

Varios autores han sugerido que este dominio podría estar involucrado en la resistencia a la terapia IFN-basada [182, 232], aunque este tema sigue siendo controversial [206, 222].

Taylor y col. [15] describieron que la delección de aminoácidos en el PePHD de cepas del HCV-1, disminuye de manera significativa la capacidad de unirse a la PKR, mientras que la región C-terminal truncada de la proteína E2 pierde completamente la capacidad de unión y de inhibición de la PKR. Estos hallazgos indican que otras regiones diferentes al PePHD, incluidas dentro de la porción C-terminal de E2, podrían interactuar con la PKR y poseer un posible rol en la supresión de su actividad, permitiendo el escape a la terapia antiviral. Por lo tanto, las regiones flanqueantes al PePHD podrían estar implicadas en la resistencia al tratamiento, aunque este estudio mostró que estas regiones también son conservadas durante el tratamiento y no se hallaron variantes minoritarias emergentes durante el mismo.

Gaudy y col. [222] reportaron una gran conservación en el PePHD en pacientes mono infectados con el subtipo 1b del HCV y tampoco hallaron asociación alguna entre las mutaciones en el PePHD y la respuesta a la terapia. De manera similar, por análisis ultra-profundo de los aislamientos del HCV de pacientes coinfectados con HIV, una extremada conservación aminoacídica fue hallada para esta región en pacientes respondedores, no respondedores y aquellos que recaen durante la terapia, observándose más de un 99% de conservación aminoacídica por posición. Asimismo, el análisis ultra-profundo nos permitió identificar variantes minoritarias que por clonado convencional no hubieran sido posibles identificar, ya que estas están presentes en menos del 1% de las secuencias analizadas. El rol de estas poblaciones y como podrían influenciar la respuesta al tratamiento con peg-IFN+RBV todavía no es clara y amerita posteriores estudios.

Este alto grado de conservación en el dominio PePHD parecería no estar asociado con la resistencia al tratamiento, pero podría estar involucrado, al igual que otros dominios

de E2, en funciones específicas como la inhibición de la apoptosis [242] o la unión a CD81 que permite la entrada del virus en la célula [243].

Finalmente, el dominio PePHD del HCV-1 no estaría involucrado en la resistencia al peg-IFN+RBV en pacientes coinfectados con HIV, por lo tanto, su uso como marcador pronóstico de respuesta a la terapia sería inapropiada para esta población.

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

La coinfección con HCV en pacientes infectados por HIV es un hallazgo frecuente en virtud de las similares vías de transmisión que presentan estos agentes (sexual, parenteral y vertical). Sin embargo su prevalencia parece diferir considerablemente al circunscribir su estudio a distintos grupos en riesgo y diferentes regiones geográficas.

La presencia de HIV modifica la historia natural de la infección por HCV y la respuesta a la terapia basada en el interferón es menor en pacientes coinfectados que en HCV mono infectados.

La presente tesis tuvo como objetivo entender el impacto de la variabilidad del HCV antes y durante el tratamiento con peg-IFN+RBV en pacientes con HIV con el fin de identificar factores pronósticos de la respuesta al tratamiento y de caracterizar posibles mutaciones o reservorios que permitan el escape del virus.

En primer lugar, de la realización de un estudio epidemiológico en el Centro Nacional de Referencia para el SIDA se determinó que el genotipo del HCV más prevalente en pacientes con infección por HIV es el 1, siendo éste, a su vez, el genotipo de mayor prevalencia a nivel mundial y el que peor respuesta al tratamiento antiviral presenta. A su vez, el subtipo hallado en mayor proporción fue el 1a, resultado contrapuesto a lo reportado previamente en pacientes HCV mono infectados, en donde el subtipo más prevalente es el 1b. La epidemiología molecular del subtipo 1a del HCV desde pacientes coinfectados con HIV de Argentina puso en evidencia la presencia de un clado definido. Los estudios de ancestro común para este grupo de secuencias y los análisis filogenéticos para los aislamientos de HIV de los mismos pacientes sugiere que el surgimiento de este nuevo clado estaría asociado a la emergencia de la cepa recombinante BF de HIV. Este hecho explicaría el aumento de la frecuencia del subtipo 1a observada en pacientes coinfectados con HIV y ayudaría a entender la epidemiología del HCV en pacientes con HIV.

De un relevamiento de datos del mismo estudio epidemiológico se confirmaron los resultados previamente descriptos, siendo llamativo el aumento del HCV genotipo 4 ya que este genotipo fue descripto principalmente en Egipto y África Central. La epidemiología molecular de este genotipo por medio de inferencias filogenéticas describe la presencia de 3 subtipos distintos, siendo el subtipo 4d el más prevalente, seguido por el subtipo 4a y el 4m. No se hallaron relaciones filogenéticas entre los diferentes subtipos ni asociaciones entre los subtipos y las diferentes vías de transmisión expuesta por los

pacientes, pero el aumento de este subtipo difícil de tratar constituye un problema de gran magnitud en la población coinfectada con HIV.

Los estudios del HCV a nivel molecular en el dominio PePHD demuestran que el uso de esta región como marcador pronóstico de respuesta al tratamiento resulta inadecuado dada la alta conservación en las secuencias aminoacídicas entre los diferentes grupos de pacientes, independiente de la respuesta final al tratamiento o el país de origen de la muestra. A su vez, esta conservación se observó también a lo largo del tratamiento, y los análisis genómicos de poblaciones virales minoritarias empleando la técnica de pirosecuenciación ultra profunda mostraron un porcentaje de conservación de cuasiespecies de este dominio de más del 99%.

Con respecto a la región NS5A, incluyendo al ISDR y al PKRBD, se observó que dependiendo de la población de estudio, el uso de las mutaciones de estos dominios como marcadores pronósticos de respuesta podría ser factible.

Los estudios de evolución de los pacientes no respondedores al tratamiento mostraron que el peg-IFN+RBV no selecciona *per se* variantes de escape y que la coinfección con HIV no afecta la variabilidad del HCV en estos dominios.

El HCV caracterizado en células mononucleares de sangre periférica y plasma de un hospedador dado no exhibió evidencia de compartimentalización en un tiempo dado de análisis, permaneciendo con alto grado de identidad aún bajo la presión ejercida por la terapia.

Por último, independientemente de las poblaciones estudiadas, no se hallaron correlaciones entre factores virológicos del HCV (carga viral, nivel de heterogeneidad de cuasiespecies), y *status* inmune (niveles de linfocitos T CD4+) del hospedador infectado con HIV-1. Más aún, la infección por HIV tampoco parecería impactar sobre la variabilidad del HCV antes y durante el tratamiento antiviral.

Los resultados de esta tesis contribuyen a la epidemiología del HCV en pacientes coinfectados con HIV y ayudan a dilucidar los mecanismos por los cuales los pacientes coinfectados con HIV responden en menor medida al tratamiento con peg-IFN+RBV respecto de los pacientes HCV monoinfectados.

7. ANEXOS

7.1 Anexo I

Formulario de Información y Consentimiento para el Paciente

Título del Estudio Análisis de factores virológicos y moleculares asociados a la respuesta al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina de la hepatitis C

Investigador: Dr. Jorge Quarleri
Centro Nacional de Referencia para el SIDA, UBA.

Médica Natalia Laufer.
Hospital Juan A. Fernández

Introducción

A usted se lo está invitando a participar en un estudio de investigación clínica. Para decidir si desea o no ser parte de esta investigación, es importante que comprenda los riesgos y beneficios asociados con el mismo para poder tomar una decisión informada. Esto se denomina consentimiento informado. Este formulario de consentimiento le facilita información que su médico en el estudio le explicará. Se le solicitará que lea este formulario de consentimiento y que le pregunte al médico o personal del estudio todo aquello que no entienda. Una vez comprendida la información y si decide participar, se le solicitará que firme y feche este consentimiento y se le entregará una copia del mismo.

Propósito

A usted se lo está invitando a participar en este estudio debido a que es HIV-seropositivo y presentar asimismo una infección crónica por el virus de la hepatitis C (HCV). El objetivo principal de este estudio es evaluar si la caída de la cantidad de virus de la hepatitis C en su sangre durante las primeras 24 horas de tratamiento con interferón pegilado y ribavirina que su médico le haya indicado.

En este estudio participarán aproximadamente 60 pacientes de más de 18 años de edad infectados con HIV y HCV.

Duración del Estudio

La duración estimada del estudio será de 72 semanas (1año y medio).

Procedimientos a ser Seguidos durante el Estudio

Si usted decidiera participar en este estudio, se le solicitará concurrir al hospital / clínica para una visita antes de comenzar el tratamiento para determinar si usted cumple con los requisitos necesarios para participar en el mismo. En esta visita se le solicitará que lea y firme el consentimiento informado.

En este estudio habrá un grupo de tratamiento. Todos los pacientes recibirán el tratamiento con interferón pegilado (alfa 2a o alfa 2b) y ribavirina según la indicación de su médico.

Se le extraerán aproximadamente diez cucharaditas (alrededor de 45 ml) de sangre para pruebas de laboratorio (incluida hematología y química sanguínea), determinación de carga viral (cantidad del HCV en su sangre), recuento de CD4 (células del sistema inmunitario destruidas por el HIV). No habrá ningún nombre que lo identifique en ninguna de sus muestras de sangre. Se lo someterá a un examen físico completo y se le tomarán y registrarán sus signos vitales, talla y peso. Además, el personal a cargo del estudio le preguntará sobre sus antecedentes clínicos y empleo de drogas/medicación en el pasado o en el presente, incluidos los medicamentos antivirales que haya tomado o esté tomando.

Durante el estudio, se le extraerá sangre para determinaciones de carga viral del HCV, 5 minutos antes de la primera inyección de interferón pegilado y ribavirina, 24 siguientes a comenzar el tratamiento, y luego en las semanas 4, 12, 24, 48 y 72.

Los resultados de estas evaluaciones de laboratorio estarán disponibles para usted una vez que el equipo del estudio los reciba.

Si usted decidiera interrumpir definitivamente su participación en el estudio antes de completarse la investigación, se le solicitará que concurra al hospital / clínica para que el médico encargado del estudio le pueda practicar una evaluación adicional. Durante esta visita será sometido a los siguientes procedimientos: examen físico completo, medición de signos vitales, determinación de la carga viral del HCV. Además, se le extraerá sangre para evaluaciones rutinarias de laboratorio.

Responsabilidades

Como participante en esta investigación, será su responsabilidad concurrir al hospital / clínica para todas las visitas programadas del estudio, tomar la medicación en la forma y frecuencia prescrita, y retornar todos los frascos de la medicación en estudio, estén vacíos o no, al personal a cargo del estudio.

Nueva Información

Usted será informado por escrito sobre toda información nueva de importancia que pueda afectar su seguridad o su decisión de continuar participando en el estudio. En tal caso, se le solicitará que firme un nuevo formulario de consentimiento informado (modificado) para documentar que está al tanto de esta nueva información.

Posibles Beneficios

Es posible que usted no reciba beneficio alguno del tratamiento en estudio. Sin embargo, la información obtenida de esta investigación podría beneficiar a otros al permitir un mejor conocimiento sobre la relación entre la respuesta temprana al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina y su potencial para definir si permite definir aquellos pacientes que responderán al tratamiento.

Posibles riesgos

Los riesgos asociados con la extracción de sangre incluyen dolor, hematoma (mancha violeta en zona que ingresa la aguja), sangrado u otras molestias en el sitio de la extracción. Muy rara vez puede sobrevenir desmayo o infección en el sitio de la extracción. Se tomarán las precauciones necesarias para minimizar estas dificultades.

Tratamientos Alternativos

Usted no tiene obligación de participar en este estudio para recibir tratamiento para su infección por HCV.

Remuneración por Participar en el Estudio

Usted no recibirá pago alguno por participar en este estudio.

Costos por su Participación en el Estudio

Todas las visitas, procedimientos y pruebas de laboratorio relacionados específicamente con este estudio serán sin cargo.

Se le proveerá la droga del estudio sin cargo.

Ud. comprende que toda atención médica no requerida específicamente para este estudio, pero que forme parte de su cuidado médico habitual se le facturará a usted, a su obra social o prepaga.

Participación/Retiro Voluntario

Usted puede decidir no participar en este estudio o dejar de participar en cualquier momento sin por ello afectar la disponibilidad o la calidad de su atención médica presente o futura en esta institución. Si decide suspender el tratamiento con los medicamentos en estudio, se le solicitará acudir al hospital / clínica para una visita de retiro prematuro (que será similar a sus visitas regulares del estudio).

El médico encargado del estudio, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina o la ANMAT pueden dar por terminado este estudio en cualquier momento con o sin su consentimiento. El médico encargado del estudio puede discontinuar su participación en este estudio en cualquier momento si él o ella lo consideran necesario, por ejemplo, debido a efectos adversos asociados, correspondientes a su seguridad, o si usted no cumple con sus responsabilidades en el estudio.

Divulgación de Registros Médicos y Confidencialidad

Al firmar al pie, usted está autorizando el acceso a la información clínica personal contenida en sus registros médicos. Representantes del Ministerio de Salud, otras autoridades regulatorias, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina tendrán acceso a sus registros médicos originales, a los fines de obtener información sobre el estudio, asegurar que la información sea correcta y controlar que la investigación se esté llevando a cabo en forma adecuada. Su confidencialidad será protegida hasta donde lo permitan las leyes y disposiciones vigentes. Si bien los resultados de este estudio podrán presentarse en conferencias o en publicaciones, nunca se divulgará su identidad en dichas presentaciones.

¿A Quién Dirigirse para Consultas?

Para aclarar dudas relacionadas con esta investigación, notificar sobre daños relacionados con la misma o para obtener información sobre los procedimientos del estudio, usted podrá ponerse en contacto con:

Dr. _____

Cerviño 3356
(1425) Ciudad de Buenos Aires
Tel. 48082627

Consentimiento Informado

He leído las declaraciones anteriores y la información contenida en este formulario de consentimiento. Todas mis preguntas referentes a mi participación en este estudio de investigación me fueron contestadas. Entiendo que tengo plena libertad para decidir no participar en este estudio de investigación.

Autorizo la divulgación de mis registros médicos al Comité de Bioética de la Facultad de Medicina. Mi historia clínica no será copiada ni retirada del hospital/clínica donde reciba mi atención.

Entiendo que recibiré una copia de este formulario de consentimiento firmado y fechado. Al firmar este formulario no estoy renunciando a ninguno de los derechos legales que tendría como participante en un estudio de investigación.

Consiento en participar en el estudio titulado "".

Nombre y apellido completo
del paciente
(En letra de imprenta)

Firma del paciente

Fecha

Nombre y apellido completo del
testigo
(En letra de imprenta)

Firma del testigo

Fecha

Nombre y apellido completo
del padre/representante legal

Firma del padre/representante legal

Fecha

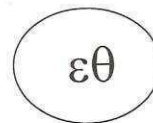
(Si corresponde)
(En letra de imprenta)

Nombre y apellido completo
del investigador
(En letra de imprenta)

Firma del investigador

Fecha

7.2 Anexo II



BUENOS AIRES UNIVERSITY
SCHOOL OF MEDICINE

INDEPENDENT COMMITTEE OF RESEARCH ETHICS (CIEI-FM-UBA)

APPROVAL REPORT

Buenos Aires, October 3, 2007

Dr. Horacio Salomón

Director, National Reference Center for AIDS

Department of Microbiology, School of Medicine

Paraguay 2155 11th Floor, Buenos Aires, Argentina

Dear Dr. Salomón,

This is with reference to the project you submitted to this committee entitled "HIV-HCV coinfection: molecular analysis of HCV genetic factors that affect the response to interferon".

We have considered the project, the information and the perspectives, and found that there are no substantial ethical objections for its implementation.

Yours sincerely,

COMITE INDEPENDIENTE DE ETICA EN INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA - UBA
(CIEI-FM-UBA)

Prof. Dr. Jaime E. Bortz, Secretary Coordinator

CIEI-FM-UBA – Facultad de Medicina – UBA – Sede: Departamento de Humanidades
Médicas – Paraguay 2155 piso 1º sector Uriburu - (1211) Buenos Aires – Argentina
Tel (54-11) 5950-9500 ext. 2102/2104 – E-mail humanidades@fmed.uba.ar

Office for Human Research Protection (OHRP) - IORG #0004063 - IRB #00004817

7.3 Anexo III

Los resultados de esta tesis fueron publicados en las siguientes revistas.

◆ CARTA AL EDITOR

ACTA GASTROENTEROL LATINOAM - DICIEMBRE 2008; VOL 38: Nº 4

Distribución de los genotipos y niveles de carga viral del virus de hepatitis C en pacientes coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana

Agradecimientos

N Laufer y F Bolcic recibieron apoyo desde Fogarty International Center/NIH grant a través del AIDS International, Training and Research Program - Mount Sinai School of Medicine (Grant # 5D43 TW0010137).

A la Sra. Mónica Pippo por su asistencia técnica.

F Bolcic^{1,2}
N Laufer¹
J Quarleri^{1,2}

ferentes centros de salud de la ciudad de Buenos Aires y del conurbano bonaerense (n=221). La determinación del genotipo del HCV se realizó siguiendo la metodología LiPA (*Line Probe Assay*) utilizando el equipo *Versant HCV Genotype Assay* (Bayer, USA). La prevalencia del genotipo 1 alcanzó el 71% (n=157), en tanto que los genotipos 2, 3 y 4 se hallaron en el 2% (n=5), 18% (n=40) y 2% (n=4), respectivamente. Se caracterizaron 15 (7%) infecciones mixtas, implicando al menos dos genotipos diferentes. Los aislamientos virales pertenecientes al genotipo 1 (n=157) incluyeron un 59% (n=92) del subtipo 1a, 17% (n=27) del subtipo 1b, 8% (n=13) implicando a ambos, y el 16% (n=25) restante no pu-

Analysis of Sequence Configurations of the PKR-Interacting HCV Proteins from Plasma and PBMC as Predictors of Response to Interferon-Alpha and Ribavirin Therapy in HIV-Coinfected Patients

F. Bolcic^a L. Bull^b L. Martinez^b R. Reynoso^a H. Salomon^a R. Arduino^b B. Barnett^b
J. Quarleri^a

^aArgentinean National Reference Center for AIDS, University of Buenos Aires 'CONICET', Buenos Aires, Argentina;

^bThe University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Tex., USA

Antiviral Research 90 (2011) 92–97



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

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



HCV RNA decline in the first 24 h exhibits high negative predictive value of sustained virologic response in HIV/HCV genotype 1 co-infected patients treated with peginterferon and ribavirin

N. Laufer^{a,b,c,*}, F. Bolcic^{a,c}, M.J. Rolón^b, A. Martinez^b, R. Reynoso^{a,c}, H. Pérez^b, H. Salomón^{a,c},
P. Cahn^b, J. Quarleri^{a,c}

^aCentro Nacional de Referencia para el SIDA, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, Buenos Aires, Argentina

^bHospital Juan A. Fernández, División Enfermedades Infecciosas, Cerviño 3356, Buenos Aires, Argentina

^cConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917, Buenos Aires, Argentina

Molecular Characterization of Hepatitis C Virus Genotype 4 Sequences in HIV-Coinfected Patients From Argentina

F. Bolcic,^{1,2} L.R. Jones,^{2,3} N. Laufer,^{1,2} and J. Quarleri^{1,2*}

¹Argentinean National Reference Center for AIDS, Microbiology Dept., School of Medicine, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

²National Scientific and Technical Research Council, Buenos Aires, Argentina

³Molecular Biology Division, Photobiology Station, Playa Union, Chubut, Argentina

Arch Virol

DOI 10.1007/s00705-012-1230-1

ORIGINAL ARTICLE

Analysis of the PKR-eIF2alpha phosphorylation homology domain (PePHD) of hepatitis C virus genotype 1 in HIV-coinfected patients by ultra-deep pyrosequencing and its relationship to responses to pegylated interferon-ribavirin treatment

F. Bolcic · M. Sede · F. Moretti · G. Westergaard ·
M. Vazquez · N. Laufer · J. Quarleri

JMV-11-2684.R2(23243)

Journal of Medical Virology 9999:1–12 (2012)

Author Proof

A Clustering Phenomenon Among HCV-1a Strains Among Patients Coinfected With HIV From Buenos Aires, Argentina

Federico Bolcic,^{1,2} Natalia Laufer,^{1,2} Juan Trincherro,¹ Leandro R. Jones,^{2,3} and Jorge Quarleri^{1,2*}

¹Centro^{Q2} Nacional de Referencia para el SIDA, Dto. Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

²Division de Biología Molecular, Estación de Fotobiología Playa Unión, Playa Unión, Rawson, Chubut, Argentina

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

7.4 Anexo IV

Publicaciones de los resultados de esta tesis bajo evaluación.

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 Patients Coinfected with HIV

Journal:	<i>Journal of Medical Virology</i>
Manuscript ID:	JMV-11-2809
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	12-Dec-2011
Complete List of Authors:	Bolcic, Federico; Centro Nacional de Referencia para SIDA, Microbiología; Facultad de Medicina (UBA); CONICET; Laufer, Natalia; Centro Nacional de Referencia para SIDA, Microbiología; Facultad de Medicina (UBA); CONICET Torres, Carolina; Catedra de Virología, F.Farmacacia y Bioquímica, UBA, ; Cassino, Lucila; Centro Nacional de Referencia para SIDA, Microbiología; Facultad de Medicina (UBA); CONICET Reynoso, Rita; Centro Nacional de Referencia para SIDA, Microbiología; Facultad de Medicina (UBA); CONICET Quarleri, Jorge; Centro Nacional de Referencia para SIDA, Microbiología
Keywords:	Genomic variability, HCV-1a, HIV, non-responder, peg-interferon

8. BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

1. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
2. *The PRN Notebook*. Vol. 6 (1) 2001]; Available from: www.prn.org.
3. Hijikata, M., et al., *Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4665-75.
4. Enomoto, N., et al., *Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection*. N Engl J Med, 1996. **334**(2): p. 77-81.
5. Micheloud, D., *VIRUS DE LA HEPATITIS C*. Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas, 2008.
6. Gouttenoire, J., F. Penin, and D. Moradpour, *Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory*. Rev Med Virol, 2010. **20**(2): p. 117-29.
7. Quezada, E.M. and C.M. Kane, *The Hepatitis C Virus NS5A Stimulates NS5B During In Vitro RNA Synthesis in a Template Specific Manner*. Open Biochem J, 2009. **3**: p. 39-48.
8. Cheng, J.C., M.F. Chang, and S.C. Chang, *Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 7044-9.
9. Sarrazin, C. and S. Zeuzem, *Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection*. Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 447-62.
10. Shimotohno, K., *Hepatitis C virus and its pathogenesis*. Semin Cancer Biol, 2000. **10**(3): p. 233-40.
11. Tanaka, N., et al., *PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 683-94.
12. Simmonds, P., et al., *Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(6): p. 1493-503.
13. Ray, R.B., et al., *Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein*. Virus Res, 1995. **37**(3): p. 209-20.
14. Chayama, K., et al., *Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy*. Hepatology, 2000. **32**(5): p. 1138-44.
15. Taylor, D.R., et al., *Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein*. Science, 1999. **285**(5424): p. 107-10.
16. Griffin, S.D., et al., *The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine*. FEBS Lett, 2003. **535**(1-3): p. 34-8.
17. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-73.
18. Kuiken, C. and P. Simmonds, *Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus*. Methods Mol Biol, 2009. **510**: p. 33-53.
19. Nakano, T., et al., *An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region*. Liver Int, 2012. **32**(2): p. 339-45.
20. Simmonds, P., *Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 11): p. 3173-88.
21. Ho, D.D., *Viral counts count in HIV infection*. Science, 1996. **272**(5265): p. 1124-5.
22. John, M., J. Flexman, and M.A. French, *Hepatitis C virus-associated hepatitis following treatment of HIV-infected patients with HIV protease inhibitors: an immune restoration disease? AIDS*, 1998. **12**(17): p. 2289-93.
23. Yun, Z., et al., *Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences*. J Med Virol, 1996. **49**(3): p. 155-60.
24. Viazov, S., A. Widell, and E. Nordenfelt, *Mixed infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event*. Infection, 2000. **28**(1): p. 21-5.
25. Kalinina, O., et al., *A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4034-43.
26. Tscherne, D.M., et al., *Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis C virus*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 3693-703.

27. Gonzalez-Candelas, F., F.X. Lopez-Labrador, and M.A. Bracho, *Recombination in hepatitis C virus*. *Viruses*, 2011. **3**(10): p. 2006-24.
28. Maertens, G. and L. Stuyver, *HCV Genotyping by the Line Probe Assay INNO-LiPA HCV II*. *Methods Mol Med*, 1999. **19**: p. 183-98.
29. Squadrito, G., et al., *Long-term response to interferon alpha is unrelated to "interferon sensitivity determining region" variability in patients with chronic hepatitis C virus-1b infection*. *J Hepatol*, 1999. **30**(6): p. 1023-7.
30. Davidson, F. and P. Simmonds, *Determination of HCV Genotypes by RFLP*. *Methods Mol Med*, 1999. **19**: p. 175-81.
31. Martinot-Peignoux, M., et al., *Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. The GEMHEP*. *J Viral Hepat*, 1999. **6**(6): p. 435-43.
32. Ross, R.S., et al., *Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(10): p. 3581-4.
33. Zheng, X., et al., *Direct comparison of hepatitis C virus genotypes tested by INNO-LiPA HCV II and TRUGENE HCV genotyping methods*. *J Clin Virol*, 2003. **28**(2): p. 214-6.
34. Lara, J., et al., *Coevolution of the hepatitis C virus polyprotein sites in patients on combined pegylated interferon and ribavirin therapy*. *J Virol*, 2011. **85**(7): p. 3649-63.
35. WHO, *Hepatitis C: global prevalence (update)*. *Wkly epidemiol Rec*, 2000.
36. Seeff, L.B., *Natural history of hepatitis C*. *Hepatology*, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 21S-28S.
37. Simmonds, P., et al., *A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes*. *Hepatology*, 1994. **19**(5): p. 1321-4.
38. Kuiken, C., et al., *The Los Alamos hepatitis C sequence database*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(3): p. 379-84.
39. de los Angeles Pando, M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 and other viral co-infections among young heterosexual men and women in Argentina*. *Am J Trop Med Hyg*, 2004. **71**(2): p. 153-9.
40. Quarleri, J.F., et al., *Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from argentine patients: a six-year retrospective study*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(12): p. 4560-8.
41. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C*. *Hepatology*, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 62S-65S.
42. Alter, M.J., *Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection*. *J Hepatol*, 2006. **44**(1 Suppl): p. S6-9.
43. Booth, J.C., J. O'Grady, and J. Neuberger, *Clinical guidelines on the management of hepatitis C*. *Gut*, 2001. **49 Suppl 1**: p. I1-21.
44. Thomson, M.M. and R. Najera, *Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update*. *AIDS Rev*, 2005. **7**(4): p. 210-24.
45. Jonas, M.M., *Children with hepatitis C*. *Hepatology*, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S173-8.
46. Di Bisceglie, A.M., *Hepatitis C*. *Lancet*, 1998. **351**(9099): p. 351-5.
47. Chung, R.T., et al., *Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(5): p. 451-9.
48. Levraud, J.P., et al., *Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4385-94.
49. Sheppard, P., et al., *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(1): p. 63-8.
50. Onoguchi, K., et al., *Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(10): p. 7576-81.
51. Sadler, A.J. and B.R. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 559-68.
52. Barber, G.N., *Host defense, viruses and apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(2): p. 113-26.
53. Sen, G.C. and G.A. Peters, *Viral stress-inducible genes*. *Adv Virus Res*, 2007. **70**: p. 233-63.
54. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
55. Sadler, A.J. and B.R. Williams, *Structure and function of the protein kinase R*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007. **316**: p. 253-92.

56. Katze, M.G., *The war against the interferon-induced dsRNA-activated protein kinase: can viruses win?* J Interferon Res, 1992. **12**(4): p. 241-8.
57. Katze, M.G., *Regulation of the interferon-induced PKR: can viruses cope?* Trends Microbiol, 1995. **3**(2): p. 75-8.
58. Katze, M.G., Y. He, and M. Gale, Jr., *Viruses and interferon: a fight for supremacy.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 675-87.
59. Langland, J.O., et al., *Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses.* Virus Res, 2006. **119**(1): p. 100-10.
60. Fried, M.W., et al., *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection.* N Engl J Med, 2002. **347**(13): p. 975-82.
61. Manns, M.P., 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, 2001. **358**(9286): p. 958-65.
62. Poynard, T., et al., *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**(9138): p. 1426-32.
63. McHutchison, J.G., et al., *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**(21): p. 1485-92.
64. Mallet, V., A. Vallet-Pichard, and S. Pol, *New trends in hepatitis C management.* Presse Med. **39**(4): p. 446-51.
65. Sulkowski, M.S., *Viral hepatitis and HIV coinfection.* J Hepatol, 2008. **48**(2): p. 353-67.
66. Poynard, T., et al., *Is an "a la carte" combination interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C? The ALGOVIRC Project Group.* Hepatology, 2000. **31**(1): p. 211-8.
67. Shiffman, M.L., et al., *Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3.* N Engl J Med, 2007. **357**(2): p. 124-34.
68. Chen, L., et al., *Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection.* Gastroenterology, 2005. **128**(5): p. 1437-44.
69. Feld, J.J., et al., *Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response.* Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1548-63.
70. Sarasin-Filipowicz, M., et al., *Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(19): p. 7034-9.
71. Ge, D., et al., *Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance.* Nature, 2009. **461**(7262): p. 399-401.
72. Zeuzem, S., et al., *Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3.* J Hepatol, 2004. **40**(6): p. 993-9.
73. Berg, T., et al., *Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin.* Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1086-97.
74. Jacobson, I.M., et al., *Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial.* Hepatology, 2007. **46**(4): p. 971-81.
75. Hadziyannis, S.J., 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**(5): p. 346-55.
76. Jensen, D.M., et al., *Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy.* Hepatology, 2006. **43**(5): p. 954-60.
77. Dalgard, O., et al., *Pegylated interferon alfa and ribavirin for 14 versus 24 weeks in patients with hepatitis C virus genotype 2 or 3 and rapid virological response.* Hepatology, 2008. **47**(1): p. 35-42.
78. Davis, G.L., et al., *Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C.* Hepatology, 2003. **38**(3): p. 645-52.

79. Sanchez-Tapias, J.M., et al., *Peginterferon-alfa2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(2): p. 451-60.
80. Hofmann, W.P. and S. Zeuzem, *A new standard of care for the treatment of chronic HCV infection*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **8**(5): p. 257-64.
81. Nettles, R.E., et al., *Multiple ascending dose study of BMS-790052, an NS5A replication complex inhibitor, in patients infected with hepatitis C virus genotype 1*. *Hepatology*, 2011.
82. Zeuzem, S., et al., *Efficacy of the Protease Inhibitor BI 201335, Polymerase Inhibitor BI 207127, and Ribavirin in Patients with Chronic HCV infection*. *Gastroenterology*, 2011.
83. Vermehren, J. and C. Sarrazin, *New hepatitis C therapies in clinical development*. *Eur J Med Res*, 2011. **16**(7): p. 303-14.
84. Enomoto, N., et al., *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**(1): p. 224-30.
85. Brillet, R., et al., *The nonstructural 5A protein of hepatitis C virus genotype 1b does not contain an interferon sensitivity-determining region*. *J Infect Dis*, 2007. **195**(3): p. 432-41.
86. Monga, H.K., et al., *Hepatitis C virus infection-related morbidity and mortality among patients with human immunodeficiency virus infection*. *Clin Infect Dis*, 2001. **33**(2): p. 240-7.
87. Gale, M.J., Jr., et al., *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**(2): p. 217-27.
88. Witherell, G.W. and P. Beineke, *Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response*. *J Med Virol*, 2001. **63**(1): p. 8-16.
89. Garaigorta, U. and F.V. Chisari, *Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation*. *Cell Host Microbe*, 2009. **6**(6): p. 513-22.
90. Nousbaum, J., et al., *Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy*. *J Virol*, 2000. **74**(19): p. 9028-38.
91. Hofmann, W.P., S. Zeuzem, and C. Sarrazin, *Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy*. *J Clin Virol*, 2005. **32**(2): p. 86-91.
92. Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice, *Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture*. *Science*, 2000. **290**(5498): p. 1972-4.
93. Blackard, J.T., N. Kemmer, and K.E. Sherman, *Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences*. *Hepatology*, 2006. **44**(1): p. 15-22.
94. Pham, T.N. and T.I. Michalak, *Occult hepatitis C virus persistence: identification and characteristics*. *MLO Med Lab Obs*, 2006. **38**(2): p. 20-2.
95. Radkowski, M., et al., *Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication*. *J Virol*, 2002. **76**(2): p. 600-8.
96. Oldstone, M.B., *Virus-lymphoid cell interactions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(23): p. 12756-8.
97. Ciurea, A., et al., *Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus at very low levels in immune mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(21): p. 11964-9.
98. Michalak, T.I., *Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection: insights from the woodchuck viral hepatitis model*. *Immunol Rev*, 2000. **174**: p. 98-111.
99. Pham, T.N., et al., *Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(3): p. 812-22.
100. Zignego, A.L., et al., *Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected patients*. *J Med Virol*, 1995. **47**(1): p. 58-64.
101. Qian, C., et al., *Replication of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells. Effect of alpha-interferon therapy*. *J Hepatol*, 1992. **16**(3): p. 380-3.
102. Saleh, M.G., et al., *Hepatic and extrahepatic hepatitis C virus replication in relation to response to interferon therapy*. *Hepatology*, 1994. **20**(6): p. 1399-404.

103. Basaras, M., et al., *Detection of hepatitis C virus RNA in serum and peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alpha*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996. **15**(11): p. 887-90.
104. Gong, G.Z., et al., *HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(2): p. 291-4.
105. Di Liberto, G., et al., *Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 76-84.
106. Nakajima, N., et al., *Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 3325-9.
107. Lerat, H., Y.K. Shimizu, and S.M. Lemon, *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, 2000. **74**(15): p. 7024-31.
108. ONUSIDA, *2008 Report on the global AIDS epidemic*. Disponible en: http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008_Global_report.asp.
109. McCutchan, F.E., *Understanding the genetic diversity of HIV-1*. AIDS, 2000. **14 Suppl 3**: p. S31-44.
110. Peeters, M. and P.M. Sharp, *Genetic diversity of HIV-1: the moving target*. AIDS, 2000. **14 Suppl 3**: p. S129-40.
111. Thomas, D.L., et al., *Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study*. J Infect Dis, 1998. **177**(6): p. 1480-8.
112. http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_Chap2_em.pdf.
113. Moss, A.R., et al., *Risk factors for AIDS and HIV seropositivity in homosexual men*. Am J Epidemiol, 1987. **125**(6): p. 1035-47.
114. Rothenberg, R.B., et al., *Oral transmission of HIV*. Aids, 1998. **12**(16): p. 2095-105.
115. Page-Shafer, K., et al., *Risk of HIV infection attributable to oral sex among men who have sex with men and in the population of men who have sex with men*. Aids, 2002. **16**(17): p. 2350-2.
116. Fields, B., *Fields Virology, Third ed.* 1996, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. New York.
117. Strathdee, S.A., et al., *HIV and risk environment for injecting drug users: the past, present, and future*. Lancet. **376**(9737): p. 268-84.
118. C.D.C, *Management of possible sexual, injection drugs use or ever non occupational exposure to HIV*.
119. Kuhn, L., et al., *Potential impact of new WHO criteria for antiretroviral treatment for prevention of mother-to-child HIV transmission*. AIDS. **24**(9): p. 1374-7.
120. Schacker, T., et al., *Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection*. Ann Intern Med, 1996. **125**(4): p. 257-64.
121. Pedersen, C., et al., *Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection*. BMJ, 1989. **299**(6692): p. 154-7.
122. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4650-5.
123. Musey, L., et al., *Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection*. N Engl J Med, 1997. **337**(18): p. 1267-74.
124. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 355-8.
125. Perelson, A.S., et al., *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1582-6.
126. Blanco JL, M.J., Pérez-Cuevas JB y Gatell JM. , *Historia natural, clasificación y pronóstico de la infección por el VIH-1. En J.M. Gatell, B. Clotet, D. Podzamczar, J.M. Miró y J. Mallolas. Guía práctica del SIDA. Clínica, diagnóstico y tratamiento*. 2002: Barcelona: Masson S.A. p. 47-58.

127. Palella, F.J., Jr., et al., *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.* N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 853-60.
128. Martin-Carbonero, L., et al., *Increasing impact of chronic viral hepatitis on hospital admissions and mortality among HIV-infected patients.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(16): p. 1467-71.
129. Bica, I., et al., *Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection.* Clin Infect Dis, 2001. **32**(3): p. 492-7.
130. Bonacini, M. and M. Puoti, *Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta-analysis of sexual and vertical transmission, and therapeutic issues.* Arch Intern Med, 2000. **160**(22): p. 3365-73.
131. Sherman, K.E., et al., *Hepatitis C Virus prevalence among patients infected with Human Immunodeficiency Virus: a cross-sectional analysis of the US adult AIDS Clinical Trials Group.* Clin Infect Dis, 2002. **34**(6): p. 831-7.
132. Yoo, T.W., et al., *Effect of hepatitis C virus (HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease.* J Infect Dis, 2005. **191**(1): p. 4-10.
133. Eyster, M.E., et al., *Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV).* Ann Intern Med, 1991. **115**(10): p. 764-8.
134. Detels, R., et al., *Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. Multicenter AIDS Cohort Study Investigators.* JAMA, 1998. **280**(17): p. 1497-503.
135. Murphy, E.L., et al., *Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease.* Ann Intern Med, 2001. **135**(1): p. 17-26.
136. Bonacini, M., et al., *Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA.* J Viral Hepat, 1999. **6**(3): p. 203-8.
137. Laskus, T., et al., *Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes.* J Infect Dis, 2000. **181**(2): p. 442-8.
138. Thomas, D.L., et al., *The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors.* JAMA, 2000. **284**(4): p. 450-6.
139. Villano, S.A., et al., *Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection.* Hepatology, 1999. **29**(3): p. 908-14.
140. Greub, G., et al., *Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study.* Lancet, 2000. **356**(9244): p. 1800-5.
141. Sulkowski, M.S., et al., *Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection.* JAMA, 2000. **283**(1): p. 74-80.
142. Barbaro, G., et al., *Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical findings.* Am J Gastroenterol, 1999. **94**(8): p. 2198-205.
143. Uberti-Foppa, C., et al., *Pretreatment of chronic active hepatitis C in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus reduces the hepatotoxicity associated with subsequent antiretroviral therapy.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **33**(2): p. 146-52.
144. Nasti, G., et al., *Chronic hepatitis C in HIV-coinfecting patients: feasibility and efficacy of interferon-alpha2b and ribavirin combination therapy.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. **26**(3): p. 299-300.
145. Torriani, F.J., et al., *Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients.* N Engl J Med, 2004. **351**(5): p. 438-50.
146. Laskus, T., et al., *Human immunodeficiency virus facilitates infection/replication of hepatitis C virus in native human macrophages.* Blood, 2004. **103**(10): p. 3854-9.
147. Shuhart, M.C., et al., *HIV infection and antiretroviral therapy: effect on hepatitis C virus quasispecies variability.* J Infect Dis, 2006. **193**(9): p. 1211-8.
148. Roque-Afonso, A.M., et al., *Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells.* J Virol, 2005. **79**(10): p. 6349-57.

149. Laskus, T., et al., *Negative-strand hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells from anti-HCV-positive/HIV-infected women*. J Infect Dis, 2007. **195**(1): p. 124-33.
150. Laperche, S., et al., *Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(2): p. 733-9.
151. Kuiken, C., et al., *The hepatitis C sequence database in Los Alamos*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D512-6.
152. Katoh, K., G. Asimenos, and H. Toh, *Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT*. Methods Mol Biol, 2009. **537**: p. 39-64.
153. Katoh, K., et al., *MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): p. 3059-66.
154. Combet, C., et al., *euHCVdb: the European hepatitis C virus database*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Database issue): p. D363-6.
155. Posada, D., *jModelTest: phylogenetic model averaging*. Mol Biol Evol, 2008. **25**(7): p. 1253-6.
156. Guindon, S. and O. Gascuel, *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood*. Syst Biol, 2003. **52**(5): p. 696-704.
157. Huelsenbeck, J.P. and F. Ronquist, *MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees*. Bioinformatics, 2001. **17**(8): p. 754-5.
158. Giribet, C.G., *A review of: "TNT, Tree Analysis Using New Technologies"*. Syst Biol, 2005. **54**: p. 176-178.
159. Goloboff, P.A., J.S. Farris, and N.K. C., *TNT, a free program for phylogenetic analysis*. Cladistics, 2008. **24**(5): p. 774-786.
160. Huson, D.H., et al., *Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees*. BMC Bioinformatics, 2007. **8**: p. 460.
161. Layden-Almer, J.E., et al., *Hepatitis C virus genotype 1a NS5A pretreatment sequence variation and viral kinetics in African American and white patients*. J Infect Dis, 2005. **192**(6): p. 1078-87.
162. Dilernia, D.A., et al., *Analysis of HIV Type 1 BF Recombinant Sequences from South America Dates the Origin of CRF12_{BF} to a Recombination Event in the 1970s*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011. **27**(5): p. 569-78.
163. Kuiken, C., B. Korber, and R.W. Shafer, *HIV sequence databases*. AIDS Rev, 2003. **5**(1): p. 52-61.
164. Lole, K.S., et al., *Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 152-60.
165. Salminen, M.O., et al., *Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(11): p. 1423-5.
166. Schultz, A.K., et al., *jpHMM: improving the reliability of recombination prediction in HIV-1*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Web Server issue): p. W647-51.
167. Schultz, A.K., et al., *A jumping profile Hidden Markov Model and applications to recombination sites in HIV and HCV genomes*. BMC Bioinformatics, 2006. **7**: p. 265.
168. Zhang, M., et al., *jpHMM at GOBICS: a web server to detect genomic recombinations in HIV-1*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W463-5.
169. Korber, B. and G. Myers, *Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1992. **8**(9): p. 1549-60.
170. Lundegaard, C., O. Lund, and M. Nielsen, *Prediction of epitopes using neural network based methods*. J Immunol Methods, 2010.
171. Nielsen, M., et al., *Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations*. Protein Sci, 2003. **12**(5): p. 1007-17.
172. Lund, O., et al., *Definition of supertypes for HLA molecules using clustering of specificity matrices*. Immunogenetics, 2004. **55**(12): p. 797-810.
173. Yusim, K., et al., *Los alamos hepatitis C immunology database*. Appl Bioinformatics, 2005. **4**(4): p. 217-25.
174. Vita, R., et al., *The immune epitope database 2.0*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D854-62.

175. Drummond, A.J. and A. Rambaut, *BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*. BMC Evol Biol, 2007. **7**: p. 214.
176. Drummond, A.J., et al., *Relaxed phylogenetics and dating with confidence*. PLoS Biol, 2006. **4**(5): p. e88.
177. Tamura, K., et al., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(8): p. 1596-9.
178. Quarleri, J.F., et al., *HCV genotype distribution among HIV co-infected individuals in Argentina: relationship with host and viral factors*. Acta Gastroenterol Latinoam, 2007. **37**(2): p. 76-83.
179. Torres-Puente, M., et al., *Sampling and repeatability in the evaluation of hepatitis C virus genetic variability*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 9): p. 2343-50.
180. Cannon, N.A., et al., *Hepatitis C virus diversity and evolution in the full open-reading frame during antiviral therapy*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2123.
181. Yuan, H.J., et al., *Evolution of hepatitis C virus NS5A region in breakthrough patients during pegylated interferon and ribavirin therapy**. J Viral Hepat, 2010. **17**(3): p. 208-16.
182. Afzal, S., et al., *Mutations in the E2-PePHD region of hepatitis C virus genotype-3a and correlation with response to interferon and ribavirin combination therapy in Pakistani patients*. Virol J, 2010. **7**: p. 377.
183. Volkenstein, M.V., *Physical Approaches to Biological Evolution*. Springer-Verlag, 1994.
184. Puig-Basagoiti, F., et al., *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**(Pt 4): p. 1067-75.
185. Kosakovsky Pond, S.L. and S.D. Frost, *Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection*. Mol Biol Evol, 2005. **22**(5): p. 1208-22.
186. Eriksson, N., et al., *Viral population estimation using pyrosequencing*. PLoS Comput Biol, 2008. **4**(4): p. e1000074.
187. Hall, T., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl Acids Symp Ser 1999. **41**: p. 95-98.
188. Alfonso, V., et al., *Phylogenetic characterization of genotype 4 hepatitis C virus isolates from Argentina*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(5): p. 1989-92.
189. Shimoike, T., et al., *Translational insensitivity to potent activation of PKR by HCV IRES RNA*. Antiviral Res, 2009. **83**(3): p. 228-37.
190. Koev, G., R.F. Duncan, and M.M. Lai, *Hepatitis C virus IRES-dependent translation is insensitive to an eIF2alpha-independent mechanism of inhibition by interferon in hepatocyte cell lines*. Virology, 2002. **297**(2): p. 195-202.
191. Terenin, I.M., et al., *Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(8): p. 836-41.
192. Zignego, A.L., et al., *Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies*. Dig Liver Dis, 2007. **39 Suppl 1**: p. S38-45.
193. Gerotto, M., et al., *Evidence for sequence selection within the non-structural 5A gene of hepatitis C virus type 1b during unsuccessful treatment with interferon-alpha*. J Viral Hepat, 1999. **6**(5): p. 367-72.
194. Berg, T., et al., *Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment*. Hepatology, 2000. **32**(6): p. 1386-95.
195. Sulkowski, M.S. and D.L. Thomas, *Hepatitis C in the HIV-Infected Person*. Ann Intern Med, 2003. **138**(3): p. 197-207.
196. Soriano, V., et al., *Care of patients with hepatitis C and HIV co-infection*. AIDS, 2004. **18**(1): p. 1-12.
197. Ross, R.S., et al., *Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes*. J Med Virol, 2000. **60**(2): p. 122-5.
198. de Bruijne, J., et al., *Emergence of hepatitis C virus genotype 4: phylogenetic analysis reveals three distinct epidemiological profiles*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(12): p. 3832-8.
199. Eriksen, M.B., et al., *Molecular and epidemiological profiles of hepatitis C virus genotype 4 in Denmark*. J Med Virol, 2010. **82**(11): p. 1869-77.

200. van de Laar, T., et al., *Evidence of a large, international network of HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men*. Gastroenterology, 2009. **136**(5): p. 1609-17.
201. Vogel, M., et al., *Phylogenetic analysis of acute hepatitis C virus genotype 4 infections among human immunodeficiency virus-positive men who have sex with men in Germany*. Liver Int, 2010. **30**(8): p. 1169-72.
202. Sanchez-Quijano, A., et al., *Unexpected high prevalence of hepatitis C virus genotype 4 in Southern Spain*. J Hepatol, 1997. **27**(1): p. 25-9.
203. Smith, D.B., et al., *The origin of hepatitis C virus genotypes*. J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 2)**: p. 321-8.
204. Di Lello, F., et al., *Diversity of hepatitis C virus genotype 1b in Buenos Aires, Argentina: description of a new cluster associated with response to treatment*. J Med Virol, 2008. **80**(4): p. 619-27.
205. El-Shamy, A., et al., *Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy*. Microbiol Immunol, 2011. **55**(6): p. 418-26.
206. Munoz de Rueda, P., et al., *Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6644-53.
207. de Queiroz, A.T., et al., *Relation of pretreatment sequence diversity in NS5A region of HCV genotype 1 with immune response between pegylated-INF/ribavirin therapy outcomes*. J Viral Hepat, 2011. **18**(2): p. 142-8.
208. Shehzadi, A., S. Ur Rehman, and M. Idrees, *Promiscuous prediction and conservancy analysis of CTL binding epitopes of HCV 3a viral proteome from Punjab Pakistan: an in silico approach*. Virol J, 2011. **8**: p. 55.
209. Duan, H., et al., *Hepatitis C virus with a naturally occurring single amino-acid substitution in the E2 envelope protein escapes neutralization by naturally-induced and vaccine-induced antibodies*. Vaccine, 2010. **28**(25): p. 4138-44.
210. Nakano, T., et al., *Viral gene sequences reveal the variable history of hepatitis C virus infection among countries*. J Infect Dis, 2004. **190**(6): p. 1098-108.
211. Pybus, O.G., et al., *The epidemic behavior of the hepatitis C virus*. Science, 2001. **292**(5525): p. 2323-5.
212. Tanaka, Y., et al., *A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15584-9.
213. Aulicino, P.C., et al., *Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina*. J Virol, 2007. **81**(1): p. 427-9.
214. Bello, G., et al., *Phylogenetics of HIV-1 circulating recombinant forms 12_{BF} and 38_{BF} in Argentina and Uruguay*. Retrovirology, 2010. **7**: p. 22.
215. Kau, A., J. Vermehren, and C. Sarrazin, *Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C*. J Hepatol, 2008. **49**(4): p. 634-51.
216. Kurosaki, M., et al., *Sequences in the interferon sensitivity-determining region and core region of hepatitis C virus impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis*. J Med Virol, 2011. **83**(3): p. 445-52.
217. Blackard, J.T., et al., *Compartmentalization of hepatitis C virus (HCV) during HCV/HIV coinfection*. J Infect Dis, 2007. **195**(12): p. 1765-73.
218. Alter, H.J. and L.B. Seeff, *Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome*. Semin Liver Dis, 2000. **20**(1): p. 17-35.
219. Pascu, M., et al., *Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences*. Gut, 2004. **53**(9): p. 1345-51.
220. Watanabe, H., et al., *Number and position of mutations in the interferon (IFN) sensitivity-determining region of the gene for nonstructural protein 5A correlate with IFN efficacy in hepatitis C virus genotype 1b infection*. J Infect Dis, 2001. **183**(8): p. 1195-203.
221. Kmiecik, D., et al., *Mutations within protein kinase R-binding domain of NS5A protein of hepatitis C virus (HCV) and specificity of HCV antibodies in pretreatment sera of HCV-*

- chronically infected patients and their effect on the result of treatment.* Jpn J Infect Dis, 2006. **59**(2): p. 92-9.
222. Gaudy, C., et al., *Mutations within the hepatitis C virus genotype 1b E2-PePHD domain do not correlate with treatment outcome.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(2): p. 750-4.
223. El-Shamy, A., et al., *Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy.* Hepatology, 2008. **48**(1): p. 38-47.
224. Yen, Y.H., et al., *Mutations in the interferon sensitivity-determining region (nonstructural 5A amino acid 2209-2248) in patients with hepatitis C-1b infection and correlating response to combined therapy of pegylated interferon and ribavirin.* Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(1): p. 72-9.
225. Rauch, A., et al., *Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study.* Gastroenterology, 2010. **138**(4): p. 1338-45, 1345 e1-7.
226. Dash, S., et al., *Interferons alpha, beta, gamma each inhibit hepatitis C virus replication at the level of internal ribosome entry site-mediated translation.* Liver Int, 2005. **25**(3): p. 580-94.
227. Le Guillou-Guillemette, H., et al., *Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy.* World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2416-26.
228. Sarrazin, C., et al., *Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy.* Virology, 2001. **289**(1): p. 150-63.
229. Saito, T., et al., *Sequence analysis of PePHD within HCV E2 region and correlation with resistance of interferon therapy in Japanese patients infected with HCV genotypes 2a and 2b.* Am J Gastroenterol, 2003. **98**(6): p. 1377-83.
230. Gupta, R., et al., *Analysis of mutations within the 5' untranslated region, interferon sensitivity region, and PePHD region as a function of response to interferon therapy in hepatitis C virus-infected patients in India.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 709-15.
231. Araujo, F.M., et al., *Genetic variability in the 5' UTR and NS5A regions of hepatitis C virus RNA isolated from non-responding and responding patients with chronic HCV genotype 1 infection.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2008. **103**(6): p. 611-4.
232. Ukai, K., et al., *Mutations in carboxy-terminal part of E2 including PKR/eIF2alpha phosphorylation homology domain and interferon sensitivity determining region of nonstructural 5A of hepatitis C virus 1b: their correlation with response to interferon monotherapy and viral load.* World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3722-8.
233. Lopez-Labrador, F.X., et al., *Trends for genetic variation of Hepatitis C Virus quasispecies in Human Immunodeficiency virus-1 coinfecting patients.* Virus Res, 2007. **130**(1-2): p. 285-91.
234. Mao, Q., et al., *Human immunodeficiency virus seroconversion and evolution of the hepatitis C virus quasispecies.* J Virol, 2001. **75**(7): p. 3259-67.
235. Capa, L., et al., *Evolution of T-cell responses to hepatitis C virus (HCV) during pegylated interferon plus ribavirin treatment in HCV-monoinfected and in HCV/HIV-coinfecting patients.* Antivir Ther, 2007. **12**(4): p. 459-68.
236. Bare, P., et al., *HCV recovery from peripheral blood mononuclear cell culture supernatants derived from HCV-HIV co-infected haemophilic patients with undetectable HCV viraemia.* Haemophilia, 2003. **9**(5): p. 598-604.
237. Boisvert, J., et al., *Quantitative analysis of hepatitis C virus in peripheral blood and liver: replication detected only in liver.* J Infect Dis, 2001. **184**(7): p. 827-35.
238. Meier, V., et al., *HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication?* World J Gastroenterol, 2001. **7**(2): p. 228-34.
239. Natarajan, V., et al., *HCV in peripheral blood mononuclear cells are predominantly carried on the surface of cells in HIV/HCV co-infected individuals.* J Med Virol, 2010. **82**(12): p. 2032-7.
240. Ogata, N., et al., *Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3392-6.

241. Okamoto, H., et al., *Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability*. *Virology*, 1992. **190**(2): p. 894-9.
242. Lee, S.H., et al., *E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 8226-35.
243. Owsianka, A.M., et al., *Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding*. *J Virol*, 2006. **80**(17): p. 8695-704.