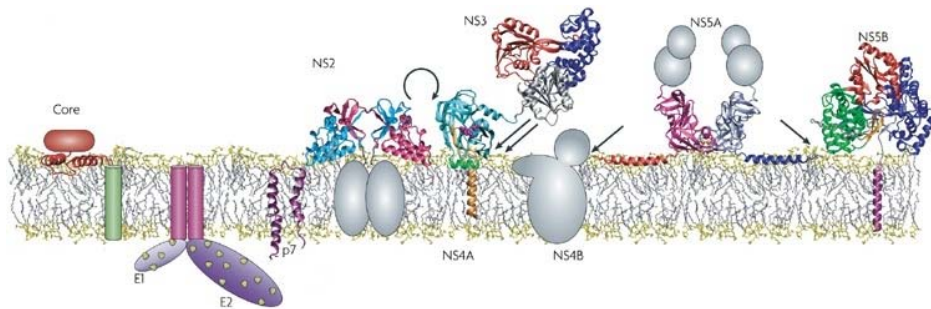




VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



***RESISTENCIAS A NUEVOS ANTIVIRALES DE
ACCIÓN DIRECTA EN AISLADOS CLÍNICOS
DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C***

Tesis Doctoral

Karina Alejandra Salvatierra

Valencia 2014



GENERALITAT
VALENCIANA



Fundación para el Fomento de la
Investigación Sanitaria y Biomédica
de la Comunitat Valenciana

Facultad de Ciencias Biológicas
Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria
y Biomédica de la Comunidad Valenciana-FISABIO,
Unidad Mixta de Genómica i Salut



***RESISTENCIAS A NUEVOS ANTIVIRALES DE
ACCIÓN DIRECTA EN AISLADOS CLÍNICOS DEL
VIRUS DE LA HEPATITIS C***

Memoria presentada por *Karina Alejandra Salvatierra*
Alumna del programa de Doctorado en Biotecnología

Director

Dr. F. Xavier López-Labrador

Valencia, 2014

D. F. Xavier López-Labrador, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador Senior del Sistema Nacional de Salud en el Laboratorio de Virología de la Unidad Mixta de Genòmica i Salut de la Fundació para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO-Salud Pública) / Institut Cavanilles de la Universitat de València

INFORMA: Que Karina Alejandra Salvatierra, Bioquímica de la Universidad de Misiones-Argentina, ha realizado bajo su dirección el trabajo de que lleva el título: ***“Resistencia a nuevos antivirales de acción directa en aislados clínicos del virus de la hepatitis C”***, y que considera reúne los requisitos para optar al Grado de Doctora en Biotecnología por la Universitat de València.

Y para que conste, en el cumplimiento de la legislación vigente, firmó el presente en València, a 8 de Octubre de 2014.

Fdo.: Dr. F. Xavier López-Labrador
FISABIO-Salud Pública
Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana

A mi Papá

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Director de Tesis, el Dr. Xavier López Labrador, Investigador Senior del Laboratorio de Virología, Unidad Mixta de Genòmica i Salut, FISABIO-Salut Pública (Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana/Institut Cavanilles Universitat de València) por la confianza que ha depositado en mí desde un principio, por la formación que he recibido durante estos años, por todos sus consejos y por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral bajo su dirección en este país tan lejano de mi querida Argentina.

Al Profesor Peter Simmonds, Dr. Donald Smith y Dr. Colin Sharp del Instituto Roslin, University of Edinburgh, y a la Dra. Heli Harvala y Dra. Kate Templeton del Laboratorio de Virología y Medicina, Royal Infirmary Edinburgh, por haberme brindado la posibilidad de trabajar con ellos, por la formación recibida, por la gran amistad y el cariño recibido en todo momento.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, por compartir todo este tiempo el mundo del doctorado, por el apoyo, comprensión y por los buenos momentos vividos.

A mis amigos de aquí de allá por estar siempre conmigo y por la amistad verdadera.

Agradezco a Dña. Carmen González y D. Gregorio Salbater por su gran ayuda desde que llegué a España y por su amistad.

A toda mi familia, en especial a mis padres y hermana, a ellos se los dedico, gracias por el apoyo incondicional recibido en todo momento.

El gran esfuerzo realizado para poder finalizar el doctorado y alcanzar uno de mis anhelos, han hecho que defina la meta en mi vida como disfrutar de cada momento, porque la vida es una sola, y que en la vida hay que tener mucha paciencia y confianza de uno mismo.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	5
1. INTRODUCCION	11
1.1. Hepatitis	11
1.1.1. Descubrimiento	13
1.2. La hepatitis crónica C	15
1.3. El virus de la hepatitis C	17
1.3.1. Clasificación taxonómica	17
1.3.2. Características estructurales	18
1.3.3. Organización genómica	19
1.3.4. Variabilidad genética, mutación y evolución	22
1.3.4.1. Genotipos y subtipos	22
1.3.4.2. Distribución geográfica de distintos genotipos y subtipos	23
1.3.4.3. Recombinación	27
1.3.4.4. “Cuasiespecies”	27
1.4. El ciclo infeccioso del VHC	31
1.4.1. Tropismo, receptores y entrada	32
1.4.2. Traducción	33
1.4.3. Replicación del genoma	33
1.4.4. Ensamblaje y liberación de partículas víricas	34
1.4.5. Compartimentación	35
1.5. Epidemiología de la infección por VHC	36
1.5.1. Vías de transmisión, prevalencia, morbilidad y mortalidad	38
1.6. Historia natural de la hepatitis C	39
1.6.1. Patogenia de la hepatitis C crónica	41
1.7. Diagnóstico	41
1.7.1. Diagnóstico serológico	42
1.7.1.1. Elisa	42
1.7.1.2. Pruebas confirmatorias	42
1.7.2. Diagnóstico virológico	42
1.7.2.1. Diagnóstico cualitativo (ARN-VHC)	42
1.7.2.2. Diagnóstico cuantitativo (viremia)	43

1.7.2.3. Genotipado del VHC	44
1.8. Tratamiento de la hepatitis C crónica	45
1.8.2. Nuevos antivirales de acción directa para el tratamiento de la hepatitis C crónica	49
1.8.2.1. Inhibidores de la proteasa NS3/4A	53
1.8.2.2. Inhibidores de la polimerasa NS5B	60
1.8.2.3. Inhibidores de otras proteínas del virus	64
1.8.2.4. Inhibidores de proteínas del huésped	68
1.8.3. Resistencia a los antivirales	71
1.8.3.1. Resistencia a los inhibidores de la proteasa	75
1.8.3.2. Resistencia a los inhibidores de la polimerasa	77
JUSTIFICACION	79
2. OBJETIVOS	81
2.1 Objetivo general	81
2.2 Objetivos específicos	81
3. MATERIAL Y MÉTODOS	83
3.1 Muestras clínicas	83
3.2 Extracción de ARN viral y síntesis de ADNc	83
3.3 Amplificación del gen de la proteasa NS3 del VHC	84
3.4 Amplificación del gen de la polimerasa NS5B del VHC	87
3.5 Electroforesis en gel de agarosa	89
3.6 Purificación de productos de PCR	89
3.7 Secuenciación de productos de PCR	89
3.8 Análisis de secuencias de nucleótidos	91
3.9 Determinación de la frecuencia de mutaciones de resistencia a nuevos antivirales	92
3.9.1 Mutaciones de resistencia a inhibidores de la proteasa NS3	92
3.9.1.1 Modelización de mutaciones en la estructura de NS3	93
3.9.2 Mutaciones de resistencia a inhibidores de la polimerasa	93
3.9.2.1 Modelización de mutaciones en la estructura de NS5B	93
3.9.3 Análisis de codones en la región NS3 y NS5B	93

3.10 Determinación de mutaciones minoritarias en la cuasiespecie	94
3.10.1 Clonación de productos de PCR	95
3.10.2 PCR de colonia	95
3.10.3 Secuenciación de clones moleculares	96
3.10.4 Detección de mutaciones minoritarias de resistencia a inhibidores de la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B	97
3.10.5 Análisis de codones en clones moleculares de las regiones NS3 y NS5B	97
3.11 Análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismo	98
3.11.1 Heterogeneidad genética entre aislados (inter individuo)	101
3.11.2 Heterogeneidad genética de la cuasiespecie (intra individuo)	102
3.12 Análisis de selección posición a posición	103
3.12.1 Entre individuos	103
3.12.2 Intra individuo	103
3.13 Análisis filogenético	104
3.13.1 Filogenia inter individuos	104
3.13.2 Filogenia intra individuo	106
3.14 Análisis de coevolución intramolecular e intermolecular	106
3.15 Estadística	108
4. RESULTADOS	109
4.1 Muestras clínicas	109
4.2 Extracción de ARN viral y síntesis de cADN	110
4.3 Amplificación del gen de la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B del VHC	110
4.4 Amplificación de NS3 y NS5B en la misma muestra.	112
4.5 Análisis de secuencias de nucleótidos de la proteasa NS3 y la polimerasa NS5B del VHC	114
4.6 Determinación de la frecuencia de mutaciones de resistencia a nuevos antivirales	115
4.6.1 Mutaciones de resistencia a inhibidores de la proteasa NS3	115
4.6.2 Mutaciones de resistencia a inhibidores de la polimerasa	121
4.6.3 Análisis de codones y barrera genética en las regiones NS3 y NS5B del VHC	147

4.7 Determinación de mutaciones minoritarias en la cuasiespecie del VHC. Análisis Intraindividuo	149
4.7.1 Clonación de productos de PCR	149
4.7.2 PCR de colonia	150
4.7.3 Secuenciación de los productos de PCR	151
4.7.4 Mutaciones minoritarias de resistencia a inhibidores de la proteasa NS3	152
4.7.5 Mutaciones minoritarias de resistencia a inhibidores de la polimerasa NS5B	155
4.7.6 Análisis de codones y barrera genética en la cuasiespecie de las regiones NS3 y NS5B	158
4.8 Análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismo	159
4.8.1 Análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismos (entre aislados de distintos individuos)	159
4.8.2 Análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismo de la “cuasiespecie” (intra individuo)	165
4.9 Análisis de selección	171
4.9.1 Entre individuos	171
4.9.2 Intra individuo	173
4.10 Análisis filogenético	175
4.10.1 Filogenia inter individuos	175
4.10.2 Filogenia intra individuo	184
4.11 Análisis de coevolución intramolecular e intermolecular	188
5. DISCUSIÓN	193
6. CONCLUSIONES	211
7. BIBLIOGRAFÍA	215
8. ANEXOS	273

ABREVIATURAS

- A:** Alanina
- aa:** aminoácido
- AAD:** antivirales de acción directa
- AASLD:** *American Association for the Study of Liver Diseases*
- Ac:** anticuerpo
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AFT:** agente formador de túbulos
- ALT:** Alanina transaminasa
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNcs:** ácido ribonucleico de cadena simple
- ARNdc:** ácido ribonucleico de doble cadena
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- AST:** aminotransferasa de aspartato
- ASV:** Asunaprevir
- Au:** Antígeno Australia
- BOC:** Boceprevir
- C:** Cisteína
- CAPS:** Análisis de coevolución usando secuencias de proteínas
- CLDN:** claudina
- CLV:** Ciluprevir
- CMSP:** células mononucleares de sangre periférica
- CypA:** ciclofilina A
- D:** Ácido aspártico
- DC-SIGN:** molécula no-integrina 3-fijadora de adhesión intercelular específica
- DGAT1:** diacilglicerol aciltransferasa-1
- DNV:** Danoprevir
- EASL:** *European Association for the Study of the Liver*
- ECDC:** European center for disease prevention and control
- EE.UU.:** Estados Unidos
- ELISA:** *enzyme-linked immunosorbent assay*
- EMA:** Agencia Europea del Medicamento
- F:** Fenilalanina
- FA:** fosfatasa alcalina
- FDA:** *Food and Drug Administration norteamericana* /Agencia de la Alimentación y el Medicamento de Estados Unidos
- FDV:** Faldaprevir

G: Glicina
GAG: glicosaminoglicanos
GGT: gamma glutamil transferasa
GGT: Gamma-glutamil transferasa
GTR: *General Time-Reversible*
H: Histidina
HAI: índice de actividad histológica
HCA: hepatitis crónica activa
HCP: hepatitis crónica persistente
HS: heparán sulfato
HUGTIP: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona
I: Isoleucina
IAN: Inhibidores análogos de nucleótidos
IFN: Interferón
IL: Interleuquina
INN: Inhibidores no nucleosídicos
IP: Inhibidores de la proteasa
IRES: *internal ribosome entry site*
K: Lisina
L: Leucina
LDL: *Low-density lipoprotein*/ lipoproteínas de baja densidad
LDLR: *Low-density lipoprotein receptor*
(L)-SIGN: molécula no-integrina 3-fijadora de adhesión intercelular específica del hígado
LVP: lipoviripartículas
M: Metionina
MEME: *Mixed Effects Model of Evolution*
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad/*Mayor histocompatibility complex*
NANB: hepatitis no-A, no-B
NC: no codificante
NLV: Narlaprevir
NPC1L1: receptor de absorción del colesterol Niemann-Pick C1- like 1
NS: no estructurales
NS3: Proteasa
NS5B: Polimerasa
nt: nucleótido
NTP: nucleótido tris-fosfato

OCLN: ocludina
OMS: Organización mundial de la Salud
ORF: *open reading frame*
P: Prolina
pb: pares de bases
pegIFN: interferón pegilado
PI4K-IIIa: fosfatidilinositol 4 - quinasa IIIa
Q: Glutamina
Q: Glutamina
R: Arginina
RBV: Ribavirina
RE: retículo endoplasmático
RMP: Ribavirina monofosfato
RTP: Ribavirina trifosfato
RT-PCR: transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa
RVR: respuesta virológica rápida
RVS: respuesta virológica sostenida
RVT: respuesta virológica temprana
S: Serina
SEN-V: virus SEN
SIL: silibinina
SMV: Simeprevir
SNP: polimorfismos de un solo nucleótido / *single nucleotide polymorphism*
SOV: Sovaprevir
T: Taurina
T: Treonina
TfR1: receptor 1 de la transferrina
TLR3: *Toll-like receptor 3*
TNF: *Tumor necrosis factor*
TPV: Telaprevir
UE: Unión Europea
UI/ml: Unidades internacionales por mililitro
V: Valina
VDV: Vedoprevir
VHA: virus de la hepatitis A
VHB: virus de la hepatitis B
VHC: virus de la hepatitis C

VHD: virus de la hepatitis D

VHE: virus de la hepatitis E

VHG: virus de la hepatitis G

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VLDL: *Very low-density lipoprotein*/ lipoproteínas de muy baja densidad

VPV: Vaniprevir

VTT: virus TT

W: Triptófano

RESUMEN

La infección crónica provocada por el virus de la hepatitis C (VHC) sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial y en España, ocasionando unas 10.000 muertes al año. Se estima que el 3% de la población mundial (200 millones de personas en el mundo y unas 900.000 en España) se encuentran infectadas por este virus. En España, y en el resto de países Occidentales, además de ser la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular, la infección por VHC es la indicación más frecuente de trasplante hepático.

El tratamiento convencional basado sólo en interferón pegilado más ribavirina (peg-IFN- α /RBV), provoca numerosos efectos secundarios, es de larga duración y con poco éxito en pacientes infectados con genotipo 1. Por otra parte, la reinfección del injerto post-trasplante es universal, ocasionando una hepatitis más agresiva y más difícil de tratar con peg-IFN- α /RBV, con efectos adversos muy frecuentes. Esto ha impulsado al desarrollo de fármacos más específicos, los antivirales de acción directa (AAD). Estos están dirigidos contra proteínas del virus, como la proteasa NS3, la proteína NS5A ó la polimerasa NS5B, y han mostrado una gran efectividad con mínimos efectos secundarios. A pesar de su alto precio, en pacientes con enfermedad avanzada ó trasplantados el acceso a los nuevos tratamientos con AAD es fundamental para mejorar su pronóstico y detener la progresión de la enfermedad. En España, para aquellos pacientes con infección por VHC genotipo 1, el tratamiento estándar incluye IP de primera (Telaprevir ó Boceprevir) ó de segunda (Simeprevir) generación con unas tasas de respuesta del 75-85%, aunque se espera la autorización de otros AAD (por ejemplo, Sofosbuvir y Daclatasvir) que, en combinación, aumentan la tasa de éxito del tratamiento hasta el 95% incluso en ausencia de interferón. Sin embargo, aunque estos nuevos AAD han demostrado un potente efecto antiviral *in vitro* e *in vivo*, se han descrito numerosas mutaciones del virus asociadas con el desarrollo de resistencias. Se ha observado una menor eficacia de AAD en ciertos pacientes, debido a mutaciones de resistencia del virus, bien por selección de mutaciones pre-existentes, o bien por emergencia durante la administración AAD. Además, en pacientes trasplantados inmunodeprimidos, el VHC puede estar sometido a

una menor presión selectiva, y presentar una variabilidad genética diferente en relación a pacientes inmunocompetentes. Por tanto es importante determinar la variación natural del genoma del VHC y su posible impacto en el tratamiento con nuevos AAD en estos grupos de pacientes, para prevenir potenciales fallos terapéuticos y optimizar los futuros regímenes terapéuticos, escogiendo los AAD más adecuados.

El objetivo en esta tesis doctoral fue analizar la variabilidad genética del VHC en los genes NS3 y NS5B, diana de AAD inhibidores de la proteasa (IP) y polimerasa viral (nucleosídicos –IAN- y no nucleosídicos –INN-), en distintos aislados naturales del subtipo 1b obtenidos de pacientes con infección crónica, partiendo de la hipótesis de que ya se encuentran en circulación virus resistentes a estos nuevos fármacos. Se logró poner a punto la secuenciación de la proteasa NS3 y la polimerasa NS5B del VHC, y el estudio de mutaciones minoritarias de resistencia a AAD mediante clonación y secuenciación.

En la región de la proteasa NS3, se identificaron variaciones de aminoácidos responsables de resistencia moderada a IP, con baja prevalencia, entre el 1,67% (V36L, V55A, A87T, R117H, S122G y V170T) y el 5% (S122T/N). Sin embargo, no se identificaron las principales mutaciones de resistencia alta a boceprevir o telaprevir (R155K/T, A156V/T y V170A). En cuanto a la región de la polimerasa NS5B, se identificaron las variaciones asociadas con resistencia moderada a IAN L159F y I239L en el 25% y 1,67% de los aislados, respectivamente, pero no se identificaron las principales mutaciones de resistencia alta a IAN (S96T, N142T, S282T y L320F) en ninguno de los aislados analizados. Con respecto a las variaciones asociadas a resistencia a INN, se identificaron en todos los aislados analizados al menos un polimorfismo o mutación relacionada con resistencias, localizándose en todos los distintos sitios alostéricos de la polimerasa viral, por lo que afectarían a la acción de las distintas subfamilias de INN, según su diana. En particular, la mutación C316N (asociada con resistencia a los INN dirigidos a los sitios alostéricos C y D de la polimerasa), se encontró en un 50% de los aislados. Su localización cercana al sitio activo sugiere que podría también afectar a la efectividad de IAN como el sofosbuvir en algunos pacientes infectados por VHC subtipo 1b.

En el análisis intrapaciente de clones moleculares de ambas regiones, NS3 y NS5B, se detectaron variantes minoritarias en la cuasiespecie del VHC no detectables mediante secuenciación directa estándar, algunas de ellas asociadas con resistencia a IP, IAN e INN.

De acuerdo al número y tipo de sustituciones nucleotídicas encontradas asociadas a resistencia a AAD en NS3 y NS5B, la mayoría de ellas están asociadas a una barrera genética baja, ya que sólo con una sustitución de nucleótidos en el codón correspondiente se ha podido generar el cambio de aminoácido, tanto en variantes mayoritarias detectadas por secuenciación convencional como en variantes minoritarias intraindividuo en la cuasiespecie del virus.

De acuerdo a nuestros resultados y las observaciones anteriores, todo parece apuntar a que lo más probable es que en la mayoría de individuos tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos, se estén dando fenómenos de selección purificadora o selección de fondo de las poblaciones virales, aunque más marcada en la proteasa NS3 y en pacientes inmunodeprimidos, lo que es bastante plausible, conociendo el papel fundamental de esta proteína para el ciclo de vida del virus. Alternativamente, esta situación se podría haber producido en los pacientes inmunodeprimidos por un aumento del tamaño poblacional de la “cuasiespecie” del virus debido a dos factores: i) el cuello de botella que representa la infección del nuevo hígado trasplantado y ii) el aumento de la replicación del virus gracias a la inmunosupresión.

A nivel de codones individuales, todos los codones de la proteasa NS3 y la mayoría de los de la polimerasa NS5B parecen sometidos a selección negativa ó purificadora, de acuerdo a su función imprescindible en el ciclo de vida del virus. De los 12 codones de NS5B que se encuentran bajo selección positiva, dos (300 y 556) se encuentran implicados en resistencia a INN, por lo que la fijación de mutaciones en estas dos posiciones podría verse favorecida en presencia de estos fármacos. A nivel intrapoblacional en la cuasiespecie (clones moleculares), dos codones de la polimerasa NS5B implicados con resistencia a INN (M426 y R531) presentan evidencia de diversificación episódica a lo largo de las ramas de la filogenia, lo que podría indicar que los cambios de aminoácidos en esos codones le confieren una ventaja adaptativa a

estas variantes dentro de la cuasiespecie, y se podrían fijar en la cuasiespecie en presencia de esta clase de AAD.

El análisis filogenético de las secuencias NS3 y NS5B localiza a nuestros aislados cercanos a las secuencias de referencia similares a la del replicón Con1, subtipo 1b. No hay grupos filogenéticos concretos que relacionen los aislados del VHC-1b según su perfil de mutaciones de resistencia a IP, IAN ó INN. Aunque en el caso de las resistencias a INN se pueden clasificar a la mayoría de los aislados en dos grupos diferenciados por poseer o no unas pocas mutaciones, estos grupos no se diferencian filogenéticamente. Lo mismo ocurre a nivel intrapaciente con las variantes mayoritarias y minoritarias presentes en la cuasiespecie (clones moleculares) ó población viral. Estos resultados sugieren que no hay clados de virus resistentes definidos en la población infectada.

Algunos aminoácidos relacionados con resistencia a IP (NS3 87, 117) y a INN (NS5B 300, 426, 451) coevolucionan con otros, bien a nivel intraproteína ó a nivel interproteína, posiblemente para mantener el *fitness* viral. Podemos especular que, en alguna medida, ciertas mutaciones de resistencia a IP en NS3 podrían favorecer la selección de mutaciones de resistencia a INN en NS5B, ó viceversa.

Los aislados del VHC subtipo 1b de pacientes con infección crónica en nuestra área geográfica tienen una alta prevalencia de polimorfismos naturales en posiciones relacionadas con resistencia a AAD, en especial a INN (con efecto desconocido), aunque no hay diferencias significativas entre aislados de pacientes inmunocompetentes del Hospital La Fe y del HUGTIP ó inmunodeprimidos del Hospital La Fe en cuanto al número ó porcentaje de cambios de aminoácido en posiciones asociadas a resistencia a IP, IAN, ó INN, ni en cuanto a su agrupación filogenética. Por tanto, no hay una prevalencia distinta de estas mutaciones ó polimorfismos, ni una diferenciación filogenética significativa, entre pacientes de Valencia ó Badalona, ni entre pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos.

Finalmente, podemos decir que la determinación de mutaciones de resistencia por secuenciación estándar antes del tratamiento con AAD, podría ser útil para escoger la mejor pauta de AAD en cada caso, en particular qué subfamilia de INN. Por otra parte, no se conoce si las variantes minoritarias

resistentes podrían ser seleccionadas y persistir a largo plazo en mayor ó menor proporción de la cuasiespecie en todos los pacientes ó sólo en algunos, y su control durante el tratamiento será conveniente realizarlo en los casos de fallo terapéutico. Sin embargo, la caracterización del perfil de resistencias minoritarias a los AAD utilizando el método “patrón oro” de alta sensibilidad usado en esta tesis (secuenciación de clones moleculares) no es aplicable a la práctica clínica, aunque existen otros métodos alternativos de análisis exhaustivo de secuencias, tales como PCR específica, y métodos basados en secuenciación masiva, cuya aplicabilidad está aun por determinar.

1. INTRODUCCION

1.1. *Hepatitis*

La hepatitis es una enfermedad muy heterogénea que se caracteriza por inflamación y necrosis de las células del hígado. Su causa puede ser infecciosa (virus), inmunitaria (autoanticuerpos) o tóxica (alcohol, venenos o fármacos). Como la hepatitis puede ser causada por diversos agentes, esta puede evolucionar de forma distinta según su etiología. La estrecha adaptación de los virus de la hepatitis infecciosa a la especie humana sugiere fuertemente que la hepatitis vírica es una enfermedad muy antigua. Los virus específicos que provocan la hepatitis, virus hepatotropos, curiosamente no están emparentados filogenéticamente entre sí, y pertenecen a distintos géneros: el virus de la hepatitis A (VHA *Picornavirus*), B (VHB *Hepadnavirus*), C (VHC *Hepacivirus*), D (VHD *Deltavirus*), E (VHE *Hepevirus*). Incluso aquellos que finalmente no han demostrado causar hepatitis G (VHG *Pegivirus*), TT (VTT *Anellovirus*) y virus SEN (SEN-V *Circovirus*). Otros virus que pueden causar ocasionalmente hepatitis son, el Epstein-Barr, el Citomegalovirus, el virus de la fiebre amarilla, el de la rubéola, el Herpes simplex y algunos enterovirus.

De forma fascinante, la historia del reconocimiento de la hepatitis comienza en la antigüedad. La primera descripción de la ictericia fue encontrada en Sumeria (3er milenio A.C.) en tabletas de arcilla que fueron el primer manual de la medicina. El agente etiológico era un nombre del diablo Ahhazu que atacó el hígado, que en aquellos días era el hogar del alma (Payen 2002a). En el 1.600 A.C., ya se describió un remedio contra la ictericia en un papiro egipcio, y en el siglo II A.C., un médico de la escuela de Hipócrates en Grecia, describió las primeras características clínicas de ictericia epidémica, incluyendo la fulminante. El tratamiento recomendado era una dieta de miel y agua (Oon 2012). La palabra ictericia se encontró por primera vez en el hipocrático corpus (Tygstrup 1980). En el siglo XVII se empezaron a registrar con frecuencia casos de hepatitis, posteriormente se fueron definiendo sus características, y a finales del siglo XIX se empezó a tener conciencia de su diversidad etiológica y no se dudó de su carácter infeccioso (McDonald 1908, Cockayne 1912).

En 1885, Lürman describió por primera vez una hepatitis transmitida por sangre y productos sanguíneos. Esta epidemia documentada, afectó a trabajadores que recibieron una vacuna contra la viruela preparada con linfocitos humanos (Lürman 1885). Décadas después se observaron numerosos brotes epidémicos que desarrollaban una hepatitis aguda meses después de la inoculación por vía parenteral de preparaciones que contenían suero o sangre humanos. En la década de los 40 y 50 se realizaron estudios sobre la transmisión de esta enfermedad en voluntarios, y se estableció definitivamente la existencia de una nueva variedad de hepatitis a la que se denominó hepatitis sérica. En 1923 definieron como hepatitis infecciosa, a lo que hoy en día conocemos como hepatitis A, mediante el estudio realizado sobre epidemias de hepatitis ocurridas en los Estados Unidos entre 1812 y 1922. La infección se desarrollaba pocos días después de la exposición a otros enfermos, además por la contaminación fecal de agua y alimentos (Blumer 1923).

La hepatitis sérica y la infecciosa presentaban diferencias en cuanto a su mecanismo de contagio y sus períodos de incubación (Paul 1945, Radkovsky 1956). En la hepatitis infecciosa, el agente causal se podía aislar en las heces (Paul 1945, Neefe 1946, Neefe *et al.* 1956), y en la hepatitis sérica el agente permanecía en forma indefinida en sangre. También se pudo demostrar con estudios de inmunización cruzada, que existían diferencias entre las dos formas de hepatitis. En 1942, se produjo un importante brote de hepatitis en la Marina de los Estados Unidos, 56.000 pacientes (Payen y Rongières 2002b; 2002c, Oon 2012) se infectaron después de la administración de la vacuna contra la fiebre amarilla (preparaciones que contenían plasma humano) (Seeff *et al.* 1987). En base a esto, MacCallum sugirió la primera distinción histórica entre dos formas de hepatitis en 1947 (MacCallum 1947): hepatitis epidémica con una breve incubación y hepatitis sérica con una larga incubación (100 días de fiebre). La mejor confirmación experimental de las dos formas distintas de hepatitis viral fue proporcionada por Saúl Krugman entre 1964 y 1967: la hepatitis A y la hepatitis B (Murray 1955, Murray *et al.* 1955, Krugman *et al.* 1967, Krugman *et al.* 1984).

En 1963, Baruch Blumberg, descubrió una proteína inmunoreactiva específica contra la proteína de los sueros de los aborígenes de Australia, a la que llamó “Antígeno Australia” (Au). En 1967, Blumberg sugirió que el

antígeno Au estaba vinculado a la hepatitis viral (Blumberg *et al.* 1965, Blumberg *et al.* 1967). Poco después, en 1968, Alfred Prince describió un antígeno en suero específicamente con la hepatitis postransfusional, y al que llamó antígeno de la hepatitis sérica (antígeno SH) (Prince 1968). En el año 1970, David Dane (Dane *et al.* 1970) identificó las partículas, viriones del virus de la hepatitis B (VHB). Más tarde, dada la correlación entre el antígeno Au/SH en donantes de sangre y la hepatitis postransfusional, en 1972 se estableció al antígeno Au como el antígeno de superficie de la hepatitis B (AgHBs). Seguidamente fue documentada la función protectora de inmunoglobulinas anti-HBs, y Blumberg pronto desarrolló el principio de la primera generación de vacuna (Magnius y Espmark 1972, Magnius *et al.* 1975, Magnius 1975). Pierre Tiollais, en 1980, logra clonar el VHB, abriendo el camino a la producción en masa de la vacuna de la hepatitis B por ingeniería genética (Brecht *et al.* 1980). En 1979, Fritz Deinhardt documenta con éxito la clínica e histología de la hepatitis de incubación corta (Deinhardt *et al.* 1967). En 1977, Stephen Feinstone identifica con éxito mediante la técnica de microscopía electrónica inmune, un nuevo agente en las heces causante de brotes de hepatitis A aguda (Feinstone *et al.* 1973). Pronto fue desarrollada una serología específica para el antígeno de VHA en las heces y el anticuerpo VHA en suero (IgM e IgG) (Hollinger *et al.* 1976). Provost y Hilleman en 1979, cultivaron VHA en cultivos de tejidos (Provost y Hilleman 1979), lo que derivó en un rápido desarrollo de la vacuna.

1.1.1. **Descubrimiento**

Tras el desarrollo de los test para el VHA y el VHB en 1974, se realizaron estudios serológicos a pacientes que habían contraído hepatitis post-transfusional, y se pudo tener conocimiento que el agente causal de la enfermedad no era ni el VHA ni el VHB. A este tipo de hepatitis se le denominó inicialmente hepatitis no-A, no-B (NANB) (Feinstone *et al.* 1975, 1983, Knodell *et al.* 1975, Prince *et al.* 1974, Alter *et al.* 1975), que se convirtió en la causa más frecuente de hepatitis post-transfusional (90%), siendo su incidencia tras recibir varias transfusiones de sangre de hasta un 20% en algunos países (Aach *et al.* 1991, Alter *et al.* 1978, Dienstag y Alter 1986, Frey-Settsein 1977, Seef *et al.* 1978). En un principio se la consideró como una

enfermedad leve, pero muchos estudios realizados durante la década de los 70 demostraron la propensión muy alta de progresión a hepatitis crónica, cirrosis y fallo hepático (Aach *et al.* 1991, Alter *et al.* 1978; 1989, Berman *et al.* 1979, Frey-Settsein 1977, Galbraith *et al.* 1975, Iwarson *et al.* 1979, Knodell *et al.* 1977, Koretz *et al.* 1976, Regenstein 1994, Seef *et al.* 1978). Aunque se realizó un gran esfuerzo para identificar el agente causal, los métodos utilizados fueron ineficaces (Dienstag 1983a; 1983b, Shih *et al.* 1986). A finales de la década de los 70, varios grupos desarrollaron un modelo animal: el chimpancé (*Pan troglodytes*), y pudieron demostrar la transmisión de hepatitis NANB a chimpancés después de administrarles varios inóculos humanos (Alter *et al.* 1978, Bradley *et al.* 1979, Shimizu *et al.* 1979, Tabor *et al.* 1978, Wyke *et al.* 1979). Lograron inducir episodios secuenciales de hepatitis aguda en chimpancés después de reinfectarlos con inóculos diferentes, lo que sugirió la existencia de varios agentes (Bradley y Maynard 1986, Hollinger *et al.* 1980, Tsiquaye y Zuckerman 1979, Yoshizawa *et al.* 1981). Los hepatocitos infectados mostraban túbulos membranosos (Jackson *et al.* 1979, Pfeifer *et al.* 1980, Shimizu *et al.* 1979). De esta manera se denominó al agente de la hepatitis NANB como el agente formador de túbulos (AFT). Posteriormente se demostró que, un tratamiento con cloroformo convertía los inóculos en no infecciosos para los chimpancés, fundamentando que el AFT podría ser un virus con envoltura lipídica (Bradley *et al.* 1983, Feinstone *et al.* 1983). Otros experimentos demostraron que el AFT debía ser un pequeño virus con envuelta, ya que se podía retener la infectividad tras el paso a través de filtros de 80nm (Bradley *et al.* 1985). En 1985 se sugirió que el AFT podría ser un virus similar a los togavirus o un nuevo género relacionado, ya que los virus de la familia *Togaviridae* (incluye los géneros *alphavirus*, *flavivirus*, *pestivirus*, *rubivirus*) eran pequeños, con envuelta y que podían ocasionar alteraciones ultraestructurales en células infectadas (Bradley *et al.* 1985).

Después de múltiples fracasos de la experimentación virológica e inmunológica convencional para definir y caracterizar el/los agentes causales de la hepatitis NANB, se intentaron diferentes experimentos de hibridación con ADN, pero el nivel del ácido nucleico de la hepatitis NANB resultó estar por debajo del límite de detección de estos métodos (Choo *et al.* 1992). Finalmente se identificó un clon de ADN en una librería de expresión en bacterias

mediante la aplicación de un cribado inmunológico a ciegas, utilizando suero de pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis NANB como una presunta fuente de anticuerpos específicos. Dichas librerías se habían construido con el ácido nucleico total extraído de un gran *pool* de plasma de un chimpancé con un título relativamente alto de AFT NANB (Choo *et al.* 1989). El origen de este clon se comprobó como derivado de una sola molécula de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 10.000 nucleótidos, que no provenía del genoma del hospedador, y sólo estaba presente en el material infeccioso, y que codificaba por sí mismo un antígeno asociado específicamente con la infección NANB en chimpancés y humanos (Choo *et al.* 1989). Así el ahora llamado virus de la hepatitis C (VHC) fue caracterizado molecularmente en 1989, reconociéndose como la causa mayor de hepatitis NANB y una causa importante de las hepatitis crónicas a nivel mundial. Durante este mismo año se desarrolló el primer ELISA cuyo uso demostró que el VHC es la principal causa de hepatitis NANB post-transfusional en todo el mundo, como así también el mayor responsable de la hepatitis NANB esporádica (Kuo *et al.* 1989).

1.2. La hepatitis crónica C

La mayoría (aproximadamente 50-80%) de las personas infectadas desarrollan una infección crónica persistente, donde la enfermedad hepática avanza progresivamente hasta formas graves de esteatosis (VHC genotipo 3a), y cirrosis hepática (Negro 2012, van der Meer *et al.* 2012). El VHC tiene capacidad para establecer infecciones persistentes escapando a la respuesta inmune humoral y celular específica del huésped, debido tanto a la alta tasa de mutación, a su estructura genómica en cuasiespecie y a su elevada producción de viriones (10^{12} viriones/día, con una vida media del virión de sólo 2,7 h). En última instancia, la infección crónica da lugar a la formación de carcinoma hepatocelular en casi 5.3% de los pacientes infectados (Zoulim *et al.* 2003) (Figura 1). Se sabe que el VHC es el principal agente causal de la enfermedad hepática crónica. Los estudios epidemiológicos indican que el VHC se asocia también con manifestaciones extra hepáticas, incluyendo la diabetes mellitus tipo 2, linfoma no Hodgkin de células B, crioglobulinemia mixta, y el síndrome de Sjögren (Jacobson *et al.* 2010).

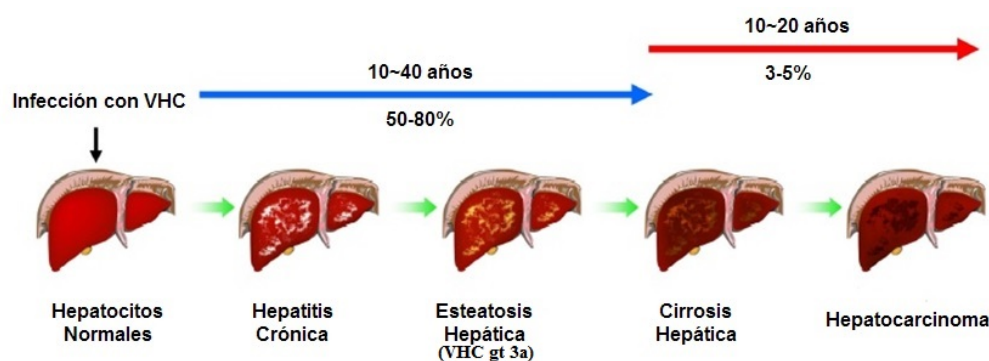


Figura 1. **Patogénesis de la enfermedad hepática asociada al VHC.** En aproximadamente el 50-80% de los las personas infectadas, la enfermedad se convierte en una infección crónica persistente y se desarrolla progresivamente esteatosis (VHC genotipo 3a) y cirrosis hepática. En última instancia, la infección crónica da lugar a la formación de carcinoma hepatocelular en casi 5.3% de pacientes infectados. Adaptado de Ke y Chen 2012.

Las características histológicas de la progresión de la infección crónica por VHC abarcan un abanico de posibilidades que va desde la presencia de una mínima actividad inflamatoria sin fibrosis hasta la cirrosis claramente establecida. La infección por el VHC induce grandes cambios en el metabolismo de los lípidos celulares, incluyendo una reducción de los niveles de lipoproteínas séricas y una acumulación de lípidos en las células parenquimatosas del hígado (esteatosis) (André *et al.* 2005, Petit *et al.* 2003). En la hepatitis crónica clásicamente se diferencian histológicamente dos categorías: la hepatitis crónica activa (HCA) y la hepatitis crónica persistente (HCP), aunque existen otras variedades como la hepatitis crónica lobulillar y la hepatitis crónica septal.

Los diferentes grados de inflamación y necrosis por un lado, y de fibrosis, por otro, constituyen los datos más importantes en la valoración de la lesión histológica (Figura 2). La biopsia hepática es el método diagnóstico de referencia, esencial para certificar la existencia de hepatitis crónica o cirrosis, establecer el grado de actividad de la enfermedad y para distinguir de otras hepatopatías crónicas. Las decisiones sobre el tratamiento a menudo se basa en el grado del daño y la etapa de la fibrosis (Theise 2007), además de ser relevante para evaluar el pronóstico de la progresión de la enfermedad durante la terapia antivírica (Ghany *et al.* 2010, ISDA/AASLD 2014, EASL 2014).

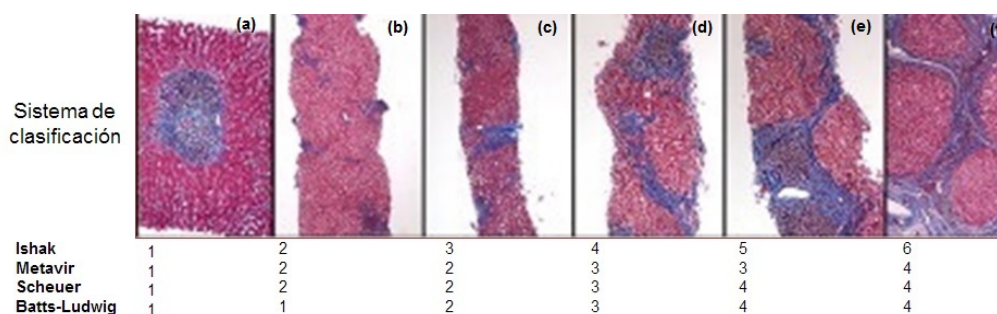


Figura 2. **Progresión de la fibrosis en la hepatitis crónica.** (a) El daño inicial es la fibrosis portal, (b) a medida que avanza la lesión crónica, (c) hay expansión gradual del área portal por tejido fibroso, (d) con la vinculación de los espacios porta por septos, (e) seguido por la creación de más puentes de tejido fibroso, (f) que finalmente resulta en cirrosis. De acuerdo a los diferentes sistemas de clasificación: Ishak, Metavir, Scheuer y Batts-Ludwig, se puntúan los grados de fibrosis. Adaptado de Fiel 2010.

Los nuevos avances en el desarrollado de las técnicas de imagen, como la ultrasonografía, la elastografía, o la resonancia magnética (Fibrotest®, Fibrometer®, Hepascore® y Fibroscan™), pueden servir para evaluar el grado de fibrosis hepática en el paciente de forma no invasiva (Friedrich-Rust *et al.* 2008; 2010, Smith y Sterling 2009).

1.3. El virus de la hepatitis C

1.3.1. Clasificación taxonómica

El VHC pertenece al género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Comparte esta familia con miembros del género *Flavivirus* (Por Ej. Virus del dengue, virus de la fiebre amarilla y virus del Nilo occidental) y con miembros del género *Pestivirus* (Por Ej. Virus de la diarrea bovina, virus del cólera porcino) (Bukh *et al.* 1995, Simmonds *et al.* 1993; 2005, Thiel *et al.* 2005, Barth *et al.* 2006, Moradpour *et al.* 2007). La familia *Flaviviridae* presenta características comunes que incluyen: a) la expresión de los genes virales a partir de un único gran marco de lectura abierto, y b) el procesamiento co- y post- traduccional de la poliproteína mediante una combinación de proteasas celulares y virales para generar productos génicos estructurales y no estructurales. En el sistema de clasificación de Baltimore, el VHC pertenece a la clase IV: virus de ARN de cadena simple de polaridad positiva (cadena genómica). Así, el genoma ARN viral es idéntico al ARNm viral, y puede ser inmediatamente traducido a la célula hospedadora (Baltimore 1971).

1.3.2. Características estructurales

Mediante microscopía crio-electrónica se ha demostrado que los viriones del VHC tienen una forma esférica con proyecciones en puntas y son heterogéneas de tamaño, desde 40 hasta 100nm de diámetro (tamaño promedio de 50nm de diámetro) (Catanese *et al.* 2013). Mediante el análisis de partículas recombinantes del VHC con anticuerpos contra glicoproteínas, se ha identificado una envuelta externa, que consta de una bicapa lipídica donde se encuentra anclada la glicoproteína E1 del virus formando un heterodímero con la glicoproteína E2 envolviendo ambas la nucleocápside icosaédrica de 30-35 nm de diámetro formada por unidades repetitivas de la proteína *core*, cuya función es proteger al genoma ARN (Yu *et al.* 2007) (Figura 3).

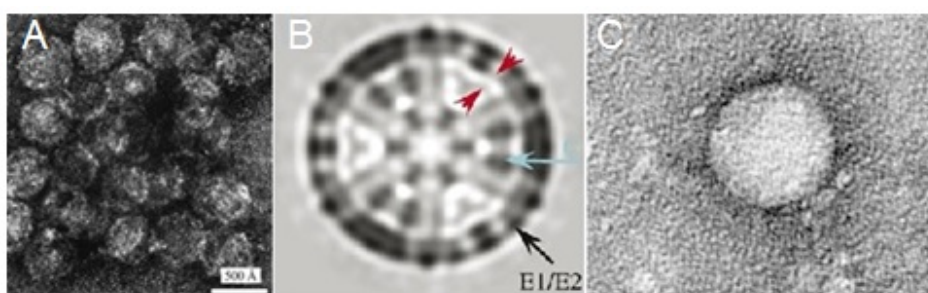


Figura 3. **Microscopía crio-electrónica del VHC producido en cultivo celular.** A) Partículas recombinantes del VHC en cultivo celular. B) Organización estructural de múltiples capas. Las dos puntas de flechas rojas indican la bicapa (Envuelta) lipídica, la flecha celeste indica la cápside y la flecha negra (capa exterior) se atribuye a las glicoproteínas E1 y E2 (Adaptado de Yu *et al.* 2007). C) Partícula del VHC con envoltura estructuralmente conservada, purificada a partir de cultivo celular (Adaptado de Catanese *et al.* 2013).

Sorprendentemente, varios estudios ponen de manifiesto la naturaleza del VHC, como una lipo-viro partícula (Bartenschlager *et al.* 2011), con una capa gruesa de apolipoproteínas derivadas del huésped que recubren la envoltura viral, y que presumiblemente ayudarían tanto a la liberación y entrada del virus como al escape de los anticuerpos neutralizantes en la circulación sanguínea (Catanese *et al.* 2013).

1.3.3. *Organización genómica*

El genoma del VHC consiste en una única molécula de ARN monocatenario lineal de cadena simple y polaridad positiva con un único marco de lectura abierto y de aproximadamente 9.6 kilobases de tamaño, flanqueado por una región no codificante en cada extremo: hacia el 5', la región 5' NC (5' no codificante o 5' UTR) (\approx 341 bases) y hacia el 3', la región 3' NC (3' no codificante o 3' UTR) (\approx 200 bases). El genoma se encuentra asociado al *core*; única proteína constituyente de la cápside viral, mediante la región 5' UTR formando la nucleocápside.

La región 5' NC es conservada, con analogías superiores al 98% entre aislados y se yuxtapone con el sitio interno de entrada al ribosoma, IRES (*internal ribosome entry site*), regulador de la traducción de la poliproteína viral. En el extremo 5' NC, alberga dos sitios conservados que interaccionan con el miR-122 necesario para una replicación eficiente del genoma del VHC (Machlin *et al.* 2011, Shimakami *et al.* 2012a; 2012b) posiblemente protegiendo de exonucleasas (Li *et al.* 2013) y de receptores de reconocimiento de la inmunidad innata, tales como RIG- I (Jiang *et al.* 2011, Shimakami *et al.* 2012a; 2012b). La región 3' NC comprende la secuencia variable de 40 bases que precede a una región rica en poli-U de longitud variable, seguida por una secuencia muy conservada de 100 bases, que también regula la traducción de la poliproteína. El marco abierto de lectura (ORF), codifica una única poliproteína precursora de \sim 3.011 aminoácidos, la cual es traducida por ribosomas unidos al retículo endoplasmático (RE) de forma IRES-dependiente y es cortada co- y post- traduccional por peptidasas celulares y proteasas virales en al menos 10 proteínas virales maduras (Waris *et al.* 2002).

Se ha descrito un marco de lectura alternativo (ARFP) o *core+1* o proteína F (*frameshift*), cuya función no está clara (Xu *et al.* 2001, Walewski *et al.* 2001, Varaklioti *et al.* 2002, Branch *et al.* 2005). Se han detectado durante la infección por el VHC genotipo 1a anticuerpos antiproteína F, lo que indicaría que se expresa de manera natural, pero se cree que la proteína F no es necesaria para la infección y replicación (McMullan *et al.* 2007), aunque su papel en la propagación del virus y el desarrollo de enfermedad crónica no ha

sido descartado (Bain *et al.* 2004, Komurian-Pradel *et al.* 2004, Walewski *et al.* 2001, Varaklioti *et al.* 2002).

Las proteínas virales desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal son las proteínas estructurales (*core*, E1 y E2), P7 y las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Figura 4).

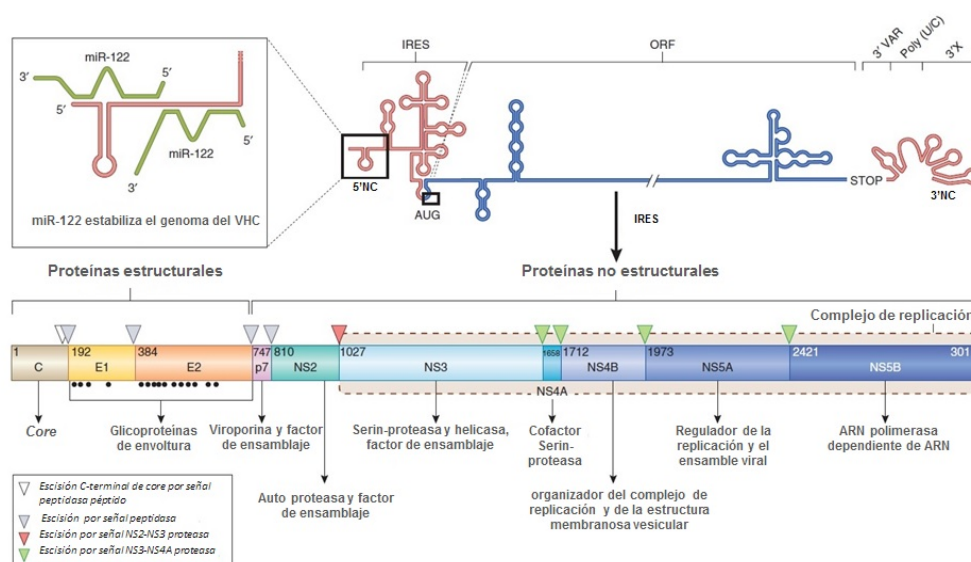


Figura 4. **Organización genómica y el procesamiento de la poliproteína del virus de la hepatitis C.** La cadena ARN positiva del genoma de 9,6-kb se representa esquemáticamente en la parte superior, contiene un único marco de lectura abierto (open reading frame ORF) (azul) flanqueado por las estructuras secundarias (rojo) de ARN en el extremo 5' y 3', regiones no codificantes (NC) y se muestra la unión de las dos copias de miR-122 (verde) a la región 5' NC (recuadro). Traducción de la poliproteína precursora, mediada por el IRES, que será procesada co- y post traduccional por peptidasas celulares y proteasa viral para obtener las proteínas estructurales y no estructurales (parte inferior). Procesamiento C-terminal de la proteína core por señal peptidasa péptido (triángulo blanco). La escisión de E1, E2 y p7 por señal peptidasa (triángulos en color gris). Mecanismo de autoescisión que requiere dos moléculas idénticas para compensar el sitio activo, las proteasas NS2-NS3 escinden (triángulo rojo). La proteasa NS3 se encuentra en el primer tercio de la NS3, asistida por su cofactor unido a la membrana, NS4A, se escinde las proteínas restantes NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (triángulos verdes). Se indica la glicosilación de las proteínas de la envoltura (puntos negros) y las funciones individuales de las proteínas del VHC. Adaptado de Scheel y Rice. 2013.

En la porción cercana al extremo 5' se codifican las proteínas estructurales, el *core* (cápside), con funciones en la formación de la cápside proteica, en la regulación, en la traducción y en la replicación del ARN y partículas de montaje; y las proteínas estructurales E1 y E2, glicoproteínas de la envoltura que participan en la adsorción y en la endocitosis mediada por receptores. La proteína integral de membrana P7 (vioporina), actúa como canal iónico dependiente de calcio en el retículo endoplásmico, y es necesaria para la morfogénesis y secreción de partículas virales infecciosas (Lavie *et al.* 2007, Carrère-Kremer *et al.* 2002, Steinmann *et al.* 2007a, Wozniak *et al.* 2010, González y Carrasco 2003, Carrère-Kremer *et al.* 2004, Jones *et al.* 2007).

En cuanto a las proteínas no estructurales, la proteína integral de membrana NS2, junto con NS3, constituyen la serin-proteasa NS2-3 que cataliza el corte entre NS2 y NS3 (con un papel importante en el ensamblaje del VHC). La proteína NS3 posee actividad de ATPasa y ARN helicasa utilizada durante la replicación y, junto a su cofactor NS4A, participa en el procesamiento de la poliproteína actuando como serin-proteasa para el corte de las proteínas no estructurales remanentes. NS4B es una proteína integral de membrana, que funciona como un andamio sobre el cual se ensamblan los componentes restantes del complejo asociado a la replicación. NS5B es la ARN polimerasa dependiente de ARN. NS5A, fosfoproteína multifuncional, es un cofactor de NS5B requerido para la replicación viral y podría estar involucrado en la resistencia al interferón (Enomoto *et al.* 1995; 1996, Sato y Enomoto 1996).

Una vez cortadas las proteínas no estructurales, éstas se ensamblan dentro del complejo replicasa del VHC asociado a la membrana del RE. El VHC se replica a través de un intermediario de polaridad negativa. NS5B es capaz de sintetizar tanto ARN de cadena positiva como de cadena negativa. Las nuevas copias de ARN viral (+) interactúan con la proteína *core* para formar la nucleocápside, que es finalmente rodeada por la envoltura viral que se forma por extrusión del RE. Los viriones maduros se liberan de la célula hospedadora a través de la vía secretoria celular (Block *et al.* 2003).

1.3.4. *Variabilidad genética, mutación y evolución*

Como otros virus ARN el VHC presenta una alta variabilidad genética y evolución rápida. Este acontecimiento se debe a que la ARN polimerasa dependiente de ARN carece de actividad reparadora de errores (ausencia de actividad exonucleasa 5'-3') provocando una acumulación de sustituciones nucleotídicas durante la replicación genómica (Ogata *et al.* 1991). Esta particularidad junto a un tamaño poblacional alto da lugar a dos niveles de variabilidad genética: entre individuos/intergenómica (genotipos, subtipos y aislados) e intra-individuo/intragenómica (cuasiespecie).

La tasa de error durante la replicación es de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-5} mutaciones por nucleótido (tasa natural evolutiva de 10^{-4} sustituciones/sitio/año), encontrado típicamente con la ARN polimerasa viral (Drake y Holland 1999, Domingo *et al.* 2006, Belshaw *et al.* 2008, Duffy *et al.* 2008), siendo la mayoría de las mutaciones generadas deletéreas (Bartenschlager y Lohmann 2000, Duffy *et al.* 2008), combinado con la elevada tasa de producción de viriones (10^{10} - 10^{12} diarios) (Neumann *et al.* 1998), y su corta vida media (2-5 horas) contribuyen a la variabilidad (Lam *et al.* 1997). En un paciente infectado con VHC la población de secuencias genómicas virales que coexisten y circulan están estrechamente relacionadas entre sí (homología >98%) pero a su vez son heterogéneas genéticamente y a esa población de genomas se la denomina frecuentemente “cuasiespecie” (Domingo *et al.* 1978, Martell *et al.* 1992). Se estima que potencialmente cada día aparece cada mutación puntual posible a lo largo del genoma viral como mínimo una vez (González-Candelas y López-Labrador 2010), aunque la tasa de mutación no es homogénea a lo largo del genoma y hay regiones altamente variables (como E1 y E2) y otras regiones muy conservadas, como la región 5'NC o 3'NC.

1.3.4.1. *Genotipos y subtipos*

El análisis filogenético de secuencias del VHC se ha traducido en una nomenclatura que reconoce distintos tipos y subtipos de virus. Se han definido siete grupos genéticos que difieren entre sí en más de un 30% sobre el genoma del virus completo. Estos genotipos de virus incluyen varios subtipos más estrechamente relacionados que varían en más de un 20%, mientras que dentro de cada subtipo la variación es menos del 10% (Simmonds 1995; 2013, Smith

et al. 2014). El consenso del año 1994 (Simmonds 1995), proponía la clasificación del VHC en 6 genotipos diferentes (designados del 1 al 6) con una identidad de secuencias del orden de 69%; a su vez, cada genotipo incluía varios subtipos con una identidad cercana al 79% (Simmonds *et al.* 1994). En 2005, se propone la actualización de la clasificación en genotipos y subtipos del VHC según el análisis filogenético de las secuencias de las regiones *core/E1* y NS5B, y las secuencias genómicas completas (Simmonds 2005). El estudio más reciente disponible (Smith *et al.* 2014), representa una importante actualización de la clasificación del VHC, previo consenso, con la incorporación de información adicional de secuencia derivada de más de 1.300 secuencias (casi) completas del genoma del VHC disponibles en bases de datos públicas en mayo de 2013. El análisis realizado, ha resuelto varios conflictos de nomenclatura entre las designaciones de genotipo, y el uso de criterios de consenso ha establecido la clasificación del VHC en siete genotipos confirmados y 67 subtipos (Figura 5) (Smith *et al.* 2014).

1.3.4.2. **Distribución geográfica de distintos genotipos y subtipos**

Los 7 clados filogenéticos son epidemiológicamente distintos, con diferencias en el área geográfica original, en el grupo de riesgo y distribución geográfica actual, reflejando su reciente propagación epidémica a nuevos grupos de riesgo (Figura 6) (Simmonds 2013). Se ha relacionado a los diferentes genotipos con su distribución geográfica actual (1a, 1b, 2a, 2b y 3a distribuidos en todo el mundo y 5a, 6a y 4 sólo en ciertas regiones específicas), con la vía de transmisión de la infección (por ej. 3a y 1a predomina en drogadictos endovenosos) y la respuesta al tratamiento antiviral (Zein 2000). En Europa y Norteamérica predomina el subtipo 1a (70%), seguido del 2b y 3a (25%) (Esteban *et al.* 2008, Sy y Jamal 2006, Simmonds *et al.* 2005, Zein 2000, Pawlotsky *et al.* 1995, Cornberg *et al.* 2011) (Figura 7).

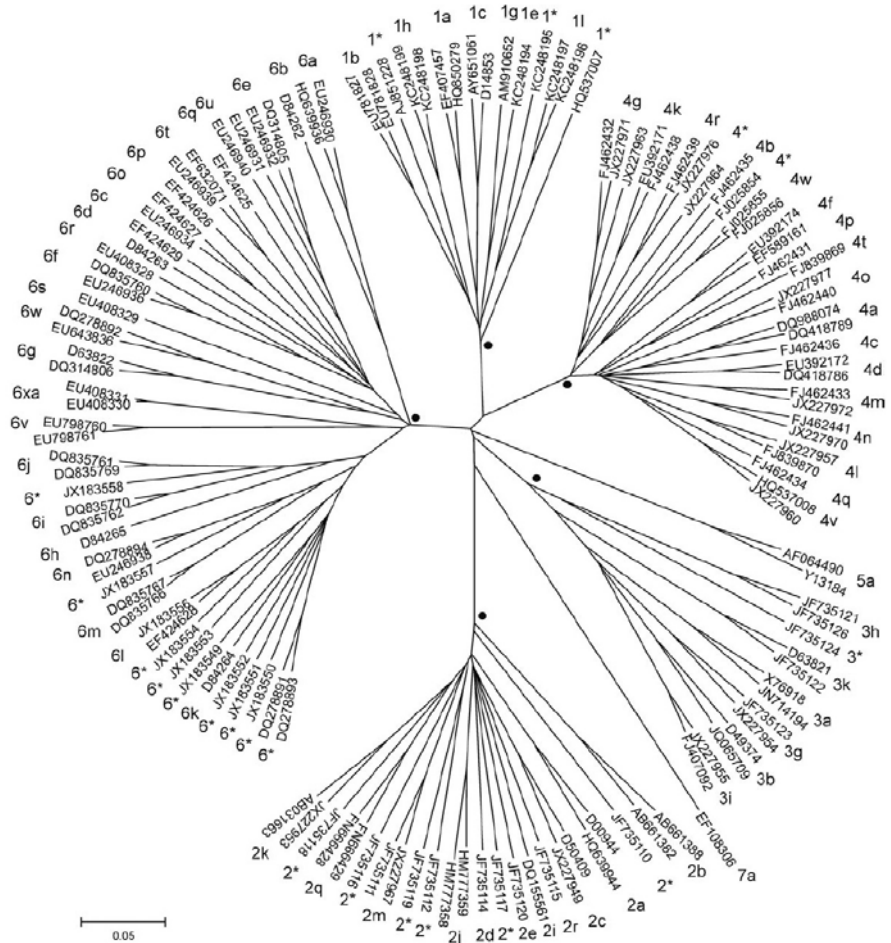


Figura 5. *Árbol filogenético representativo de 129 secuencias de la región de codificación completa. Hasta dos representantes de cada uno de los genotipos / subtipos confirmados fueron alineados (junto con una tercera variante extrema de subtipos 4g y 6e), y se construyó el árbol por neighbour-joining usando una aproximación a máxima verosimilitud con distancia de nucleótido entre las regiones de codificación, utilizando el Programa MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Las secuencias fueron elegidos para ilustrar la máxima diversidad dentro de un subtipo. Etiquetados por el número de acceso y subtipo (* subtipo sin asignar). Para los genotipos 1, 2, 3, 4, y 6, la rama en común compartida por todos los subtipos y se indican los nodos con un valor de bootstrap del 100% (1000 replicados) se indica con •. La barra de escala 0,05 representa una distancia evolutiva de 0,05 sustituciones/año. Adaptado de Smith et al. 2014.*

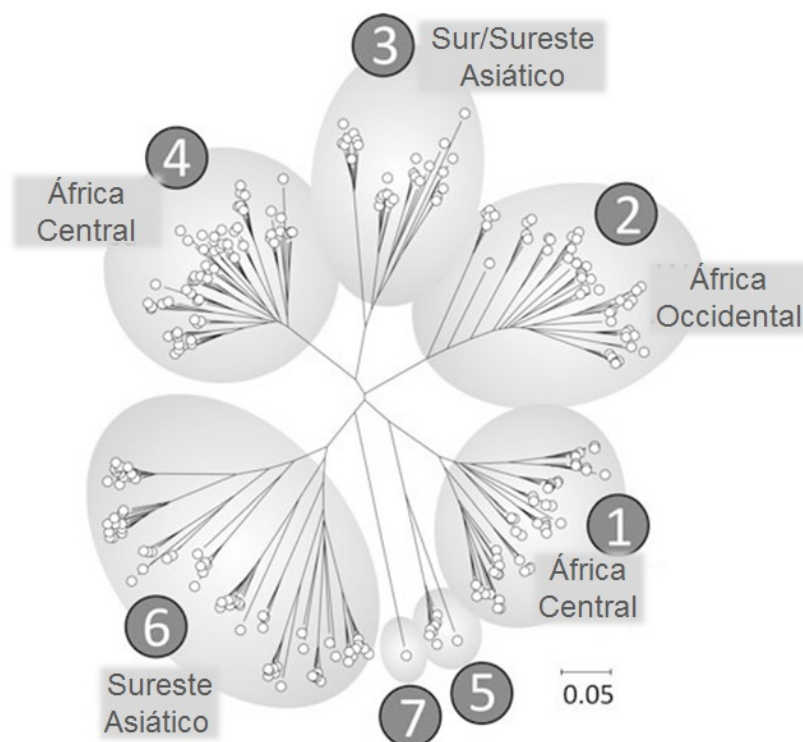


Figura 6. *Árbol evolutivo de las secuencias de la región NS5B del VHC genotipos 1-7 (posiciones 8276 a 8615). Las zonas de alta diversidad en el África subsahariana y Sureste de Asia contiene un gran número de variantes adicionales a los subtipos tales como 1a, 1b y 3a encontrado en los países occidentales, mostrando un patrón endémico de la diversidad. La barra de escala 0,05 representa una distancia evolutiva de 0,05 sustituciones/año. Adaptado de Simmonds 2013.*

El subtipo 1b tiene una distribución mundial, siendo más prevalente en Europa, China y Japón, en especial en personas de edad avanzada que contrajeron la infección mediante transfusión sanguínea antes de 1992 (Esteban *et al.* 2008, Sy y Jamal 2006). El subtipo 2a es frecuente en Japón y China (Sy y Jamal 2006, Zein 2000), el 2c en el sur de Italia (Ansaldi *et al.* 2005), el 4a principalmente en Egipto (Frank *et al.* 2000, Pybus *et al.* 2003), en Sudáfrica el genotipo 5 y en el Sudeste Asiático el 6 (Mellor *et al.* 1995, Tokita *et al.* 1994a; 1994b; 1995, Smuts y Kannemeyer 1995, Fung *et al.* 2008, Lu *et al.* 2008). Se sospecha aún más, aunque con datos muy limitados que los genotipos 5 y 7 se concentran en el centro y sur de África (Figura 8). La alta diversidad genética que existe entre los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b y 3a, sugiere que fueron introducidos en la población durante el siglo XX por conductas de riesgo parenterales (Magiorkinis *et al.* 2009).

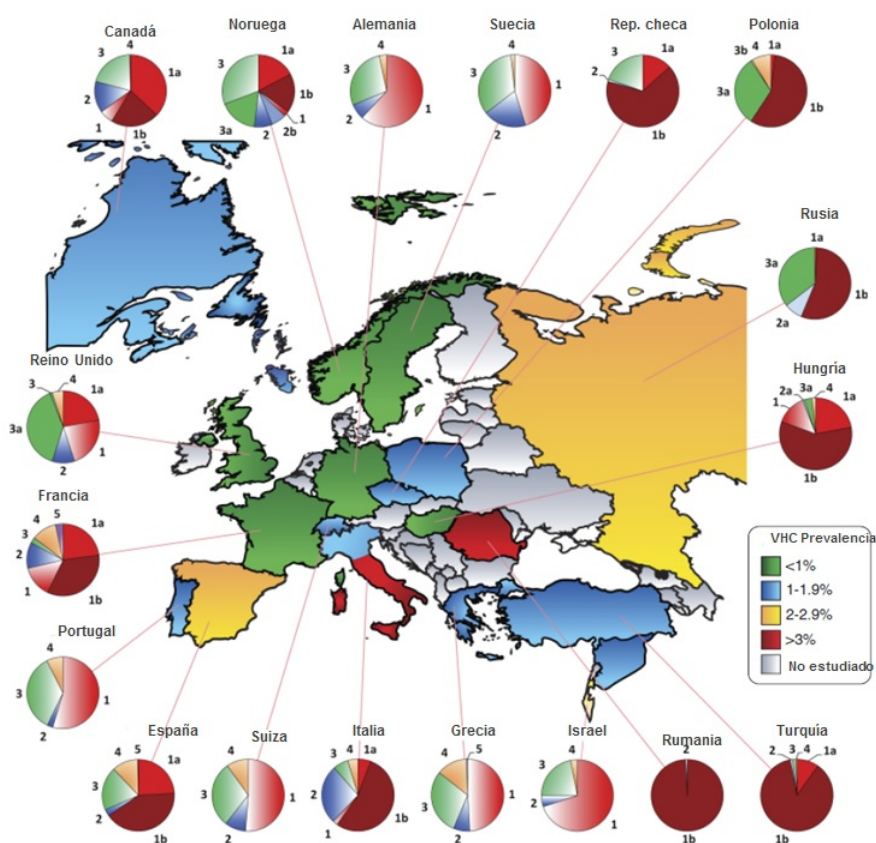


Figura 7. *Distribución geográfica de los genotipos, subtipos y prevalencia del VHC en Europa, Canadá e Israel.* Adaptado de Cornberg et al. 2011.

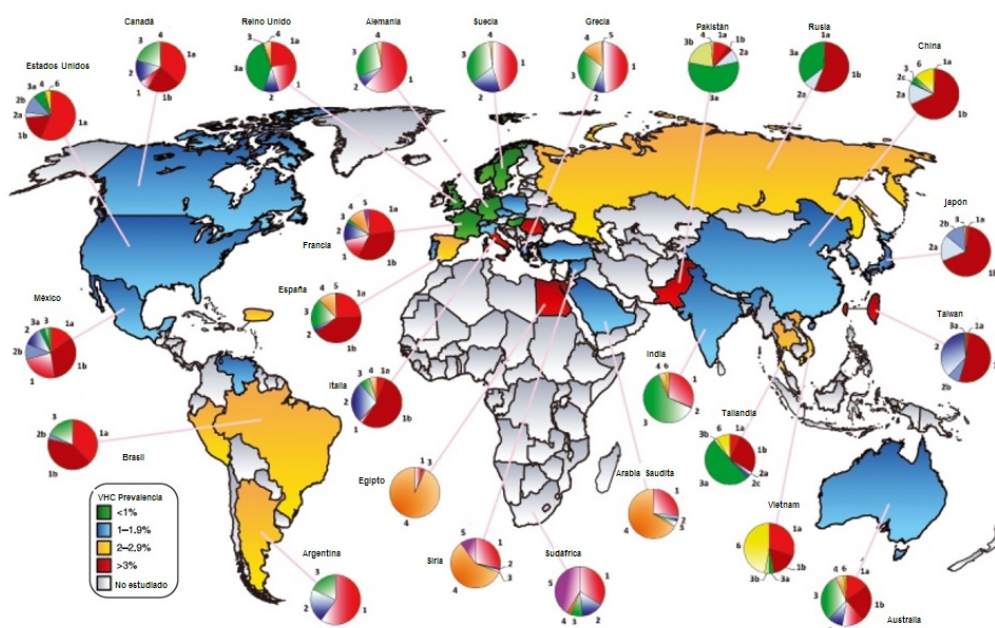


Figura 8. *Distribución geográfica de los genotipos, subtipos y prevalencia del VHC a nivel mundial.* Adaptado de Negro y Alberti 2011.

1.3.4.3. **Recombinación**

Mientras que las formas recombinantes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son frecuentes, para el VHC los recombinantes entre diferentes genotipos/subtipos son escasos. Aunque la recombinación es difícil de detectar, debido a que normalmente se utiliza para la identificación del genotipo/subtipo una única región genómica. Sin embargo, en los últimos años se han identificado recombinantes naturales intergenotípicos e intersubtipicos (1a/1b, 2b/b, 2k/1b, 2i/6p y 2/5), en la región NS2, NS5B y NS3, en la unión NS2-NS3 y en la región NS5A (Kalinina *et al.* 2002, Colina *et al.* 2004, Kageyama *et al.* 2006, Noppornpanth *et al.* 2006, Legrand-Abravanel *et al.* 2007, Moreno *et al.* 2006). Otro estudio identificó casos de recombinación intrasubtipo en el 10% de los pacientes analizados en las regiones E1-E2 y NS5A (Sentandreu *et al.* 2008, Shi *et al.* 2012). La recombinación es un evento potencialmente relevante en la generación de la variabilidad genética en el VHC (González-Candelas *et al.* 2011).

1.3.4.4. **“Cuasiespecies”**

En 1978 Esteban Domingo y sus colaboradores, a partir de un estudio con el bacteriófago Q β , demostraron experimentalmente que una población de virus ARN consiste en una distribución dinámica de genomas mutantes (Domingo *et al.* 1978), compatible con el concepto de cuasiespecie y evolución por la continua producción de copias erróneas (Eigen 1971). Los procesos de evolución neutral y adaptativa del VHC suceden durante la infección aguda y durante el curso de la infección crónica dentro de un individuo, que conduce a la fijación continua de cambios de nucleótidos con el tiempo y al desarrollo de la diversidad de secuencia de grado variable dentro de la población replicante en un tiempo determinado.

El VHC circula *in vivo* como “cuasiespecie”, que es una distribución dinámica de genomas divergentes pero estrechamente relacionados sometidos a un proceso continuo de variación genética, competencia, y selección. La “cuasiespecie” está definida alrededor de una secuencia “master” o consenso, representativa de las variaciones mayoritarias. La aplicación de la teoría de las “cuasiespecies” al comportamiento de los virus ARN es un tema controvertido

entre los biólogos evolutivos, que se basan en el principio de la genética de poblaciones (Holmes y Moya 2002, Holmes 2010). Aunque la población vírica que infecta a un paciente suele presentar niveles elevados de variación genética, independientemente de su denominación como “cuasiespecie” o como variabilidad intra-hospedador (González-Candelas y López-Labrador 2010). Esta heterogeneidad genómica tiene una relevancia biológica y clínica ya que confiere una ventaja notable a la población viral permitiendo una rápida adaptación a un entorno cambiante cuando el virus está sujeto a las restricciones selectivas ejercidas por el huésped, como la inmunidad, o por factores externos, como la terapia antiviral. La gran generación de variantes o “cuasiespecies” representa un desafío para el control de la infección por el VHC y tiene implicaciones importantes en el desarrollo de una vacuna y en la resistencia a antivirales. Un ejemplo es la rápida e independiente aparición reproducible de cambios de aminoácidos específicos asociados con la adquisición de resistencia del VIH-1 a inhibidores de la proteasa y retrotranscriptasa, efecto que se observa también en la infección por VHC durante la monoterapia con la nueva generación de inhibidores específicos de las proteínas del virus.

Para la identificación de las “cuasiespecies” o poblaciones virales circulantes en un individuo infectado con VHC, la técnica de referencia es la clonación de los productos de ADN obtenidos mediante transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), y posterior secuenciación de un determinado número de clones por paciente (Farci y Purcell 2000). Los resultados obtenidos por la técnica de clonación, nos darán una información sobre la heterogeneidad genética de las “cuasiespecies” circulantes en el paciente, descrita mediante el estudio a dos niveles: el número de variantes (número de haplotipos) presente en la población viral del paciente, y lo diferente que son entre ellos (diversidad genética). Existen diferentes opiniones en cuanto al número de clones a secuenciar. Para algunos la secuenciación de 10 variantes virales es suficiente para evaluar las “cuasiespecies” virales presentes en un compartimiento (Torres-Puente *et al.* 2003), para otros, se necesitan 20 clones para tener una representación del 95% de las variantes mayoritarias (frecuencia en la población $\geq 10\%$), sin embargo la mayoría de las variantes minoritarias no serán detectadas (Gretch *et al.* 1996).

Con el desarrollo de las técnicas de pirosecuenciación ultra-profunda (Metzker 2010), también es posible secuenciar una mayor proporción de las variantes víricas existentes de forma rápida, a expensas de obtener unas lecturas de menos de 400 pares de bases (pb). La ultrasecuenciación está siendo utilizada para detectar las variantes minoritarias que pudieran estar implicadas con el desarrollo de resistencias a los antivirales específicas contra el VHC y VIH (Fishman y Branch 2009, Chevaliez *et al.* 2012a; 2012b) (Figura 9).

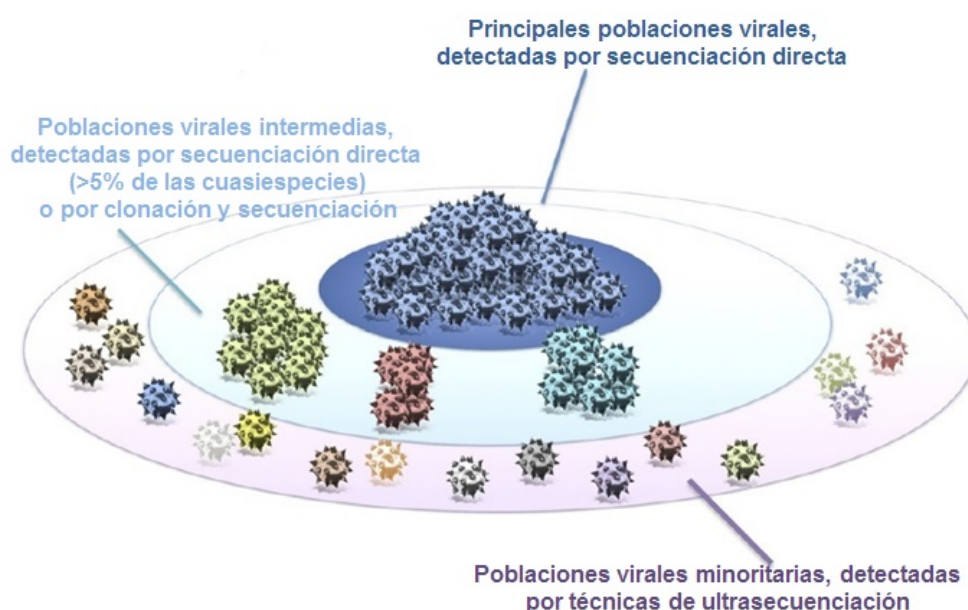


Figura 9. *Distribución de las “cuasiespecies” del genoma VHC y métodos para detectar poblaciones virales mayoritarias (> 10% de las “cuasiespecies” virales), intermedias y minoritarias (<1% de las “cuasiespecies” virales).* Adaptado de *et al.* 2012a.

Algunas poblaciones minoritarias podrían ser potencialmente resistentes a drogas, y podrían estar siempre presentes cuando se inicia una terapia antiviral. Normalmente, en las “cuasiespecies” virales, se suele detectar una variante mayoritaria o “dominante” junto con las variantes que están presentes a frecuencias más bajas. La frecuencia de las distintas variantes depende de su eficacia biológica y factores del huésped (Sarrazin y Zeuzem 2010). Por lo general, la selección de muchas mutaciones tienen un coste para la eficacia biológica (*fitness*), aunque las variantes minoritarias pueden ser rápidamente

seleccionadas durante un cambio ambiental, como la terapia con antivirales, eso no significa que perduren en la población del virus. Los factores que influyen en desarrollo de resistencias (Figura 10) incluyen: a) el número de las mutaciones necesarias para introducir el cambio de aminoácido, b) *fitness* del virus variante, c) la frecuencia de la variante dentro de la “cuasiespecie”, d) el nivel de resistencia que confiere, e) la potencia y biodisponibilidad del agente antiviral, y f) el nivel de presión selectiva del sistema inmune, que puede provocar mutaciones de escape inmunológico que, de forma indirecta, causen resistencias (Thompson y McHutchison 2009).

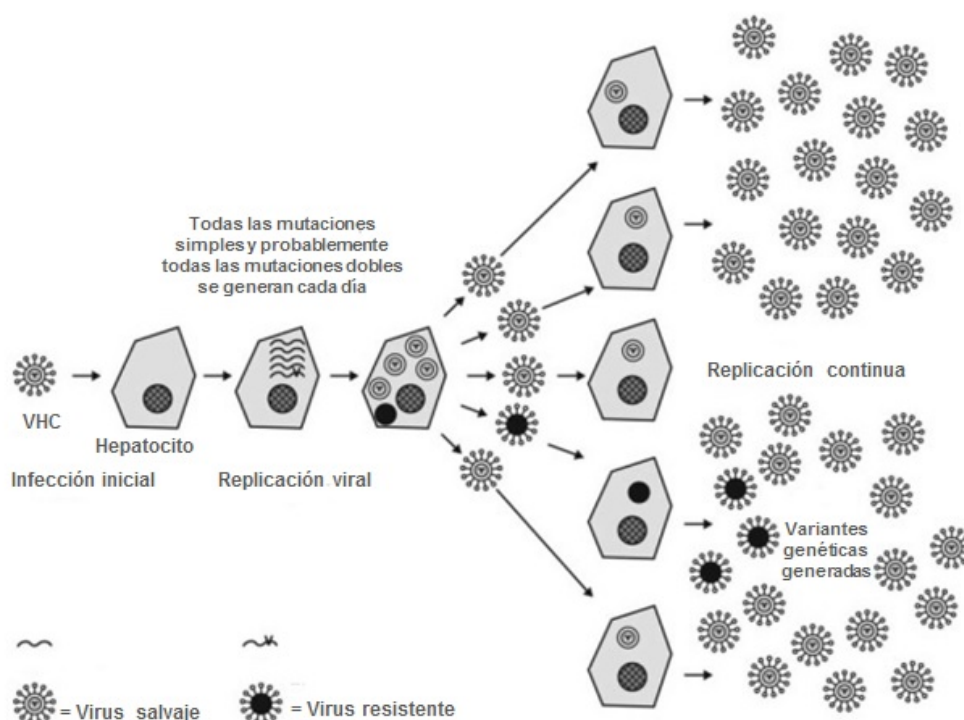


Figura 10. **Generación de variantes virales de tipo salvaje y resistente, característica inherente de la infección por VHC.** Después de la infección inicial de un hepatocito, el VHC comienza a replicar y con una frecuencia de $\approx 10^4$ la polimerasa viral incorporará un nucleótido erróneo en el ARN, generando variantes virales. Cuando la mutación se produce en un sitio que se asocia con la resistencia a los antivirales, la variante generada puede ser resistente al antiviral. Con altos niveles de replicación en un paciente no tratado, surgen al menos una vez cada día mutaciones puntuales en cada posición del genoma, generándose constantemente virus potencialmente resistentes. Por lo tanto, la mayoría de las variantes resistentes a los fármacos probablemente pre-existen dentro de las “cuasiespecies” virales y se seleccionan desde dentro de este entorno heterogéneo después de la aplicación de la presión selectiva de los fármacos. Adaptado de Lang 2007.

1.4. El ciclo infeccioso del VHC

El VHC infecta solamente a chimpancés y humanos, circula en suero de varias formas, viriones maduros libres, viriones unidos a inmunoglobulinas, nucleocápsides sin envuelta, y viriones físicamente asociados a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o de muy baja densidad (VLDL) representando la fracción infecciosa, denominada lipoviripartícula (LVP) (André *et al.* 2002, Merz *et al.* 2011). El VHC se replica principalmente en el citoplasma del hepatocito siguiendo los pasos claves en su ciclo de infección (Figura 11): 1) Las lipoviripartículas (LVP) del VHC entran en el hepatocito a través de endocitosis mediada por receptores. 2) La proteína de la cápside y el genoma viral son liberados en el citoplasma de la célula infectada. 3) La poliproteína es procesada co- y post-traduccionalmente mediante proteasas celulares y virales para obtener 10 proteínas virales maduras. 4) La cadena positiva de ARN se replica por la ARN polimerasa dependiente de ARN a través de un intermedio de cadena negativa, las nuevas moléculas de ARN son estabilizadas mediante la unión del miR-122. 5) La cadena positiva de ARN

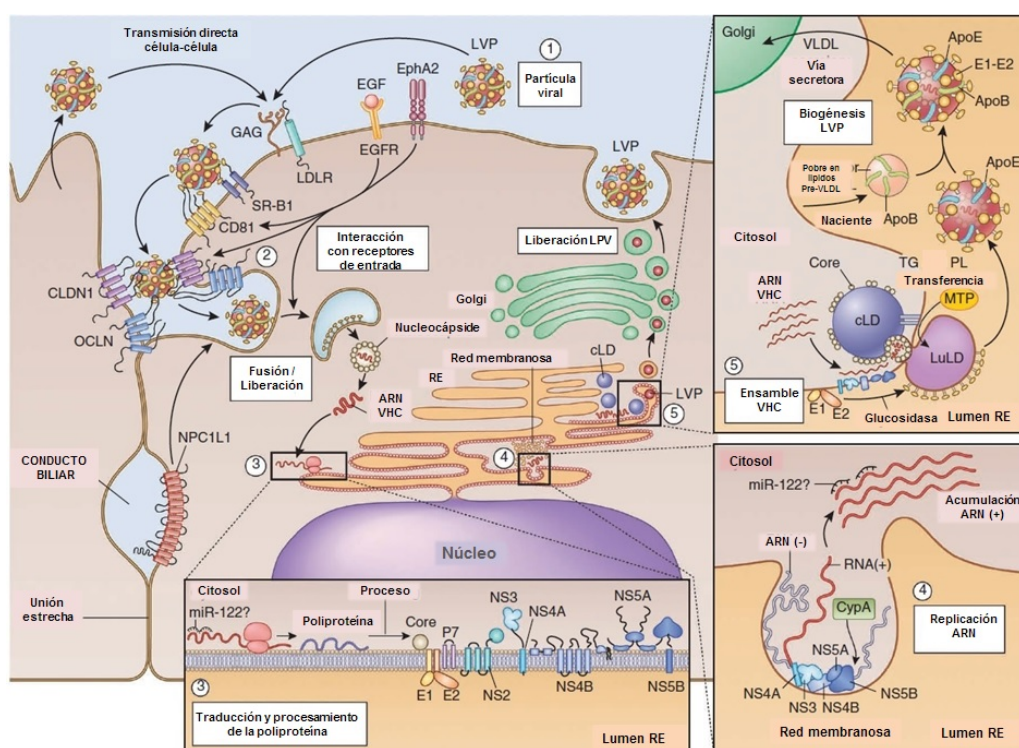


Figura 11. **Ciclo de infección del VHC.** 1) Entrada a la célula, 2) liberación del genoma, 3) traducción y 4) replicación, seguido del 5) ensamble, maduración de la partícula viral y liberación de los nuevos viriones. Adaptado de Scheel y Rice 2013 .

recién sintetizada se encapsida en la nucleocápside viral (core) en estrecha proximidad a las gotas lipídicas, y las glicoproteínas de la envoltura se adquiere a través de gemación en el lumen del retículo endoplasmático. Las lipoviropartículas maduran en el retículo endoplasmático a través de interacciones con lipoproteínas, y salen de la célula a través de la ruta secretora por el aparato de Golgi y finalmente se liberan nuevos viriones.

1.4.1. *Tropismo, receptores y entrada*

Los hepatocitos son las principales células diana pero también pueden ser infectadas por el VHC las Células B, células del neuroepitelioma, células endoteliales de la barrera hematoencefálica, células dendríticas y otros tipos celulares (Pileri *et al.* 1998, Morsica *et al.* 1999, Fletcher *et al.* 2010; 2012). Sin embargo la relevancia y replicación del VHC en los tejidos extrahepáticos es objeto de controversia (Lanford *et al.* 1995, Navas-Martin *et al.* 1998, Laskus *et al.* 1998). El virus infecta a los hepatocitos a través de receptores y co-receptores de entrada. La lipo-viro partícula se une a moléculas de unión: los glicosaminoglicanos (GAG) como el heparán sulfato (HS) (Barth *et al.* 2003), la lectina de superficie denominada molécula no-integrina 3-fijadora de adhesión intercelular específica (DC-SIGN) y específica del hígado (L)-SIGN (Cormier *et al.* 2004). La lipo-viro partícula es transferida al receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI; Scarselli *et al.* 2002, Bartosch *et al.* 2003) y a la proteína CD81 (Pileri *et al.* 1998) a través de la unión a E2 y luego entra en las células por endocitosis mediada por vesículas revestidas de clatrina, interaccionando con claudina (CLDN): CLDN1, CLDN6 y CLDN9 (Timpe *et al.* 2008, Evans *et al.* 2007, Meertens *et al.* 2008, Zheng *et al.* 2007), ocludina (OCLN) (Benedicto *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009, Ploss *et al.* 2009). El receptor de absorción del colesterol Niemann-Pick C1- like 1 (NPC1L1) es un nuevo factor de entrada (García-Calvo *et al.* 2005, Sainz *et al.* 2012), así como el receptor 1 de la transferrina (TfR1). Se sabe que el VHC altera la expresión del receptor de captación de hierro el receptor 1 de transferrina (TfR1) (Martin *et al.* 2013). La fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática forma un endosoma bajo una condición de pH bajo (Takikawa *et al.* 2000, Hsu *et al.* 2003, Blanchard *et al.* 2006, Codran *et al.* 2006, Meertens *et al.* 2006,

Tscherne *et al.* 2006). La proteína de la cápside y el genoma viral son así liberados en el citoplasma de las células infectadas para empezar la traducción y la replicación de su genoma en el citosol.

1.4.2. **Traducción**

El VHC utiliza un sistema Cap-independiente basado en IRES para la traducción de la poliproteína. (Wang *et al.* 1993) y el genoma viral actúa directamente como ARNm (Tsukiyama-Kohara *et al.* 1992, Lohmann *et al.* 1999). La poliproteína es procesada co- y post-traduccionally para obtener las 10 proteínas virales maduras mediante proteasas celulares y virales (ver apartado 1.3.3. Organización genómica).

1.4.3. **Replicación del genoma**

El genoma del VHC se replica mediante la síntesis de una cadena de ARN complementaria de polaridad negativa, o antigenómica (intermediario de replicación) que sirve como molde para la nueva síntesis del ARN viral de cadena positiva, en el complejo de replicación. La replicación está íntimamente relacionada con lípidos. La cápside se asocia con lípidos intracelulares (Barba *et al.* 1997, Hope y McLauchlan 2000, Shavinskaya *et al.* 2007) y recluta las proteínas no estructurales (Miyanari *et al.* 2007). Las células infectadas acumulan vesículas para formar una red membranosa, que se cree sería el complejo de replicación (Bartenschlager *et al.* 2011). Varios cofactores del huésped intervienen en la replicación, entre ellos la fosfatidilinositol 4 - quinasa IIIa (PI4K-IIIa) (Berger *et al.* 2009, Tai *et al.* 2009, Vaillancourt *et al.* 2009, Borawski *et al.* 2009, Trotard *et al.* 2009, Li *et al.* 2009, Hsu *et al.* 2010, Reiss *et al.* 2011). El miR-122 (Henke *et al.* 2008, Roberts *et al.* 2011, Jopling *et al.* 2005, Randall *et al.* 2007, Jopling 2008), y finalmente la ciclofilina A (CypA) (Wang *et al.* 2005, Yang *et al.* 2008a, Kaul *et al.* 2009, Chatterji *et al.* 2009).

1.4.4. *Ensamblaje y liberación de partículas víricas*

Las nuevas partículas virales son co-ensambladas con lipoproteínas VLDL (Boulant *et al.* 2006, Icard *et al.* 2009) que incluyen apoB (Jiang y Luo 2009, Icard *et al.* 2009) apoE, y triglicéridos microsomales de transferencia proteica (Huang *et al.* 2007, Gastaminza *et al.* 2008). La apoE intracelular, también se requiere para la producción de partículas virales infecciosas (Chang *et al.* 2007, Jiang y Luo 2009, Benga *et al.* 2010). La partícula viral es secretada a través de una vía de secreción, aunque el mecanismo es poco conocido (Boulant *et al.* 2007, Miyanari *et al.* 2007, Lanford *et al.* 2009). El ensamblaje de la nucleocápside implica la oligomerización de la proteína *core* y la encapsidación del genoma que se libera de la red membranosa y pasa a la proteína *core* viral a través de NS5A (Masaki *et al.* 2008). La proteína *core* es translocada en la superficie de las gotitas lipídicas o en RE, luego se encierra el genoma viral para formar una nucleocápside cerca de la red membranosa (Miyanari *et al.* 2007, Boson *et al.* 2011). El canal iónico dependiente de calcio (viroporina), P7, es necesario para los pasos finales del ensamblaje de la cápside, así como para su asociación con proteínas de la envoltura (Gentzsch *et al.* 2013) en una membrana endoplásmica que formará la envoltura viral, y que luego es liberada al lumen del RE (Miyanari *et al.* 2007, Vieyres *et al.* 2010) (Figura 12).

La maduración de las partículas virales se producirá al brotar las nucleocápsides hacia el interior, adquiriendo de esa forma la envuelta. Las partículas virales completas son liberadas fuera de la célula a través de la ruta secretora (Golgi). Varios factores del huésped probablemente participan en el ensamblaje, incluido el adaptador de clatrina AP2M1 (Neveu *et al.* 2012) y el grupo IVA fosfolipasa A2 (PLA2G4A) (Menzel *et al.* 2012), y la diacilglicerol aciltransferasa-1 (DGAT1) (Herker *et al.* 2010).

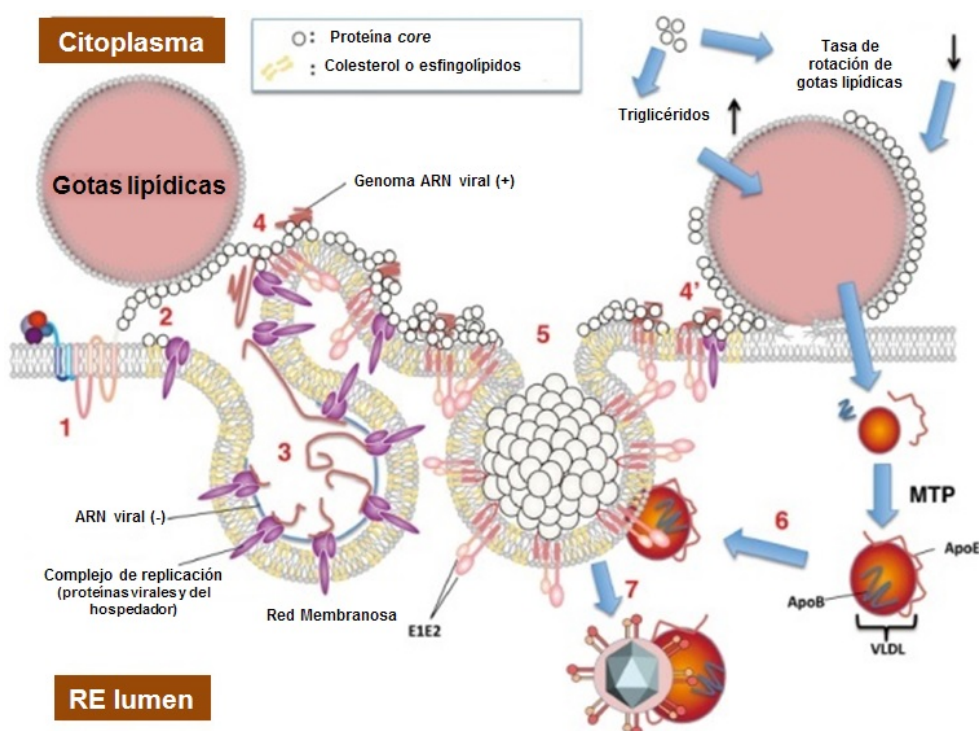


Figura 12. **Replicación del ARN del VHC y producción de partículas virales en la membrana del RE y en las gotas lipídicas.** (1) El ARN genómico se traduce a una poliproteína seguido por la escisión de la poliproteína. (2) Las proteínas no estructurales forman un complejo de replicación con factores del huésped. La core se transloca a las gotas lipídicas por DGAT1 y se mantiene en la membrana del RE mediante la cooperación con las proteínas no estructurales. (3) NS4B induce una invaginación de la membrana del RE que intervendrá en la replicación viral. Son sintetizados por el complejo de replicación cadenas del ARN viral (-) y (+). (4) El ARN genómico de cadena (+) se asocia a las proteínas core, cooperando las proteínas no estructurales. Proteínas de la envoltura, NS2 y p7 pueden determinar el reclutamiento de la proteína core, de las gotas de lípidos a la membrana RE junto a microtúbulos. (5) Las proteínas core encierran el genoma de ARN viral, y son rodeadas por la envuelta lipoproteica. Las proteínas no estructurales y otros factores pueden apoyar la formación de la nucleocápside y brotación. (6) Las VLDL se unen a la partícula viral para formar la lipovirpartícula (LVP) antes o después de la brotación. Finalmente (7) las LVP egresan en el lumen del RE con VLDL. Adaptado de Moriishi y Matsuura 2012.

1.4.5. **Compartimentación**

El hígado es el sitio principal de la replicación del VHC, pero también se ha detectado replicación en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP): monocitos/macrófagos, linfocitos B, granulocitos, células dendríticas y en otros tejidos extrahepáticos (Manzin *et al.* 1994, Wang *et al.* 1992, Saleh *et al.* 1994, Chang *et al.* 1996, Sansonno *et al.* 1996, Morsica *et al.* 1999, Blackard *et al.* 2006). Aunque algunos autores propagaron el virus en cultivos

de células linfoides y el virus derivado fue infeccioso (Shimizu *et al.* 1992; 1998) esos resultados fueron poco reproducibles. El ARN del VHC (tanto genómico como antigenómico) se ha detectado en CMSP de pacientes con hepatitis C crónica (Artini *et al.* 1993, Bartolomé *et al.* 1993, Muratori *et al.* 1994, Navas-Martin *et al.* 1994, Zignego *et al.* 1992, Roque-Afonso *et al.* 2005, Lerat *et al.* 1998, Castillo *et al.* 2004), pero la replicación en tejido extrahepático es controvertido (Lanford *et al.* 1995), aunque diferentes “cuasiespecies” del VHC se segregan en diferentes territorios como el tejido hepático, CMSP, suero (Navas-Martin *et al.* 1998), ganglios linfáticos (Pal *et al.* 2006), médula (Sansonno *et al.* 1996) y en el cerebro (Maggi *et al.* 1999) a veces de manera no aleatoria entre los diferentes sitios de replicación (Roque-Afonso *et al.* 1999) y los compartimentos se caracterizan por una restricción del flujo viral entre ellos debido al aislamiento físico de un tejido o tipo celular en particular (Nickle *et al.* 2003). Los tejidos infectados, diferentes al hígado, serían los reservorios del virus, por el cual el VHC escapa del sistema inmunitario y elude su erradicación lo que lleva a su persistencia y/o reactivación de la infección después de la terapia antiviral o trasplante hepático (Fuentes *et al.* 2008).

1.5. Epidemiología de la infección por VHC

Se estima que 200 millones de pacientes en todo el mundo están infectados con el VHC y que aproximadamente 130-150 millones (3% de la población mundial) vive con hepatitis C crónica (OMS 2014). Alrededor de 3-4 millones de personas son infectadas por año, y más de 350.000 personas mueren cada año a partir de enfermedades relacionadas con la hepatitis C (OMS 2014).

La seroprevalencia de la infección del VHC varía geográficamente. El VHC tiene una incidencia de 8,7 por 100.000 en los Estados miembros de la Unión Europea (UE) con alta prevalencia en usuarios de drogas inyectables (OMS 2012). Se estima que hay 2-5 millones de personas infectadas con VHC en Europa (Figura 13). La incidencia ha tendido a aumentar durante los últimos años, además la inmigración desde áreas con mayor prevalencia ha contribuido al incremento de la prevalencia en Europa (Rantala y van de Laar 2008). En España la prevalencia varía entre el 1,6-2,6% (750.000-1.200.000 personas

infectadas) (Bruguera y Forns 2006), la alta prevalencia se debe a la propagación iatrogénica en la población de edad avanzada que tuvo lugar hace más de medio siglo, seguido 3 décadas más tarde por otro aumento de la prevalencia en individuos jóvenes por la adicción a drogas por vía parenteral. Además en España el incremento también ha sido debido principalmente a la inmigración procedente de África Subsahariana, Asia y Pakistán, donde la prevalencia es muy elevada (9-11%) (Esteban *et al.* 2008).

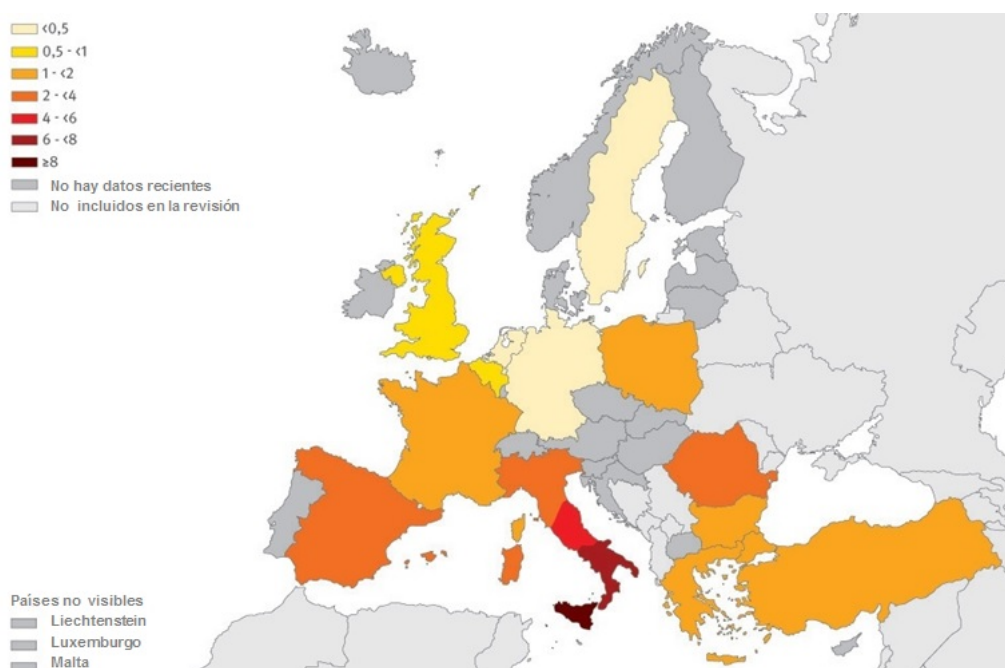


Figura 13. *Prevalencia estimada del VHC en la población general Europea.* Technical report ECDC-2010.

Las tasas han disminuido en el mundo occidental desde la década de 1990 debido a la detección del VHC en sangre antes de la transfusión (Ozaras y Tahan 2009). En los EE.UU. se estima un aumento significativo del 24% en la prevalencia de cirrosis y carcinoma hepatocelular de los casos reportados en ese país (Kanwal *et al.* 2011, Davis *et al.* 2010). El VHC causa el 27% de las cirrosis y el 25% de los casos de carcinoma hepatocelular en el mundo, y principal causa de trasplante hepático de EE.UU. y Europa occidental (Perz y Alter 2006, Seeff y Hoofnagle 2003, Prieto *et al.* 1998).

En Europa la alta prevalencia de la infección de VHC se registra con un 53 % en el grupo de 25 y 44 años de edad, y el 64,4% son hombres (Te y Jensen 2010).

1.5.1. *Vías de transmisión, prevalencia, morbilidad y mortalidad*

El único reservorio conocido es el ser humano. La transmisión del VHC es fundamentalmente parenteral y particularmente en niños la vía puede ser vertical (madre-hijo), y en los casos de co-infección con VIH el riesgo de transmisión puede alcanzar al 15% dado que las cargas virales son más elevadas (ECDC 2012), aunque la transmisión del VHC a través del contacto sexual o de madre a hijo es ineficiente y poco frecuente (Wasley y Alter 2000, Pradat y Trépo 2000, Thomas *et al.* 2000).

La adicción por vía intravenosa es la principal ruta actualmente de transmisión del VHC, con una prevalencia del 70-90% en este grupo de riesgo (Drucker *et al.* 2001, Pybus *et al.* 2001, Cochrane *et al.* 2002, Armstrong *et al.* 2006). La transfusión de sangre o de hemoderivados, constituye la segunda causa de transmisión, con una prevalencia del 10% en este grupo de pacientes. Actualmente el riesgo de transmisión por transfusión es de 1/2.000.000 unidades (CDC 2011). La transmisión dentro de la unidad de hemodiálisis parece ser el mecanismo principal de la infección nosocomial por VHC (Forns *et al.* 1997).

Finalmente, el trasplante de órgano sólido a partir de donantes infectados (Pereira *et al.* 1991) es otra causa de infección por VHC, junto con las prácticas médicas no seguras (Martínez-Bauer *et al.* 2008, Bronowicki *et al.* 1997) la exposición ocupacional a sangre infectada y, posiblemente, la realización de tatuajes, *piercing* y acupuntura (Yen *et al.* 2003, Hwang *et al.* 2006). La transmisión por vía sexual en personas con múltiples parejas, es mayor que en parejas monógamas, siendo el riesgo elevado cuando se transmite junto con el VIH (Yen *et al.* 2003, Terrault 2002). La seroprevalencia del VHC en HSH (hombres que tienen relaciones sexuales con hombres) oscila entre 4 y 8%, siendo mayor que la prevalencia del VHC en la población europea en general (Boesecke y Vogel 2011).

1.6. Historia natural de la hepatitis C

El VHC inicia su ciclo de replicación en los hepatocitos, causando hepatitis aguda, suele pasar generalmente desapercibida en un 70-80% de las personas infectadas siendo asintomática y en un 10-20% cursa con síntomas inespecíficos (astenia, anorexia, dolor en el hipocondrio derecho) dentro de los primeros tres a seis meses de iniciada la infección. El período de incubación puede variar entre 14 a 180 días (promedio 6-7 semanas) (CDC 1998). Entre el 10-15% de los pacientes infectados resuelven favorablemente la infección, en los que el ARN-VHC en suero se vuelve indetectable y los niveles de Alanina transaminasa (ALT) retornan a la normalidad, pero la mayoría de los individuos VHC positivos (> 80%) desarrollan una infección persistente a pesar de la presencia de anticuerpos séricos contra el mismo y de una respuesta de las células T citotóxica antiviral multi-específica. La mayoría de estos individuos evolucionan hacia la cronicidad, padecerán de fatiga y presentarán niveles séricos de ALT elevados o fluctuantes, mientras que un tercio presentará niveles persistentes normales, a pesar de la viremia y la lesión hepática continua. Una vez establecida la infección crónica, de ellos un 10% desarrolla insuficiencia hepática, 20% muestra signos de cirrosis en un período de 15 años desde su infección, el 13-15% desarrolla una descompensación hepática y entre el 2-7% sufre un hepatocarcinoma celular. La mortalidad global oscila del 4-9% y el estadio terminal de la infección crónica por VHC es una de las principales indicaciones de trasplante hepático (Figura 14) (Block *et al.* 2003, Lauer y Walker 2001, Pawlotsky 2004). Desafortunadamente, la infección crónica recurrente se establece de manera prematura en el órgano trasplantado, y se acelera la progresión de la enfermedad (Blackard *et al.* 2008, Fuentes 2008).

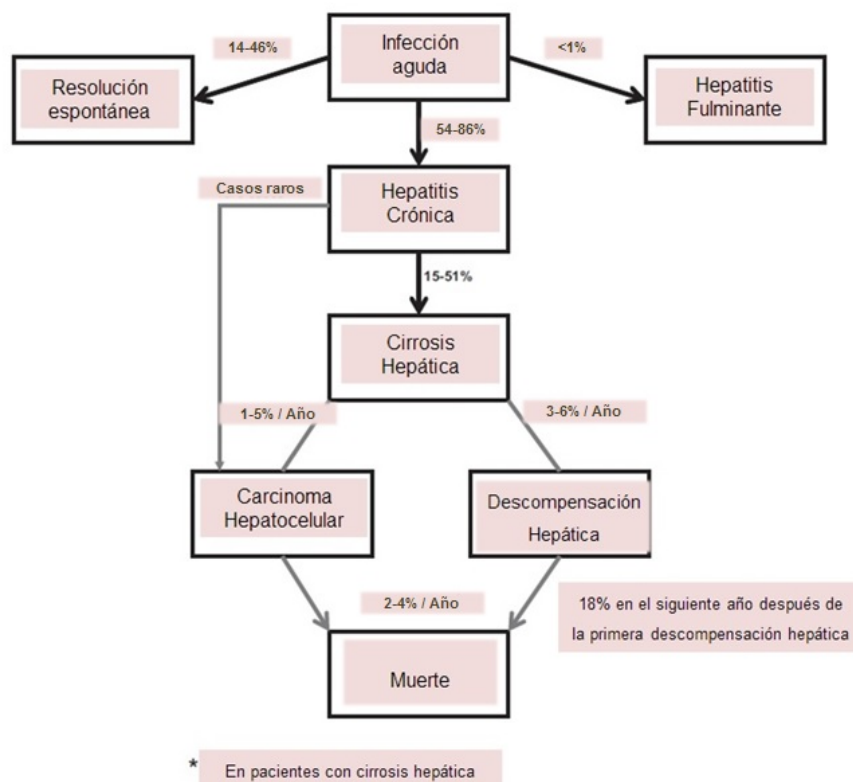


Figura 14. *Historia Natural del VHC*. Adaptado de Maasoumy y Wedemeyer 2012.

Tras la exposición al virus, el ARN-VHC puede ser detectado en suero entre la y 2a semana. Los niveles séricos de ALT (indicador indirecto de inflamación hepática) aumentan hasta 10 veces superior a lo normal 2-8 semanas después de la exposición al virus, debido a la lisis de los hepatocitos infectados mayoritariamente por los linfocitos T CD8⁺ específicos, generalmente con un patrón fluctuante (Figura 15).

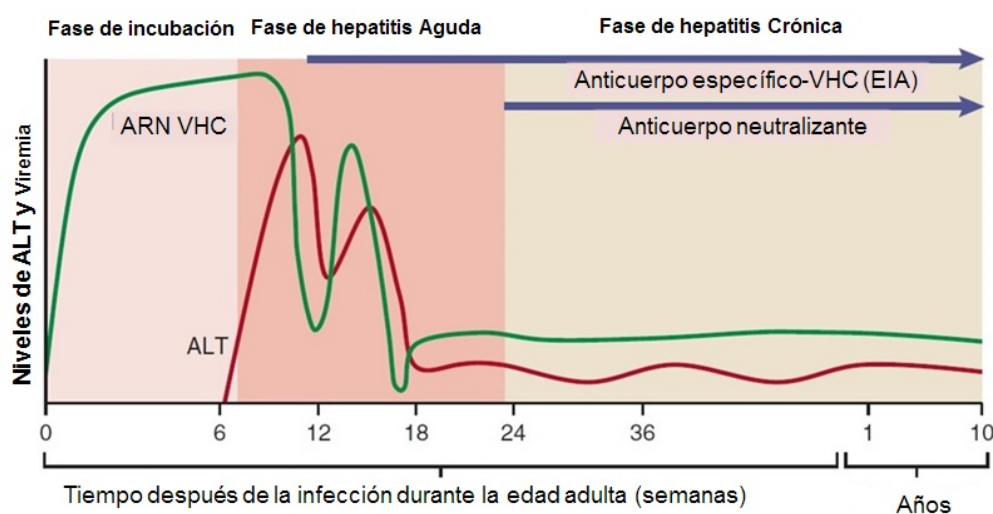


Figura 15. *Marcadores serológicos en infección con VHC*. Adaptado de Rehmann 2013.

Entre los pacientes con infección crónica, el riesgo de cirrosis tras 20 años de infección varía entre 10-15% para los hombres y 1-5% para las mujeres, la razón de esta diferencia no se conoce, algunos estudios muestran estimaciones de hasta al 50% (Poynard *et al.* 1997; 2000, Wiese *et al.* 2005, Sangiovanni *et al.* 2006). Una vez que se establece la cirrosis, la tasa de desarrollo de carcinoma hepatocelular es de 1-4% por año (Yu y Chuang 2009).

1.6.1. *Patogenia de la hepatitis C crónica*

Tras la infección aguda, las células T específicas del VHC son normalmente detectables 5-9 semanas después de la infección (Thimme *et al.* 2001; 2002), y los anticuerpos específicos del VHC son detectados 8-20 semanas después de la infección. (Logvinoff *et al.* 2004). El título de anticuerpos se reduce en 10-20 años, aunque la respuesta específica de las células T CD4⁺ y CD8⁺ persiste incluso después de varias décadas. (Nelson *et al.* 1997, Cooper *et al.* 1999, Spangenberg *et al.* 2005, Rehmann y Nascimbeni 2005). La respuesta inmune del hospedador juega un papel importante en el control de la infección, pero también en el daño hepático y son principalmente los linfocitos T CD8⁺, quienes participan en la destrucción hepatocelular, como así también otras células mononucleares y las células *natural killer*. El VHC no ejerce un efecto citopático sobre los hepatocitos. Una de las principales características de la infección por el VHC es el retraso de la respuesta inmune a pesar del temprano aumento de la viremia y la inducción de *IFN-stimulated genes* (ISGs). Una disfunción en la inducción de ISGs junto con los defectos funcionales de las células T, perpetúan un estado de activación inflamatoria que, sin embargo es incapaz de eliminar al virus.

1.7. *Diagnóstico*

La presencia de anticuerpos contra el VHC indica que una persona ha sido infectada. El diagnóstico de la infección crónica se realiza cuando los anticuerpos para el VHC están presentes en la sangre durante más de seis meses. La infección aguda a menudo no es sintomática, y los anticuerpos IgG anti-VHC suelen ser negativos durante la fase aguda y la infección sólo se puede determinar detectando en suero el ARN del VHC (Hsu *et al.* 1994,

Pawlotsky 1999, Pawlotsky *et al.* 1999). Otras pruebas útiles para integrar la presunción diagnóstica, son las pruebas de funcionalidad hepática, los niveles elevados de las enzimas ALT y AST (aminotransferasa de aspartato), y la FA (fosfatasa alcalina) y la GGT (gamma glutamil transferasa), indicadoras de daño hepático y alteraciones del tracto biliar, así como otras anomalías (Esteban 1999; 2000).

1.7.1. **Diagnóstico serológico**

1.7.1.1. **Elisa**

El ELISA, método de diagnóstico indirecto serológico basado en el estudio de la respuesta inmune específica frente al VHC mediante la detección de anticuerpos circulantes, que se utiliza como cribado y diagnóstico de primera línea. Indica exposición al virus sin diferenciar infección aguda, crónica o resuelta.

1.7.1.2. **Pruebas confirmatorias**

Las pruebas confirmatorias de los resultados positivos del ELISA basadas en la técnica de "Western blot", también conocido Recombinant immunoblot assay (RIBA-3) de tercera generación, como han quedado obsoletas debido a la mejora de la sensibilidad de los sistemas de ELISA de tercera generación y a la aparición de técnicas de detección del ARN-VHC circulante que tienen una elevada sensibilidad y especificidad (Chevaliez y Pawlotsky 2009a; 2009b, Lange y Sarrazin 2010).

1.7.2. **Diagnóstico virológico**

Se basa en la detección de componentes virales, como diferentes fragmentos del genoma del VHC (ARN-VHC) o determinadas proteínas virales, esto implica la existencia de replicación vírica activa. Las técnicas de diagnóstico molecular permiten una detección tanto cualitativa como cuantitativa del ARN-VHC circulante en suero, plasma o tejido.

1.7.2.1. **Diagnóstico cualitativo (ARN-VHC)**

El ARN-VHC es detectable entre la primera y segunda semana después de la infección, y se utiliza para monitorizar la respuesta al tratamiento de la

infección crónica por VHC y predecir precozmente la respuesta virológica sostenida (RVS), también para el diagnóstico durante el periodo de ventana serológico, para detectar la infección en pacientes inmunocomprometidos que no hayan desarrollado la repuesta inmune, y para el diagnóstico precoz en la infección perinatal. Los ensayos comerciales actualmente disponibles son (1) RT-PCR cualitativa: COBAS[®] AmpliCor VHC y COBAS[®] Ampliprep/COBAS[®] AmpliCor VHC (Roche Molecular Diagnostics, EE.UU.), que permite la detección de concentraciones de hasta 50 UI/ml de todos los genotipos del VHC, y COBAS[®] Ampli-Screen VHC que permite detectar <10 UI/ml. (2) Versant[™] ARN-VHC *Qualitative Assay* (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY- EE.UU.), es otro ensayo comercial disponible que se basa en la amplificación mediada por transcripción (TMA), tiene una especificidad de 99,6% y una alta sensibilidad en la detección del ARN-VHC (límite inferior de detección es de 5-10 UI/ml), sensibilidad extremadamente superior a la RT-PCR cualitativa.

1.7.2.2. *Diagnóstico cuantitativo (viremia)*

Las técnicas cuantitativas permiten cuantificar la carga vírica basal y evaluar la presencia de respuesta virológica temprana (RVT) a las 12 semanas del tratamiento. La RT-PCR en tiempo real es la técnica de elección para detectar y cuantificar el ARN-VHC en la práctica clínica (Chevaliez y Pawlotsky 2009a; 2012a, Lange y Sarrazin 2010, Aguilera *et al.* 2010).

La detección cuantitativa del antígeno *core* del VHC con la técnica ELISA, se utiliza para el diagnóstico precoz de la infección aguda, pero la desventaja de este método es que tiene una sensibilidad menor al 95% (niveles de ARN-VHC inferiores a 20.000UI/ml no detecta), y una especificidad cercana al 100% que las técnicas de diagnóstico molecular, pero su coste-eficacia, facilidad de utilización y ausencia de contaminantes hacen que sea una alternativa para la detección de viremia en zonas geográficas donde no disponen de la tecnología molecular (Seme *et al.* 2005, Ross *et al.* 2010). El ensayo Architect[®] VHC Ag (Abbott Diagnostics) es un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas comercialmente disponible.

1.7.2.3. *Genotipado del VHC*

El genotipo de VHC que ha infectado al paciente, es un factor importante para tener en cuenta que tipo de tratamiento va recibir, ya que determina el tiempo (generalmente puede ser más corto para los pacientes infectados con los genotipos 2 o 3 en comparación con los pacientes infectados con los genotipos 1 o 4 (Manns *et al.* 2006), el fármaco, la dosis y la probabilidad de responder al tratamiento antiviral (Guía EASL 2014). En cuanto al significado clínico a nivel de subtipo está teniendo importancia con la triple terapia que actualmente se trata de establecer, en aquellos pacientes que no responden al tratamiento estándar actual y en aquellos pacientes naïve genotipo 1, con los nuevos antivirales de acción directa (AAD) en desarrollo (Guía EASL 2014). Finalmente el genotipo del VHC es relevante para el tratamiento con PEG-IFN- α y ribavirina con agentes antivirales de acción directa (Scheel y Rice 2013).

La determinación del genotipo del VHC, basada en la secuenciación de la región no codificante 5' NC o de la región NS5B, mediante técnicas *in house* seguido de un análisis filogenético de las secuencias obtenidas junto a las secuencias prototípicas, es considerada la técnica de referencia, pero su complejidad técnica hace que solo en centros con personal cualificado puedan utilizarla (OMS_VHC_Guía 2014).

Aunque la región 5'NC es altamente conservada entre los genotipos, pero con diferencias en la secuencia de nucleótidos específicas para cada genotipo y los principales subtipos, la discriminación de ciertos genotipos (aislados del genotipo 6 han sido identificados como genotipo 1) y entre subtipos (1a *versus* 1b y 2a *versus* 2c) no siempre es fiable al utilizar esta región. Esto se debe a la elevada homología que presentan entre sus secuencias; los subtipos 1a y 1b difieren en un nt (A/G) en la posición 99 y los subtipos 2a y 2b en dos nt en la posición 124 y 164 respectivamente. Sin embargo, la secuencia de la región *core* o NS5B es más fiable ya que tienen una variabilidad genética suficiente para poder diferenciar entre subtipos (Martró *et al.* 2008, Chevaliez y Pawlotsky 2009a; 2009b).

1.8. Tratamiento de la hepatitis C crónica

El objetivo del tratamiento es la erradicación del virus, que normalmente equivale a una respuesta virológica sostenida (RVS) ausencia de ARN-VHC en suero (<50UI/ml) 6 meses después de finalizada la terapia. De esta manera se consigue mejorar la calidad de vida del paciente, ya que se normalizan las pruebas de función hepática, se reduce la inflamación o fibrosis del hígado y en consecuencia se detiene la progresión de la enfermedad a cirrosis o carcinoma hepatocelular reduciendo así la mortalidad (Ghany *et al.* 2009, Backus *et al.* 2011, Veldt *et al.* 2007). Todos los pacientes infectados crónicamente por VHC son candidatos a recibir el tratamiento antiviral. El tratamiento estándar ha sido hasta hace muy poco, la combinación de dos fármacos no específicos inmunomoduladores, el peg-IFN- α (interferón α al que se le ha incorporado una molécula de polietilen-glicol para mejorar su farmacocinética: peg-IFN- α -2b [PEG-Intron®, Merck] o peg-IFN- α -2a [PEGASYS®, Roche]) y la ribavirina (RBV) un análogo de la guanosina [1- β -D-ribofuranosil-1H-1,1,4-triazol-3-carboxamida] sintetizado en 1970 por investigadores de la ICN Pharmaceuticals (ahora Valeant Pharmaceuticals International) (Thomas *et al.* 2012, Ghany *et al.* 2009, McCaughan *et al.* 2007, de Bruijne *et al.* 2008, AISF/SIMIT/SIMAST 2010, Sarrazin *et al.* 2010, Jain y Zoellner 2010) , aunque el 50% de los pacientes no eran tratados por diferentes causas como edad avanzada, cirrosis descompensada, comorbilidades o negativa del paciente por los efectos adversos de la terapia (EASL 2011, AASLD 2011), ya que el tratamiento está frecuentemente asociado con morbilidad significativa. Durante el tratamiento, la cinética viral sigue una curva con varias fases (Figura 16). La pendiente pronunciada en la primera fase depende de la inhibición de la replicación viral, y la segunda depende de la eliminación de las células infectadas. Se observa pendientes más pronunciadas en los genotipos 2 ó 3 que el genotipo 1 (Feld y Hoofnagle 2005).

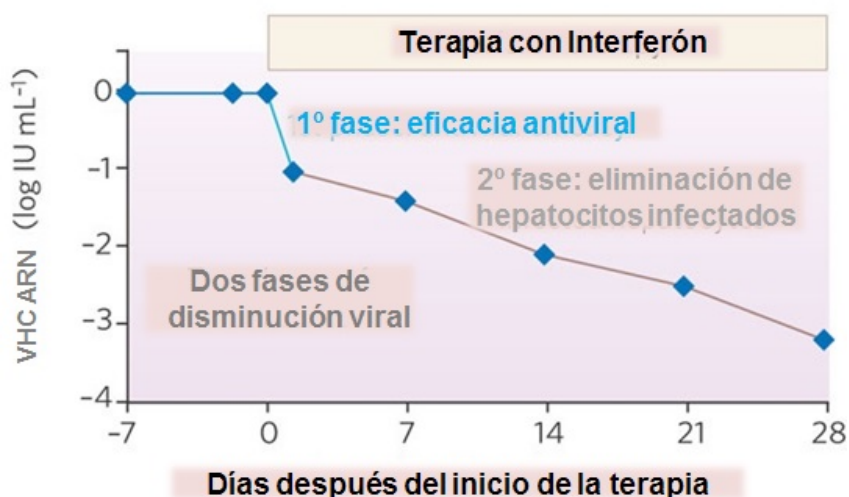


Figura 16. **Cinética viral durante la terapia con $INF-\alpha$ en la infección crónica por VHC.** Patrón de disminución en los niveles de ARN del VHC durante la terapia con interferón hepatitis C crónica. Esto muestra un descenso rápida inicial de los niveles del ARN del VHC en la primera fase que se produce durante los primeros 1-2 días de tratamiento, seguido por una disminución más gradual de segunda fase durante las subsiguientes semanas de tratamiento. Adaptado de Feld y Hoofnagle 2005.

Se podría decir que la ribavirina estimula la segunda fase de la cinética viral inducida por el peg-IFN- α , inhibiendo la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), lo que conlleva a la depleción del guanósín trifosfato (GTP) necesario para la síntesis del ARN viral (Thomas *et al.* 2012). En la figura 17 se puede observar los patrones de la respuesta virológica al tratamiento combinado (peg-IFN- α y RBV) que puede tener el paciente en tratamiento.

Ge *et al.* publicaron por primera vez un papel significativo de un polimorfismo específico (*rs12979860* CC, región del gen *IL28B*) en la respuesta a la terapia basada en peg-IFN- α en pacientes infectados con el genotipo 1 (Ge *et al.* 2009). Mangia *et al.*, determinaron después que el *rs12979860* era un fuerte predictor de RVS en pacientes infectados con genotipo 1 que no lograron una RVR (Mangia *et al.* 2011). *IL28B* predice los resultados al tratamiento con peg-IFN- α y RBV en los genotipos 1 y 4 del VHC (Thompson y McHutchison 2012), mientras que para los genotipos 2 y 3 la asociación es más débil (Stattermayer *et al.* 2011).

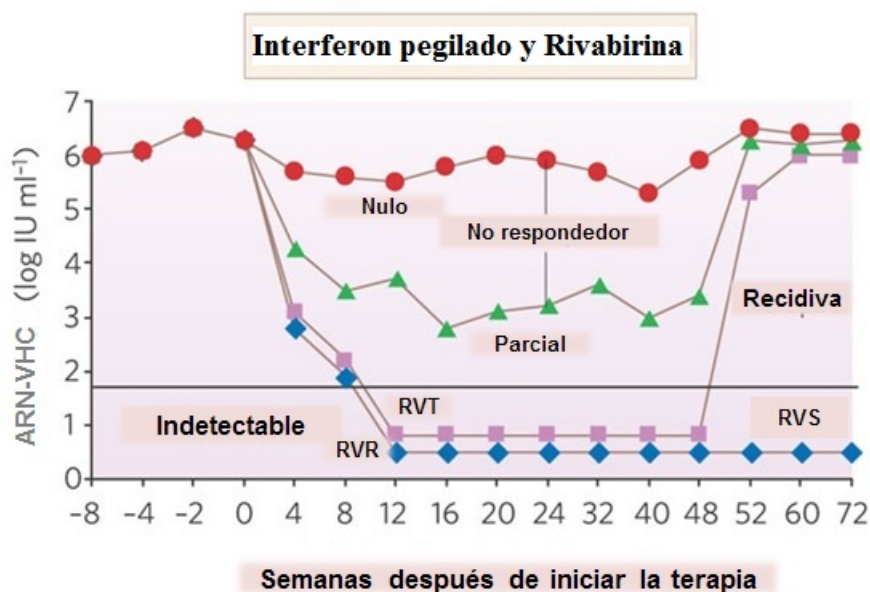
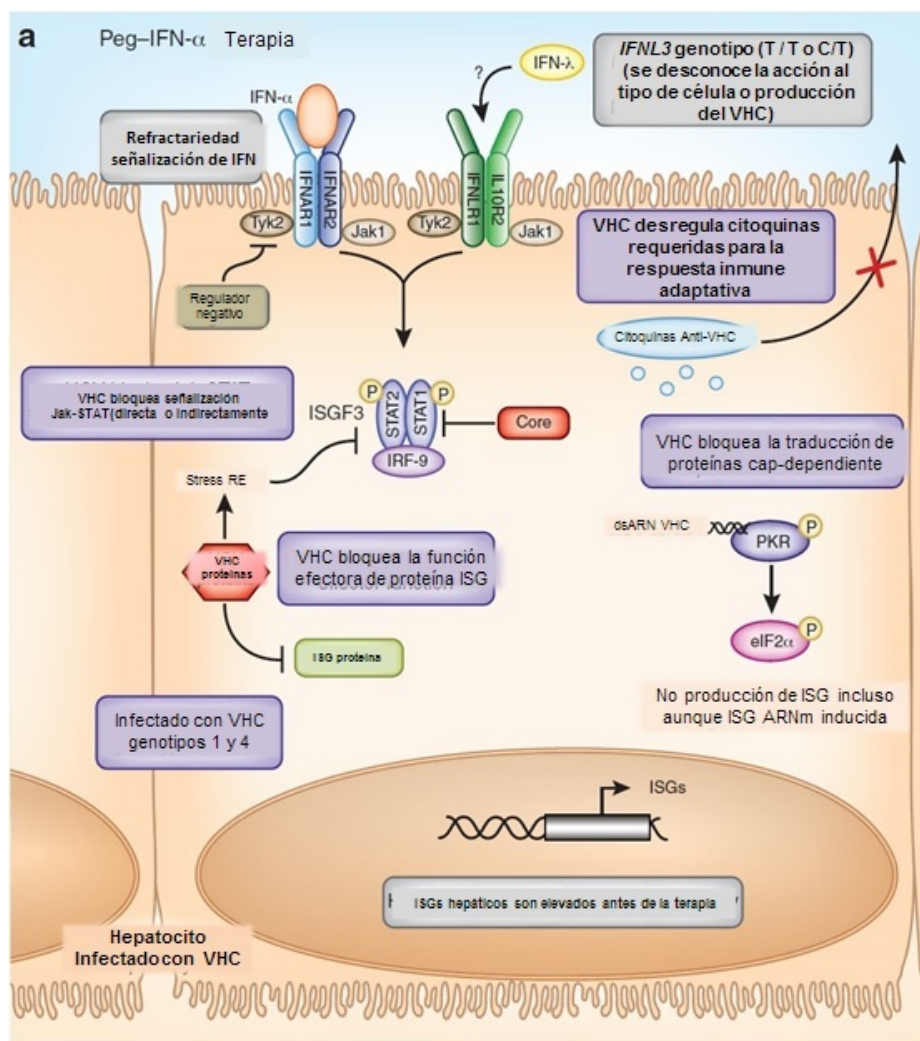


Figura 17. *Patrones de respuesta virológica durante el tratamiento en la infección por VHC.* La respuesta virológica rápida (**RVR**) (aclaramiento del VHC en suero en la semana 4), la respuesta virológica temprana (**RVT**) (reducción de ≥ 2 log del nivel de ARN del VHC en comparación con el valor basal de ARN del VHC o ARN del VHC negativo en la semana 12 de tratamiento), la respuesta virológica sostenida (**RVS**) (ARN del VHC negativo 24 semanas después del cese del tratamiento), Recidiva (reaparición de ARN del VHC en el suero después de que se suspende el tratamiento), No respondedor (insuficiencia para eliminar el ARN del VHC del suero después de 24 semanas de tratamiento), Parcial no respondedor (disminución 2 log en el ARN del VHC, pero aún el ARN del VHC es positivo en la semana 24), Nulo no respondedor (el fracaso para disminuir < 2 logs de ARN del VHC después de 24 de semanas de la terapia). Adaptado de Feld y Hoofnagle 2005.

La identificación genotípica del VHC es clínicamente importante para establecer un tratamiento adecuado, para determinar la dosis y el tiempo de duración, además el fallo terapéutico puede darse debido a la resistencia a la terapia con IFN, existen diferencias, los genotipos 1 y 4 tienden a mayor resistencia al tratamiento con biterapia que los genotipos 2 y 3 (Guía EASL 2011), porque probablemente inducen niveles altos de expresión de ISG hepática antes de la terapia, lo que resulta más frecuentemente en un fenotipo IFN-insensible que atenúa la respuesta al tratamiento (Sarasin-Filipowicz *et al.* 2008, Dill *et al.* 2011, Chen *et al.* 2010) (Figura 18). Globalmente, la tasa de la respuesta virológica sostenida (RVS) con biterapia alcanza aproximadamente el 60%, aunque no erradican el VHC en un 50-60% de los pacientes infectados

con los genotipos 1 y 4, ni en un 20% de los infectados con los genotipos 2 y 3 (Fried *et al.* 2002, Zeuzem *et al.* 2009a; 2009b), y produce una recidiva en el 5-20% de los pacientes tratados (Manns *et al.* 2001, Fried *et al.* 2002, Khuroo *et al.* 2004). Finalmente, la larga duración del tratamiento (48 semanas para el genotipo 1 y 24 semanas para los pacientes con genotipo 2 ó 3 (Khuroo *et al.* 2004) hace que sea difícil para los pacientes tolerar los efectos secundarios asociados (astenia, mialgias, febrícula, cefalea, anorexia, anemia, exantemas, fatiga, etc (Lauer y Walker 2001, Manns *et al.* 2006, Reddy *et al.* 2009). Estas limitaciones llevaron al interés en el desarrollo de nuevos fármacos más efectivos, con menos efectos secundarios, y dirigidos específicamente contra proteínas del virus, llamados “*Antivirales de acción directa*” (AAD) (Kim *et al.* 1996, Lohmann *et al.* 1999, Lindenbach *et al.* 2005a; 2005b, Wakita *et al.* 2005, Lorenz *et al.* 2006, Kieffer *et al.* 2010). En la actualidad existen más de 30 AAD, algunos muy avanzados en su desarrollo clínico y cuatro recientemente aprobados para su uso (ver más adelante).

Figura 18 (página derecha). **Factores que influyen en la respuesta del huésped a la terapia con Peg-IFN- α durante la infección por el VHC.** (a) Los posibles factores son: el genotipo IFNL3 del paciente, el genotipo viral, y el estado de activación de los ISGs hepáticas antes de la terapia. El VHC podría regular la respuesta inmune adaptativa del huésped a la infección al impedir mediante el bloqueo directo o indirecto de la acción de la terapia con IFN o la señalización de Jak-STAT, función efectora de proteínas ISG, la traducción de proteínas cap-dependiente y la expresión de citoquinas (cuadrados de color púrpura). Tyk2, tirosina quinasa 2; Jak1, Janus quinasa 1. (b) Tabla de factores que determinan las respuestas de la terapia del VHC (Genotipo IFNL3 indica el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs12979860). Adaptado de Horner y Gale 2013.



b "ISGs ELEVADAS PRETRATAMIENTO"

	VHC genotipo	Hepatocitos	Macrófagos	IFN3L genotipo
Respondedor (RVS)	2 or 3	No	Si	C/C
No respondedor	1 or 4	Si	No	C/T or T/T

1.8.2. Nuevos antivirales de acción directa para el tratamiento de la hepatitis C crónica

Cada paso del ciclo de vida del VHC constituye una diana potencial para moléculas inhibitoras (Tabla 1 y Figura 19). Las mejor estudiadas entre las diferentes enzimas virales son la proteasa NS3/4A y la ARN polimerasa ARN dependiente NS5B (Kwong *et al.* 2008, Thompson y Locarnini 2012). La proteasa NS3/4A es necesaria para el corte de la poliproteína, y es requerida para la formación del complejo replicasa, por lo que los inhibidores de la

proteasa previenen este procesamiento y bloquean la formación del complejo replicasa. Por otra parte, la polimerasa NS5B es necesaria para la replicación del virus, ya que ensambla el complejo replicasa en la célula huésped y amplifica su material genético; por esto su inhibición detiene la replicación viral (Kwong *et al.* 2008). Los primeros agentes inhibidores de estas dos enzimas del virus pronto demostraron una gran eficacia antiviral *in vitro* e *in vivo*. También se están desarrollando fármacos inhibidores de proteínas del huésped que inhiben la función de los factores celulares necesarios para la replicación del VHC (Chatel-Chaix *et al.* 2012).

Diana	Función en el ciclo de vida del VHC	Etapas de desarrollo
<i>Proteína Viral</i>		
Core	Ensamblaje	Pre-clínico
E1, E2	Entrada	Pre-clínico
P7	Ensamblaje y liberación	Fase 2
NS2	Ensamblaje	No
NS3	Complejo replicación	Fase 2 /Fase 3/ Aprobado
NS4A	Complejo replicación	Pre-clínico
NS4B	Complejo replicación	Pre-clínico /Fase 1
NS5A	Complejo replicación	Fase 1 /Fase 2/Fase 3
NS5B	Complejo replicación	Fase 2 /Fase 3 Aprobado
<i>Proteína del Huesped</i>		
Ciclofilina	Replicación	Fase 3
miR122	Traducción y replicación	Fase 2
Receptores celulares	Entrada	Fase 2

Tabla 1. *Proteínas del VHC y proteínas del huésped como dianas de fármacos antivirales.*

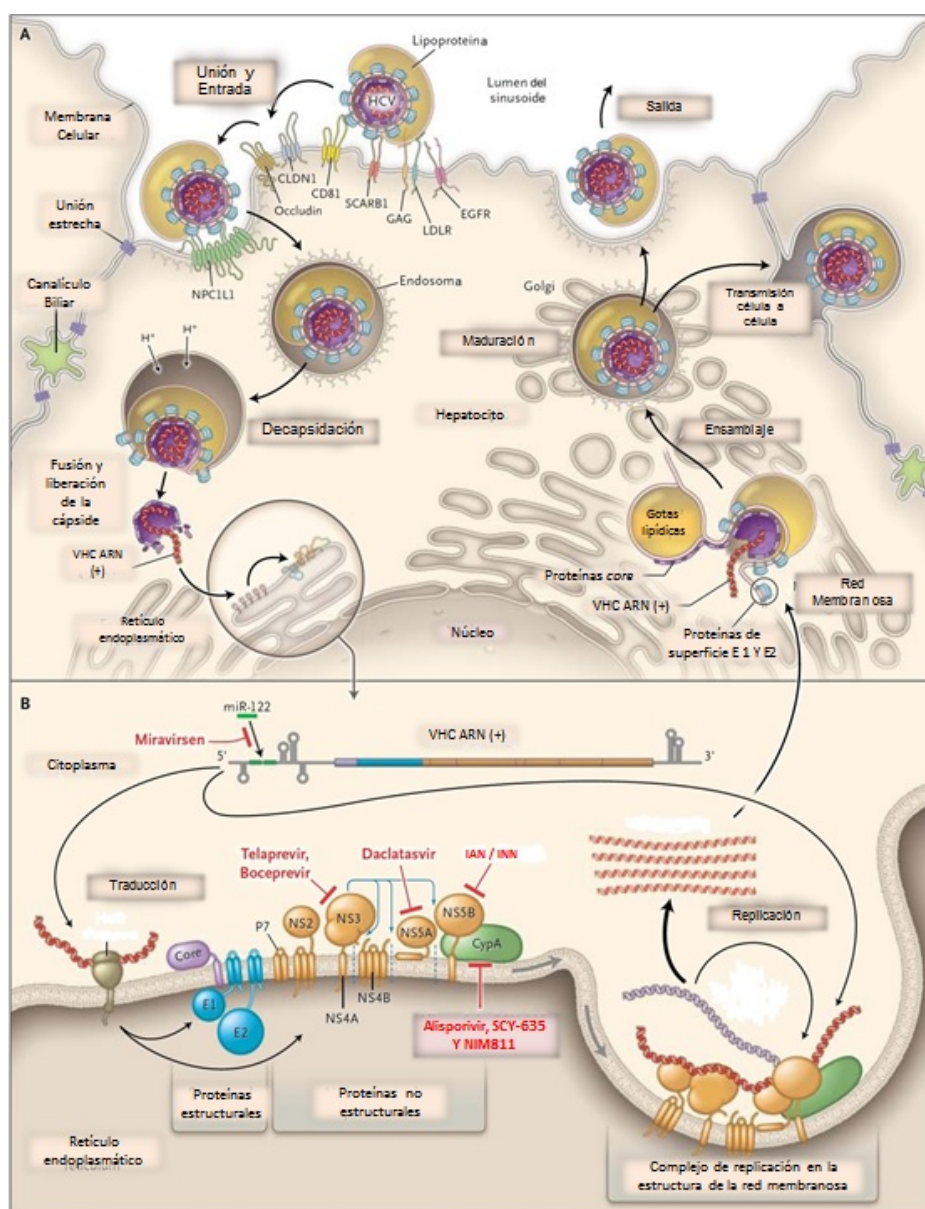


Figura 19. **Nuevos antivirales que afectan diferentes pasos del ciclo de replicación del VHC.** A) Pasos secuenciales de la propagación del VHC en un hepatocito. Factores de entrada del VHC, receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI), CD81, claudina 1 (CLDN1), ocludina, de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y proteína de Niemann-Pick CI-like 1 (NPC1L1) B) En la membrana del retículo endoplasmático, la codificación de las proteínas virales, así como los principales proteínas virales y los factores del huésped son objetivos de los nuevos agentes en desarrollo clínico avanzado. También están siendo objeto para el desarrollo terapéutico del VHC los factores de entrada del VHC, metabolismo de los lípidos, y la vía de señalización de la membrana implicado en la replicación (Panel A). CypA, ciclofilina A; E, glicoproteína de la envoltura; GAG, glicosaminoglicanos; LDLR, receptor de lipoproteína de baja densidad; IAN, inhibidor análogo de nucleósido, INN, inhibidor no nucleósido; y NS, proteína no estructural. Adaptado de Liang y Ghany 2013.

Los primeros AAD que se aprobaron en 2011 por la *Food and Drug Administration* norteamericana (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para el tratamiento en pacientes infectados con VHC genotipo 1 son dos inhibidores de la proteasa (IP) del VHC: Boceprevir (SCH-503034) (Victrelis[®], Merck) y Telaprevir (VX-950) (Incivek[®], Vertex; Incivo[®], Johnson & Johnson) (Chang *et al.* 2012, Forestier y Zeuzem 2012). Ambos mejoran la tasa de RVS hasta un 75% en pacientes naïve VHC genotipo 1 (Jacobson *et al.* 2011a; 2011b, Poordad *et al.* 2011a; 2011b) y 29-88% en el tratamiento de pacientes ya tratados infectados con VHC genotipo 1 (Bacon *et al.* 2011, Zeuzem *et al.* 2011). Sin embargo, los IP requieren su combinación con peg-IFN- α +RBV debido a que la administración en monoterapia dá lugar a la rápida selección de resistencia (Sarrazin *et al.* 2007a; 2007b, Kieffer *et al.* 2007). Los pacientes infectados con VHC genotipo 1a tienen mayor riesgo de desarrollo de resistencia durante la terapia basada en IP en comparación con el genotipo 1b, ya que para desarrollar resistencia el virus requiere el intercambio de sólo un nucleótido frente a dos para el genotipo 1b en la posición 155 (Sarrazin y Zeuzem. 2010, Guía tratamiento EASL 2014). Además no son eficaces en el tratamiento de la infección por otros genotipos del virus.

Con este nuevo régimen de tratamiento triple, las tasas de curación de pacientes infectados con el genotipo 1 han aumentado de un 20-30% a alrededor de 70-80%, y se reduce significativamente la duración del tratamiento (Lee *et al.* 2012). La relevancia de IFNL3 (*IL28B*) como marcador predictivo para el éxito en la triple terapia con peg-IFN- α /RBV/IP es menos significativa (Jacobson *et al.* 2011a; 2011b, Pol *et al.* 2011, Poordad *et al.* 2011a; 2011b). Los estudios de polimorfismos en el gen IFNL3 (*IL28B*) pueden ser útiles para determinar la capacidad de respuesta al IFN y la probabilidad del logro de RVR con peg-IFN- α /RBV antes de iniciar la triple terapia, proporcionando información adicional que ayudará en la evaluación a las opciones de tratamiento. Actualmente la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD) no recomienda las pruebas de IFNL3 (*IL28B*) para todos los pacientes antes de la terapia triple, pero que puede ser considerado para adquirir información adicional sobre la respuesta al tratamiento o la duración (Ghany *et al.* 2011). Sin embargo, estos regímenes de triple terapia exhiben importantes limitaciones: (1) aumentan el espectro de

efectos secundarios asociados con la terapia anti-VHC; (2) están asociados con un complejo programa de dosificación, (3) se limitan a infecciones genotipo 1, (4) y la selección de variantes virales resistentes ocurre en pacientes que no responden bien al componente peg-IFN- α /RBV de la triple terapia. Para superar estas limitaciones, se necesitan regímenes terapéuticos más eficaces y convenientes, mejor tolerados, activos en todos los genotipos virales, y con una insignificante probabilidad de desarrollar resistencia viral en combinación con peg-IFN- α y ribavirina o con otros AAD en los regímenes de IFN-libres, con o sin ribavirina (Delang *et al.* 2013). Los AAD más avanzados en su desarrollo se dirigen principalmente a la proteasa NS3/4A, proteína NS5A o NS5B ARN polimerasa dependiente de ARN. Además, otras proteínas virales, menos estudiadas, son posibles nuevos objetivos para la intervención farmacológica, tales como el canal iónico p7 dependiente de calcio (viroporina) o la proteína NS4B (Pawlotsky 2013).

1.8.2.1. *Inhibidores de la proteasa NS3/4A*

La proteína NS3 es una proteína multifuncional, actúa como proteasa y helicasa/NTPasa (Johnson *et al.* 2007). La región N-terminal codifica para la serín-proteasa (180 aa) que cataliza la proteólisis *in cis* del sitio de unión NS3-NS4A junto con la proteína NS2, con la liberación de la proteína NS4A y esta actúa como cofactor cortando *in trans* las siguientes uniones en la región no estructural de la poliproteína para liberar NS4, NS5A, y NS5B (Grakoui *et al.* 1993, Cicero *et al.* 1999). La región C-terminal codifica una proteína con actividad helicasa/NTPasa (451 aa), su actividad es esencial para la generación de componentes del complejo de replicación del ARN viral, ya que interacciona con la proteína NS5B (Yao *et al.* 1999). En la figura 20 se muestra la estructura de la proteasa del VHC en imagen 3D (generada con el programa PyMol 1.1 a partir del aislado BK del VHC genotipo 1b, extraída de la base de datos *Protein Data Bank* (código PDB 1CU1) (www.ebi.ac.uk/pdbsum) donde se han representado los dominios helicasa y proteasa (Frick *et al.* 2004).

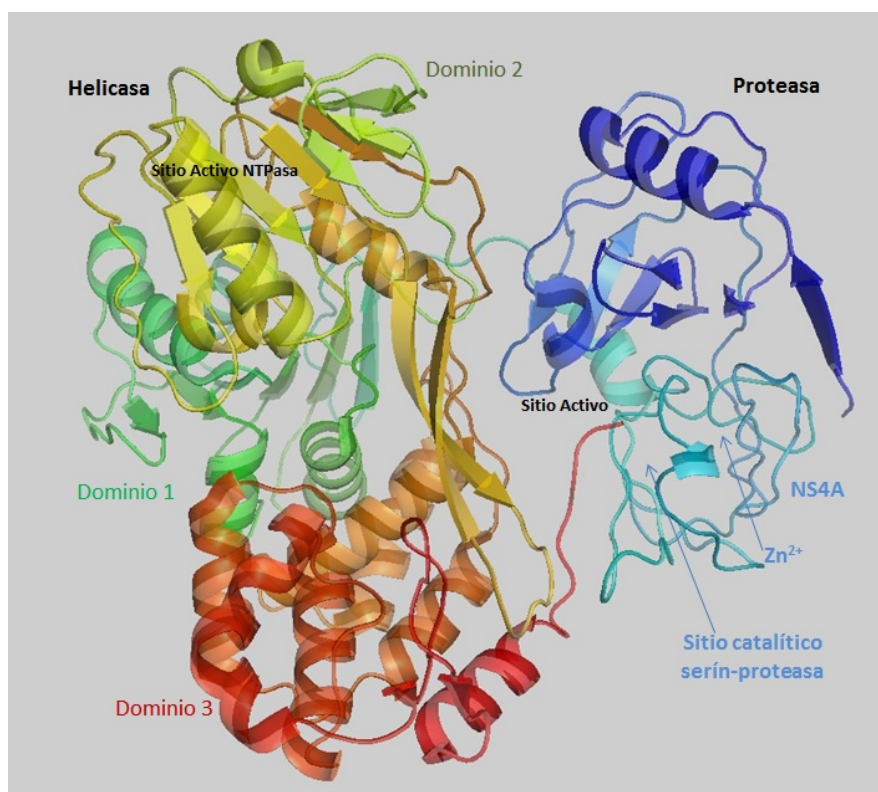


Figura 20. **Estructura tridimensional de la proteína NS3/4A multifuncional.** Los colores resaltan las características estructurales. La proteasa en color azul, con el sitio activo y catalítico de la serín-proteasa, el sitio de unión al Zn^{2+} y el sitio de unión a NS4A; la helicasa con su dominio 1 de color verde; dominio 2 en color amarillo y el dominio 3 en color rojo y el sitio activo NTPasa. Se utilizó el programa PyMol 1.1 para producir la imagen en 3D a partir de la estructura del aislado BK del VHC genotipo 1b (código PDB 1CU1) extraída de la base de datos Protein Data Bank (www.ebi.ac.uk/pdbsum).

La proteasa NS3/4A juega un papel importante en la capacidad del virus para evadir la respuesta inmune innata que conducen a la inducción de la síntesis de IFN- α/β y el establecimiento de un estado antiviral celular (Lemon *et al.* 2010) interrumpe la activación de IRF-3 y NF- κ B por inducir escisión de dos importantes moléculas de señalización, TRIF (Ticam-1), y Mavs (IP-1, VISA, o Cardif) (Li *et al.* 2005, Foy *et al.* 2005, Meylan *et al.* 2005). Se podría decir que la proteasa NS3/4A tiene un doble papel en el ciclo de la replicación, que incluye el procesamiento de la poliproteína, y la modificación del entorno intracelular para limitar la inducción de respuestas innatas mediadas por IFN (Lemon *et al.* 2010). Por tal motivo, la proteasa NS3/4A representa un objetivo terapéutico doble, este hallazgo puede explicar su excepcional actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* (Lamarre *et al.* 2003). La aparición de virus

resistentes en casos de falta de adherencia debida a los efectos secundarios significativos, siguen siendo una limitación.

Los diferentes IP se pueden dividir en dos clases; los tetrapéptidos lineales derivados de la α -cetoamida y los macrocíclicos. La actividad antiviral de los IP es principalmente relevante para los pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC, ya que la actividad antiviral de los actuales IP contra los genotipos no-1 (excepto para el genotipo 2), no es tan eficaz (Asselah *et al.* 2009, Benhamou *et al.* 2013). Algunos IP han sido descartados para el desarrollo clínico; el BILN-2061 (Ciluprevir), SCH6 y GS9132/ACH-806, por sus efectos adversos o no deseados, si bien tenían una actividad excepcional *in vitro* e *in vivo* (Gaudieri *et al.* 2009, Lamarre *et al.* 2003). En la tabla 2, se resumen los IP que actualmente se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico.

Clase de Inhibidor	Nombre del compuesto	Fase de desarrollo clínico
Primera generación IP NS3/A	Telaprevir	Aprobado
	Boceprevir	Aprobado
	Simeprevir (TMC-435)	Aprobado
	Faldaprevir (BI201335)	Fase 3
	Vaniprevir (MK-7009)	Fase 3
	Asunaprevir (BMS650032)	Fase 3
	ABT-450	Fase 3
	Danoprevir (RG7227)	Fase 2
	Sovaprevir (ACH-1625)	Fase 2
Vedroprevir (GS-9451)	Fase 2	
Segunda Generación IP NS3/A	MK-5172 Neceprevir (ACH-2684)	Fase 2 Fase 2

Tabla 2. *Inhibidores de la proteasa NS3/4A en distintas fases de desarrollo clínico. Los compuestos aprobados y los más prometedores de primera y segunda generación (en las fases 2 y 3). IP (Inhibidores de la proteasa).* Adaptado de Scheel y Rice 2013.

Los primeros IP aprobados por la FDA y EMA, son Boceprevir (BOC) y el Telaprevir (TPV). Las características más importantes de ambos fármacos se resumen en la tabla 3.

	Telaprevir	Boceprevir
Mecanismo de acción	Inhibidor de la proteasa	Inhibidor de la proteasa
Dosis	750mg/3 veces al día	800mg/3 veces al día
Concentración sistémica máxima	4-5 horas	2 horas
Distribución	59-76% unido a proteínas	75% unido a proteínas
Metabolismo	Hepático	Hepático
Vías de metabolización	Citocromo P-450 3A4	Aldoketoreductasa
Eliminación	Mayoritariamente en heces	Mayoritariamente en heces
Vida media	4-4,7 horas	3,4 horas

Tabla 3. *Características principales de Telaprevir y Boceprevir.*

El BOC es un tetrapéptido lineal peptidomimético (Figura 21). Se administra oralmente de forma conjunta con peg-IFN- α y RBV, y como sólo es eficaz para pacientes infectados con VHC genotipo 1, *naïve* o no respondedores a la terapia estándar (Susser *et al.* 2009, Sarrazin *et al.* 2007a; 2007b, Kwo *et al.* 2010, Schiff *et al.* 2008). Los efectos adversos más comunes del BOC son anemia, náuseas, vómitos y disgeusia.

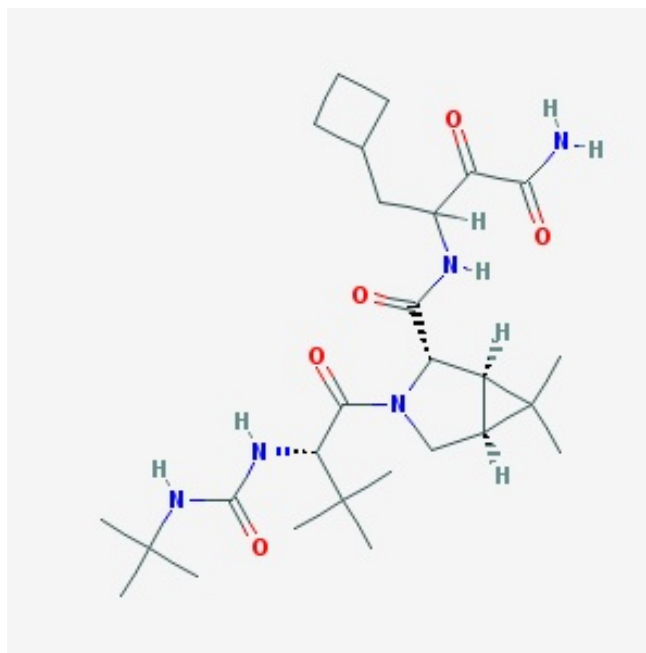


Figura 21. **Estructura molecular del Boceprevir** (CID 10324367). IUPAC (1R,2S,5S)-N - [3-Amino-1 - (ciclobutilmetil) - 2,3- dioxopropil] - 3 - [2 (S) - [[[1, 1 - dimetiletil] amino] carbonil] amino] - 3, 3 - dimetil - 1 - oxobutil] - 6, 6 - dimetil - 3 - azabicyclo [3.1.0] hexan - 2 (S) carboxamida. $C_{27}H_{45}N_5O_5$, PM: 519,67 [g/mol].

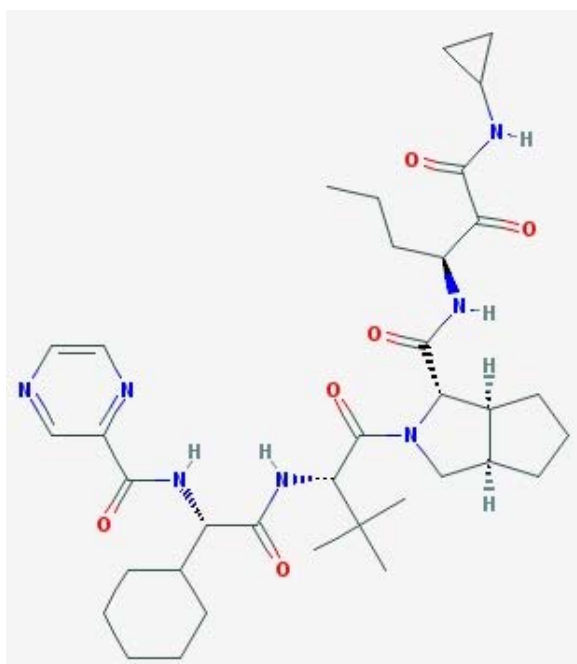


Figura 22. **Estructura molecular del Telaprevir** (CID 3010818). IUPAC (1S,3aR,6aS) - 2 - [(2S) - 2 - [[(2S) - 2 - Ciclohexil-2 - (pirazina-2-carbonilamino) acetil] amino] - 3,3 - dimetilbutanoil] - N - [(3S) - 1 -(ciclopropilamino) - 1, 2 - dioxohexan - 3 - il] - 3,3a,4,5,6,6a - hexahidro - 1H - ciclopentapirrol-1-carboxamida. $C_{36}H_{53}N_7O_6$, PM: 679,85 [g/mol].

El TPV (VX-950), es un tetrapéptido lineal que también actúa como peptidomimético, y se administra oralmente junto a peg-IFN- α y RBV (Lawitz *et al.* 2008) (Figura 22). Ejerce un efecto antivírico limitado en pacientes infectados por el VHC genotipo 2, pero no es efectivo en pacientes infectados con genotipo 3 ó 4 debido a que la secuencia de aa del dominio de la proteasa de la proteína NS3/4A varía significativamente entre los diferentes genotipos (López-Labrador *et al.* 2008, Asselah *et al.* 2009, Akhavan *et al.* 2009, Foster *et al.* 2011a). Los efectos secundarios más importantes del TPV son erupción cutánea, desórdenes gastrointestinales y anemia.

Un nuevo IP ha sido aprobado recientemente por la FDA en 2013 y la EMA 2014: el Simeprevir (TMC-435), desarrollado por Tibotec/Johnson & Johnson, un compuesto macrocíclico no covalente (Raboisson *et al.* 2008) (Figura 23). El Simeprevir está recomendado para el tratamiento en combinación peg-IFN- α y RBV para pacientes naïve infectados con VHC genotipo 1, sin embargo no debe administrarse en pacientes que fueron tratados con los IP de primera generación BOC y TPV, a causa de la posibilidad de resistencia cruzada. También debe considerarse otras opciones de tratamiento en aquellos pacientes infectados con el subtipo 1a y con la variante NS3-Q80K presente al inicio del tratamiento (AASLD 2014, Guía EASL 2014).

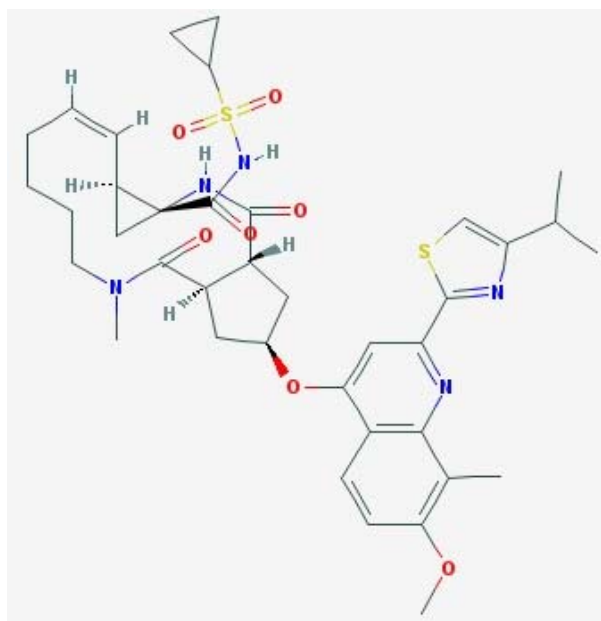


Figura 23. **Estructura molecular del Simeprevir** (CID 24873435). $C_{38}H_{47}N_5O_7S_2$,
PM: 749,93 [g/mol]

Finalmente otros IP, se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico. El Vaniprevir (MK-7009; McCauley *et al.* 2010), desarrollado por Merck, está en fase III de desarrollo clínico. Este compuesto macrocíclico tiene una unión no covalente, y es considerado como inhibidor competitivo de la proteasa NS3/4A (Figura 24). En fase III, pero sin continuar su desarrollo clínico, el Faldaprevir (BI-201335; Llinàs-Brunet *et al.* 2010) es un tetrapéptido lineal no covalente, desarrollado por Boehringer Ingelheim (Figura 25).

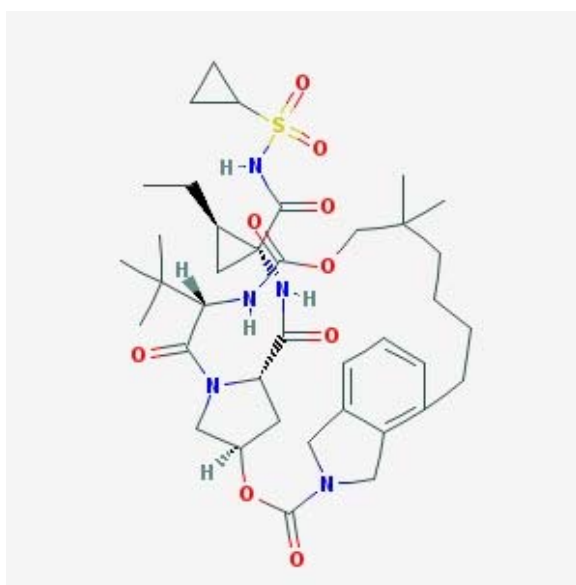


Figura 24. **Estructura molecular del Vaniprevir** (CID 24765256) $C_{38}H_{55}N_5O_9S$,
PM: 757.936 [g/mol]

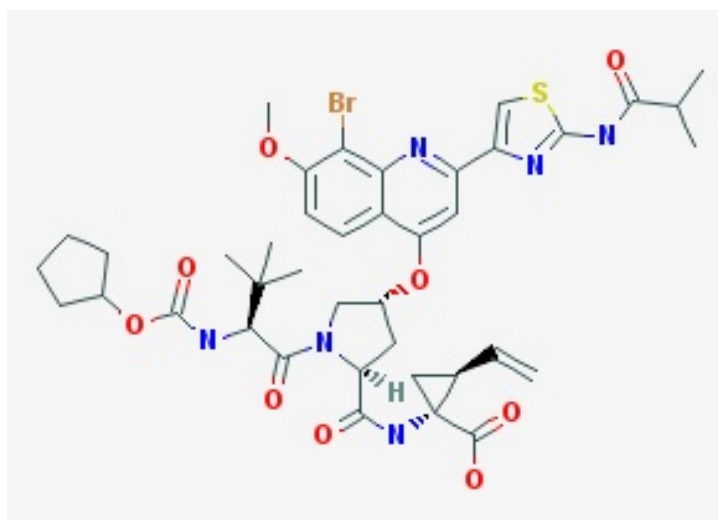


Figura 25. **Estructura molecular del Faldaprevir** (CID 71300931). $C_{40}H_{49}BrN_6O_9S$,
PM: 869.82 [g/mol]

Entre los compuestos en Fase II, destaca el Danoprevir (RG-7227/ITMN-191), otro compuesto macrocíclico no covalente, desarrollado por Roche/Genentech (Saiwert *et al.* 2008), que bloquea selectivamente la proteasa NS3/4A del VHC (Forestier *et al.* 2008; 2011) (Figura 26).

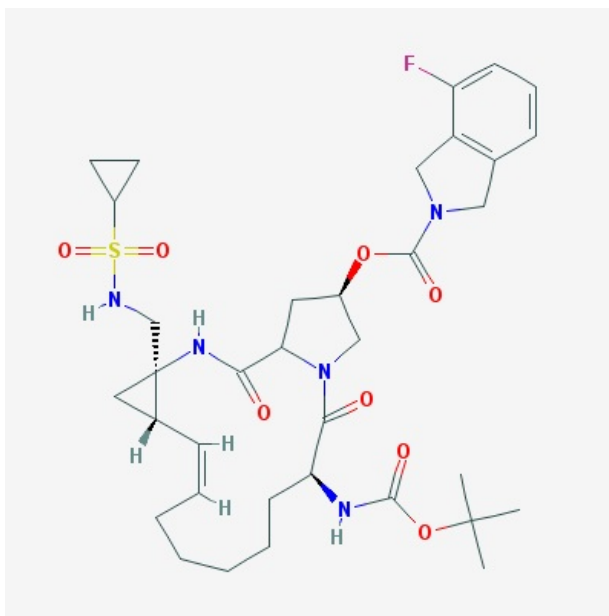


Figura 26. **Estructura molecular del Danoprevir** (CID 57336512). $C_{35}H_{48}FN_5O_8S$,
PM: 717.847 [g/mol]

1.8.2.2. **Inhibidores de la polimerasa NS5B**

La ARN polimerasa dependiente de ARN NS5B es también un objetivo ideal de drogas antivirales. Esta enzima es esencial para la replicación del VHC, ya que cataliza la síntesis de la ARN complementaria de cadena negativa y posterior ARN genómico de cadena positiva. En función de su estructura química y mecanismo de acción, los inhibidores específicos de la polimerasa NS5B se pueden dividir en dos grandes categorías: análogos de nucleótidos (IAN) e inhibidores no nucleosídicos (INN). En la tabla 4 se resumen los distintos fármacos que se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico.

Los análogos de nucleótidos (IAN) se administran en forma de prodroga no fosforilada para facilitar su acceso a la célula, donde son convertidos en la forma trifosfato activa (NTP) por las quinasas celulares. Los IAN son análogos ribonucleótidos que actúan como terminadores de cadena, compitiendo con los

Clase de Inhibidor	Nombre del compuesto	Fase de desarrollo clínico
IAN	Sofosbuvir (GS-7977)	Aprobado
	Mericitabina (RG7128)	Fase 3
	VX-135	Fase 2
INN	ABT-333	Fase 3
	BI207127	Fase 3
	BMS-791325	Fase 2
	Lomibuvir (VX-222)	Fase 2
	ABT-072	Fase 2
	Setrobuvir (RG-7790)	Fase 2
	GS-9669	Fase 2
	TMC647055	Fase 2

Tabla 4. *Inhibidores de la polimerasa NS5B en distintas fases de desarrollo clínico. Los compuestos más prometedores de cada clase (en las fases 2 y 3). IAN (Inhibidores análogos de nucleótidos); INN (Inhibidores no nucleosídicos). Adaptado de Scheel y Rice 2013.*

nucleótidos trifosfato por la incorporación a la cadena naciente de ARN. Esta función de terminación de cadena la consiguen debido a modificaciones relativamente pequeñas en las posiciones 2' y 4' de la ribosa. La ventaja de estas moléculas es que no se espera que sean reconocidas por ADN polimerasas endógenas, evitando de esta forma efectos secundarios citotóxicos y genotóxicos (De Francesco y Carfi 2007).

Los inhibidores no nucleosídicos (INN) por el contrario, no compiten con los NTPs sino que actúan bloqueando la enzima en la iniciación, a través de la inhibición de un cambio conformacional necesario para proseguir con la elongación del ARN naciente (De Francesco y Carfi 2007), es decir se unen a sitios menos conservados fuera del centro activo (sitios alostéricos), inhibiendo la eficacia catalítica del centro activo (Kwong *et al.* 2008).

Se han identificado al menos 4 sitios alostéricos diferentes designados como A, B, C y D. El sitio A es conocido como pulgar 1, sitio inhibidor de

benzimidazol; el sitio B es conocido como pulgar 2, sitio inhibidor de tiopenos y dihidropironas; el sitio C es conocido como palma 1, sitio inhibidor de benzotiazidinas; sitio D es conocido como palma 2, sitio inhibidor de benzofuranos (Lesburg *et al.* 1999, Sarrazin *et al.* 2010). En la figura 27 se muestra los dominios y sitios alostéricos de la polimerasa NS5B del VHC en su estructura tridimensional.

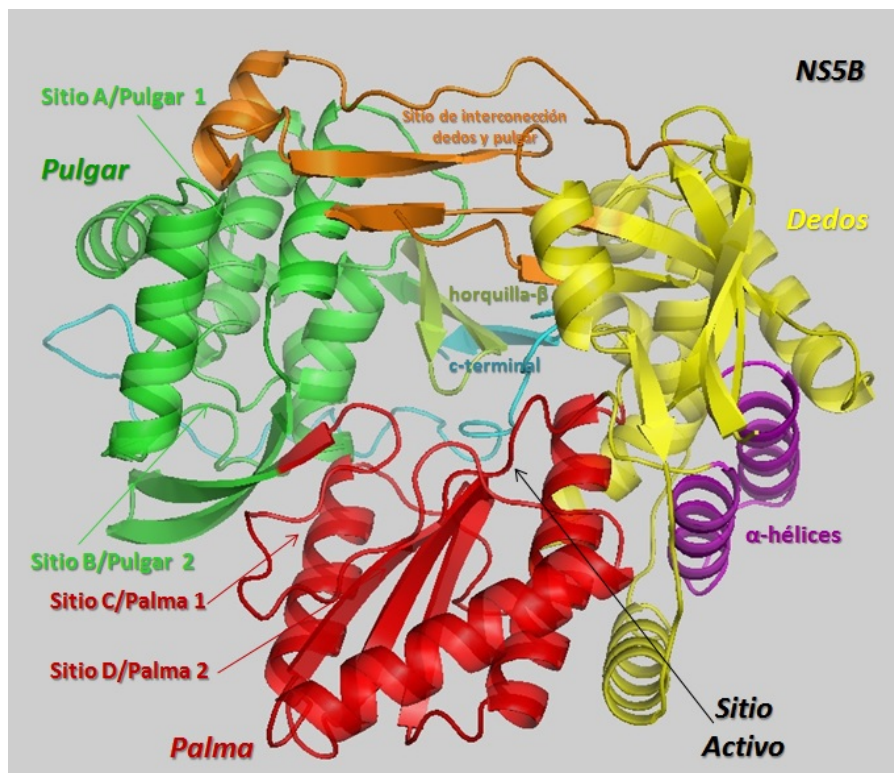


Figura 27. *Estructura tridimensional de la polimerasa NS5B y sus sitios alostéricos.* Los colores resaltan las características estructurales. El sitio A/pulgar 1 y el sitio B/pulgar 2 en color verde; el sitio C/palma 1 y sitio D/palma 2 en color rojo; dos bucles de interconexión de subdominios de los dedos y pulgar en color naranja; dos α -hélices antiparalelas en color morado, que vinculan la palma y los subdominios de los dedos; la β -horquilla en verde limón; el residuo C-terminal en color azul, que constituye la parte del polipéptido que une la polimerasa a la membrana; y el sitio activo en color blanco. Se utilizó el programa PyMol 1.1 para producir la imagen en 3D a partir del aislado Con1 del VHC genotipo 1b, extraída de la base de datos Protein Data Bank (código PDB 3FQL) (www.ebi.ac.uk/pdbsum).

El primer IAN aprobado por la FDA (y recomendado por la EMA) es el Sofosbuvir (SOF) desarrollado por Gilead Sciences, antes conocido como GS-7977 (Figura 28). El SOF es un inhibidor análogo de nucleósido (Bourlière *et al.* 2011) que es fosforilado dentro del hepatocito para pasar a trifosfato de

nucleósido activo, y compite con los nucleótidos naturales, con lo cual provoca la terminación de la replicación del ARN del genoma naciente viral. El sitio activo está muy conservado incluso entre varios genotipos (Lam *et al.* 2010, Sofia *et al.* 2010).

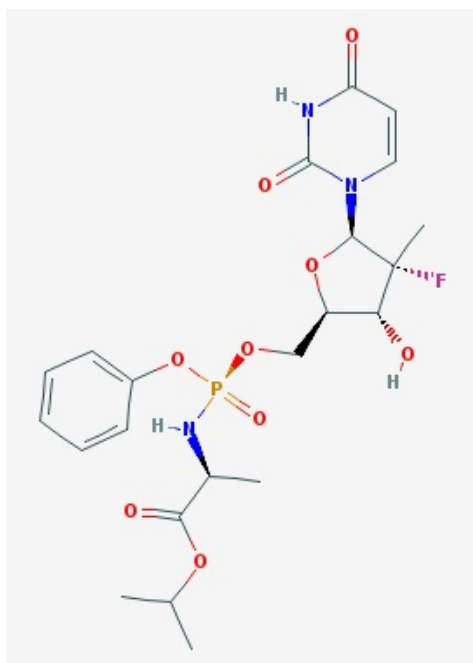


Figura 28. **Estructura molecular del Sofosbuvir.** (CID 45375808). $C_{22}H_{29}FN_3O_9P$,
PM: 526.45 [g/mol]

Debido a su eficacia antiviral pan-genotípica, su uso también está recomendado para pacientes infectados con genotipos 2 y 3, en combinación con RBV, mientras que para los pacientes infectados con genotipo 1 la combinación es con peg-IFN- α /RBV. Es posible que SOF/RBV podría ser utilizado en un futuro para pacientes con VHC genotipo 1 intolerantes al peg-IFN- α , y en combinación con otros AAD, como Daclastavir (inhibidor de NS5A) (Guía EASL 2014).

Entre los otros IAN prometedores se destacan: Mericitabina, GS-0938, TMC-649128 y VX-135, que se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico (Schoenfeld *et al.* 2013, Guía EASL 2014, Pawlotsky 2014).

Entre los INN, el ABTT-333 es uno de los más prometedores, y actualmente se encuentra en fase 3 de desarrollo clínico, en combinación con

diversos fármacos (Poordad *et al.* 2013). En fase 2 se encuentran GS-9669, Lomibuvir, ABT-072, BMS-791325 y TMC647055. Para los dos últimos se busca su aprobación como terapia triple con Daclatasvir y Asunaprevir en el año 2015 o 2016. Finalmente Setrobuvir y ABT-333 probablemente serán aprobados a finales de 2014 o en 2015 en combinación con otros AAD (Guía EASL 2014, Pawlotsky 2014).

1.8.2.3. *Inhibidores de otras proteínas del virus*

Proteína NS2. La proteasa NS2 es una buena diana ya que cataliza una escisión esencial sólo en la poliproteína del virus (en el límite NS2/NS3) que es esencial para su replicación además de tener otras funciones (Lemon *et al.* 2010).

Proteína NS4A. El antagonista NS4A no sólo suprime la proteasa NS3/4A sino que también previene la formación del complejo de replicación. El antagonista ACH-806, primer candidato para uso clínico, fue descartado por su alta toxicidad (Yang *et al.* 2008, 2013a). El ACH-1095, otro antagonista de NS4A, con mayor eficacia *in vitro* que ACH-806, se espera que tenga buenos resultados para su uso clínico.

Proteína NS4B. Otra proteína viral fundamental en el ciclo de replicación viral es NS4B (Sklan y Glenn 2006, Egger *et al.* 2002, Bryson *et al.* 2010, Alvisi *et al.* 2011). En un ensayo basado en microfluidos se demostró, que la proteína NS4B utiliza dominios ricos en arginina para unirse específicamente al extremo 3' de la cadena negativa del ARN del VHC, y se seleccionaron inhibidores de esta interacción (Einav *et al.* 2008). El clemizol (1-[(4-chlorophenyl) methyl]-2-(pyrrolidin-1-ylmethyl) benzimidazole), es considerado un inhibidor relativamente potente de la proteína NS4B, y de la actividad de unión y replicación del ARN (Einav *et al.* 2008). Este compuesto se ha utilizado previamente como un anti-histamínico (bloqueador de la histamina H1), para tratar las alergias. En el año 2009 ha entrado en la fase I de desarrollo clínico para tratar hepatitis crónica C (estudios CLEAN, tipificada por NCT00945880 [CLEAN-1] Eiger Biopharmaceutics, <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00945880?term=clean-1&rank=1>).

El clemizol ha demostrado un efecto sinérgico *in vitro* BOC y TPV sin resistencias cruzadas (Einav *et al.* 2010). Esto difiere notablemente con otros agentes anti-VHC hasta la fecha, que suelen mostrar aditividad simple (e incluso en algunos casos antagonismo). En concreto, el clemizol muestra actividad con IFN, RBV e IP, destacando la especificidad y singularidad de la fuerte sinergia de clemizol con inhibidores de la proteasa en desarrollo clínico avanzado (Einav *et al.* 2010). Dicha sinergia por lo general tiene una base biológica subyacente, y en este caso podría reflejar la evidencia genética que apoya las interacciones importantes entre NS4B y NS3 (Einav *et al.* 2010, Paredes *et al.* 2008, Blight *et al.* 2011). El clemizol puede representar un componente potencial interesante de futuros tratamientos combinados.

Otro compuesto el Anguizol, es un aglutinante de NS4B que se dirige al segundo extremo N-terminal de hélice anfipática (AH2) de NS4B y altera su distribución celular, impidiendo la formación de la banda membranosa e interfiere con la replicación (Bryson *et al.* 2010). Otras moléculas pequeñas contra NS4B AH2 y sus derivados se encuentran en desarrollo preclínico (Cho *et al.* 2010).

Proteína NS5A. La proteína NS5A es una fosfoproteína multifuncional que desempeña funciones esenciales en la replicación del ARN y durante el ensamblaje de las partículas virales (Appel *et al.* 2008, Tellinghuisen *et al.* 2008, Kim *et al.* 2011, Gish y Meanwell 2011). Al inhibir NS5A, se puede interrumpir simultáneamente la replicación y el ensamblaje (Pietschmann *et al.* 2009). En los últimos años, los compuestos que actúan sobre NS5A se han demostrado como inhibidores eficaces de la replicación del VHC, *in vitro* e *in vivo* (Fridell *et al.* 2011a; 2011b, Wang *et al.* 2012, Lok *et al.* 2012, Walker *et al.* 2014). Se descubrieron los primeros inhibidores de NS5A por detección basado en un sistema de replicón (Conte *et al.* 2009, Lemm *et al.* 2010, Fridell *et al.* 2010, Lin *et al.* 2011).

El Daclatasvir (BMS-790052) se une al dominio I de NS5A (Tellinghuisen *et al.* 2005, Gao *et al.* 2010, Nettles *et al.* 2011). Este fármaco desarrollado por Bristol-Myers Squibb, se encuentra en fase III de estudio clínico en combinación con otros AAD, con o sin RBV (Sarrazin y Zeuzem 2010, Pol *et al.* 2012; 2013, Gane *et al.* 2012), y probablemente sea aprobado

en 2014 ó 2015 (Guía EASL 2014). En ensayos clínicos, la inhibición de la NS5A se ha asociado con reducciones abruptas del ARN del VHC en monoterapia (Gao *et al.* 2010) y la tasa de RVS aumenta en asociación con peg-IFN- α y RBV (Pol *et al.* 2012). También se están evaluando regímenes libres de peg-IFN- α , de Daclastavir en combinación con SOF, Asunaprevir (ASV), inhibidor de la proteasa NS3, y / o BMS791325, inhibidor no nucleosídico de la polimerasa NS5B (Lok *et al.* 2012, Everson *et al.* 2012, Sulkowski *et al.* 2012).

Otros inhibidores de NS5A en desarrollo son BMS-824393 (Brystol-Myers Squibb), AZD7295 (Arrow/Astra Zeneca), PPI-461, PPI-561, PPI-668 y PPI-1301 (Presidio), Ledipasvir (GS-5885- Gilead), GSK2336805 (GlaxoSmithKline), ABT-267 (Abbott), ACH-2928 y ACH-3102 (Achillion), IDX719 (Idenix), MK-8742 (Merck) y también BP008 considerado un inhibidor potente de NS5A presenta efectos sinérgicos con peg-IFN- α , IP y los inhibidores de la polimerasa NS5B (Lin *et al.* 2012, Lalezari *et al.* 2012, Nettles *et al.* 2010, Lawitz *et al.* 2012a; 2012b, Soriano *et al.* 2011, Gelman y Glenn 2011, Liu *et al.* 2011, Pawlotsky *et al.* 2012a; 2012c; 2013, Belda *et al.* 2012, Brown *et al.* 2010). Los inhibidores de NS5A tienen baja barrera genética a la resistencia. Se han detectado variantes que confieren resistencia a Daclastavir, Ledispavir (GS-5885) y otros inhibidores de NS5A, como M28T, Q30R/H, L31V/M y Y93H/C en los pacientes con genotipo 1 (Fridell *et al.* 2011a; 2011b, Nettles *et al.* 2011, Lawitz *et al.* 2012a; 2012b, Hernandez *et al.* 2013, Plaza *et al.* 2012, Gao *et al.* 2013, Huang *et al.* 2011). Vale la pena señalar que ACH-3102 y MK-8742 son dos inhibidores NS5A de segunda generación en fase II de estudio clínico con una barrera genética relativamente mayor que mantienen niveles sustanciales de actividad frente a mutaciones de resistencia que afectan a Daclatasvir y Ledipasvir (Liu *et al.* 2012, Yang *et al.* 2012). El Ledipasvir ha sido evaluado en regímenes libres de peg-IFN- α en combinación con SOF (inhibidor análogo de nucleósido de la polimerasa) y RVB, y probablemente sea aprobado en 2015 (Gane *et al.* 2014a, Guía EASL 2014).

Proteína core. Otra forma de frenar la producción de partículas del VHC reside en la inhibición directa del ensamblaje de nuevas cápsides, un proceso en parte mediado por la multimerización del *core* del VHC en la superficie de las gotas lipídicas. Se ha demostrado que la 25-hidroxitamina D (3) inhibe la producción de partículas, pero el mecanismo de acción sigue siendo desconocido y su potencia es relativamente baja (Matsumura *et al.* 2012). En ensayos *in vitro* de multimerización del *core*, se identificaron los inhibidores de ensamblaje (SL209 y SL201) con actividades antivirales (Kota *et al.* 2012, Ni *et al.* 2011, Strosberg *et al.* 2010). Sin embargo ningún inhibidor de la proteína *core* ha alcanzado ensayos clínicos.

Proteína p7. La viroporina P7 es una proteína esencial para la infectividad del virus en chimpancés y se requiere para el ensamblaje de partículas del VHC *in vitro* (Sakai *et al.* 2003, Steinmann *et al.* 2007a; 2007b; 2010). Varios inhibidores de la actividad del canal iónico de P7 han sido identificados como la amantadina, rimantadina y el hexametileno amilorida (Pavlovic *et al.* 2003; 2005, Premkumar *et al.* 2004, Griffin *et al.* 2008a, StGelais *et al.* 2009). Sin embargo, la sensibilidad de P7 a estos fármacos es dependiente del genotipo (Griffin *et al.* 2008b) debido a su alto grado de variabilidad. El compuesto BIT225 (Biotron Limited), desarrollado inicialmente como un inhibidor de la viroporina Vpu del VIH-1 (Khoury *et al.* 2010), está actualmente en la fase II de desarrollo clínico. Los resultados provisionales revelaron que el 87% de los pacientes tratados con BIT225 y peg-IFN- α /RBV tenían el ARN-VHC indetectable después de 3 meses de tratamiento (Tanwandee *et al.* 2012, Luscombe *et al.* 2010).

Otros. La silibinina (SIL) es un producto natural extraído del cerdo (*Silybum marianum*) se considera un antiviral específico contra el VHC con capacidad de inhibir la polimerasa y considerado un INN (Ahmed-Belkacem *et al.* 2010, White *et al.* 2007, Wagoner *et al.* 2010). Se ha probado con éxito este extracto natural por vía intravenosa (Legalon SIL®, Rottapharm-Madaus) en pacientes no respondedores de la terapia estándar (Ferenci *et al.* 2008, Biermer *et al.* 2009), en pacientes co-infectados con VIH (Payer *et al.* 2010), y en la prevención de reinfección de VHC en pacientes trasplantados (Neumann *et al.*

2010, Beinhart *et al.* 2011, Ferenci *et al.* 2013). Recientemente han estudiado el mecanismo de acción de la silibinina mediante un modelado de la cinética viral *in vivo*. Los resultados obtenidos demuestran que SIL puede bloquear tanto la infección y la producción y liberación de viriones, y que su principal efecto es dosis dependiente (Guedj *et al.* 2012).

Envuelta (anticuerpos neutralizantes). Los estudios de la respuesta a los anticuerpos neutralizantes (Ac-N) han contribuido en la comprensión de la progresión natural de la infección de la hepatitis C. Hay evidencia de que la especificidad y la potencia de la respuesta temprana de los anticuerpos pueden influir en la infección aguda, y en el control del VHC durante la infección crónica. Los sistemas *in vitro* e *in vivo* nos está permitiendo obtener una mejor comprensión de los determinantes de anticuerpos que conducen a la protección.

Los anticuerpos neutralizantes contra proteínas de la envoltura viral eran una opción obvia para la inhibición de la propagación viral, mostrando una eficacia *in vitro* con diferentes genotipos (Meunier *et al.* 2005, Scheel *et al.* 2008, Zeisel *et al.* 2011, Pedersen *et al.* 2013). Desafortunadamente, su eficiencia *in vivo* resultó ser muy inferior (Schiano *et al.* 2006, Meuleman *et al.* 2011). Recientemente han desarrollado un método de detección de anticuerpos neutralizantes *in vitro* para todos los genotipos del VHC, que proporcionará un modelo eficaz para el cribado (Yang *et al.* 2013b). Sin lugar a dudas, uno de los principales retos para el futuro será la de aprovechar este conocimiento para el desarrollo de vacunas y tratamientos basadas en anticuerpos eficaces (Ball *et al.* 2014).

1.8.2.4. **Inhibidores de proteínas del huésped**

El diseño de fármacos dirigidos a proteínas del huésped representa otro desafío en el campo del desarrollo terapéutico, teniendo como referencia el éxito del desarrollo del Maraviroc, antagonista del co-receptor CCR5 para el tratamiento del VIH-1 (Wilkin *et al.* 2012).

Inhibidores de entrada. Para los factores de entrada EGFR, EphA2 y NPC1L1 que contribuyen al ingreso a las células del VHC, existen inhibidores ya aprobados por la FDA: para otras patologías el Erlotinib (inhibidor de

EGFR para el tratamiento de varios tipos de cáncer) (Minna y Dowell 2005, Comis *et al.* 2005), el Dasatinib (inhibidor de Eph2A para leucemias mielógena crónica y linfoblásticas agudas) (Kantarjian *et al.* 2006), y el Ezetimibe (inhibidor de NPC1L1 para el tratamiento de la hipercolesterolemia) (Earl *et al.* 2003). Varios experimentos han demostrado que son eficientes inhibidores de la entrada del VHC *in vitro* (Lupberger *et al.* 2011, Sainz *et al.* 2012, Xiao *et al.* 2014, Barretto *et al.* 2014), por lo que es interesante determinar el potencial terapéutico de estos fármacos en pacientes infectados por VHC.

También se ha reportado *in vitro* que la molécula de té verde, EGCG, inhibe potentemente la entrada del VHC y podría ser parte de una estrategia antiviral (Ciesek *et al.* 2011).

Anticuerpos Antagonistas. También se han desarrollado anticuerpos antagonistas del receptor de entrada SR-B1, mostrando una alta eficacia en un modelo murino con hígado humanizado susceptible a la infección por el VHC (Lacek *et al.* 2012, Brimacombe *et al.* 2011, Meuleman *et al.* 2012). El fármaco ITX-5061 (iTherX), se encuentra en la actualidad en fase IIa de desarrollo clínico (Zhu *et al.* 2012, Syder *et al.* 2011). Un flavonoide de origen vegetal, BJ486K altera la entrada del VHC *in vitro* por un mecanismo de acción distinto de inhibición de SR-B1 (Haid *et al.* 2012). Otros inhibidores de entrada incluyen el ITX-4520, Pro-206 (progenics), y SP-30 (Samaritan) (Schlütter *et al.* 2011).

Ciclofilina. CypA es un factor del huésped crítico para la replicación del VHC y está implicado en la isomerización cis/trans de los dominios 2 y 3 de NS5A, estimulando la actividad NS5A de unión a ARN y a la ARN polimerasa del virus (Paeshuyse *et al.* 2006, Ciesek *et al.* 2009, Foster *et al.* 2011b, Verdegem *et al.* 2011, Coelmont *et al.* 2010). Alisporivir (Debio-025-Novartis), es el inhibidor más avanzado clínicamente. La interacción de CypA/NS5A es interrumpida por el Alisporivir (Coelmont *et al.* 2010) de forma pangnotípica y con bajo potencial de selección de resistencia (Coelmont *et al.* 2010, Flisiak *et al.* 2009, Crabbé *et al.* 2009, Gallay *et al.* 2013). Es importante destacar que el tratamiento basado en Alisporivir + RBV

libre de IFN, es efectivo en más del 80% de pacientes infectados con genotipo 2/3 (Pawlotsky *et al.* 2012). Sin embargo, la FDA recientemente puso en espera la fase III de desarrollo clínico, debido a que se observó pancreatitis en algunos pacientes. De acuerdo a los estudios clínicos publicados, Alisporivir representa la primera prueba de concepto para una terapia anti-VHC basada en inhibidores de proteínas del huésped (Flisiak *et al.* 2012, Guedj *et al.* 2014). Otros inhibidores de la ciclofilina en desarrollo son SCY-635, SCY-465 (Scynexis) y NIM811 (Novartis) (Hopkins *et al.* 2012, Lawitz *et al.* 2011).

miARN. El Miravirsén (SPC3649-Santaris Pharma A/S), es un ácido nucleico antisentido (fosforotioato de oligonucleótido) que inhibe la actividad del miR122 (Chang *et al.* 2008, Henke *et al.* 2008), un microARN (miARN) que se une a la porción 5' NCR-IRES del ARN del VHC y es requerido para la traducción y replicación del virus (Lanford *et al.* 2010, Jopling *et al.* 2005). La inhibición del miR122 presenta varias ventajas ya que éste es un miARN que se dirige a secuencias conservadas entre genotipos del VHC y es específico del hígado. Después de las pruebas de la actividad antiviral en primates (Lanford *et al.* 2010), el Miravirsén ha entrado en fase de desarrollo clínico y representa el primer compuesto de su clase en administrarse a pacientes. Es importante destacar que no hay pruebas de aparición de mutaciones de resistencia lo que sugiere que el VHC no puede adaptarse a la presión impuesta por Miravirsén (Reesink *et al.* 2012). Estos resultados le sitúan como un inhibidor muy prometedor para utilizarlo en combinación con AAD.

Otros. Se ha demostrado recientemente que inhibidores de un cofactor del huésped la quinasa PI4K, como PIK93 y 4-anilino quinazolina (AL-9), inhiben de manera eficiente la replicación tanto en el genotipo 1 y 2 del VHC (Bianco *et al.* 2012, Borawski *et al.* 2009). La actividad quinasa PI4K se requiere para la formación de la red membranosa, y su silenciamiento provoca una agregación de vesículas de doble membrana y complejos de replicación del VHC (Reiss *et al.* 2011, Berger *et al.* 2011, Tai *et al.* 2011).

Citocinas. El peg-INF- λ (IL-29) tiene efectos antivirales contra el VHC (Zhang *et al.* 2011, Doyle *et al.* 2006). En fase Ib de desarrollo clínico,

administrando a los pacientes, en combinación con RBV, no ha demostrado toxicidad sistémica significativa (Muir *et al.* 2010a;2010b). Los datos preliminares de fase IIB de desarrollo clínico, muestran que el peg-INF- λ administrado en dosis más altas combinado con RBV, produce niveles indetectables de ARN-VHC en la semana 12 del tratamiento en el 30% de los pacientes con infección por genotipo 1, en comparación con el 28% de los pacientes que recibió peg-INF- α + RBV, pero con menos efectos adversos (Muir *et al.* 2010a; 2010b, Zeuzem *et al.* 2011).

Moduladores metabólicos de lípidos. Se sabe que el VHC interacciona con el metabolismo de lípidos del hospedador (Herker *et al.* 2011), en particular con la vía del mevalonato de la síntesis del colesterol. Los inhibidores de la HMG-Co-A reductasa (estatinas) (Ye *et al.* 2003, Peng *et al.* 2011), se utilizan para tratar a pacientes con dislipidemia y tienen efectos antivirales *in vitro* (Ikeda *et al.* 2006) pero carecen de efecto antiviral significativo *in vivo* (O'Leary *et al.* 2007, Bader *et al.* 2008). Sin embargo se ha demostrado que si se administran en combinación con peg-IFN y RBV, aumentan la tasa de SVR entre los pacientes infectados con genotipo 1 (50%-63%) (Georgescu *et al.* 2011), considerando como un tratamiento complementario particularmente para pacientes que son difíciles de tratar (Schaefer y Chung 2012).

1.8.3. Resistencia a los antivirales

La aparición de variantes virales resistente a los AAD es uno de los factores que deben tenerse en cuenta en el manejo de los pacientes tratados (Cortez *et al.* 2011), así como el número de cambios requeridos para que se genere una variante resistente (barrera genética), el grado de resistencia conferido por un cambio de aminoácido y la abundancia de la variante dentro de las "cuasiespecies" (Kwong *et al.* 2008). Además, la liberación estimada de 10^{12} partículas de virus por día crea un grupo extremadamente grande y divergente de genomas, de los que las variantes resistentes pueden emerger y dominar la población de virus bajo presión selectiva de fármacos (Neumann *et al.* 1998). La resistencia clínica siempre estará en relación con el nivel de resistencia conferido por una variante potencia y la exposición del fármaco en

el paciente. En la tabla 5 se resumen las sustituciones más importantes implicadas en la resistencia a los AAD inhibidores de la proteasa NS3/4A, NS5A y la polimerasa NS5B más significativos.

Clase de Inhibidor	Variaciones de aminoácidos implicados en la resistencia
1ª generación IP NS3/A	
Ciluprevir	R155K/T/Q, A156V/T, D168A/V/T/H
Telaprevir	V36M/A, T54A, R155K/T, A156V/T/S, V36M/A+R155K/T, V36M/A+A156V/T
Boceprevir	V36M/A/L, T54S/A, R155K, V55A, R155T, A156S, V158I, V170A, I170T
2ª Generación IP NS3/A	
Danoprevir	R155K, D168E
Simeprevir	Q80R/K, R155K/T/Q, A156S/V/T, D168A/V/T/H
Asunaprevir	R155K, A156V/T, D168A/E/T/V/Y
Narlaprevir	V36A/M, R155K/T/Q, A156S/V/T, V170A
MK5172	A156V/T, D168A/V/T/H
Inhibidores NS5A	
Daclatasvir	Q30R, L31 M/V, Y93C/N
IAN polimerasa NS5B	
Mericitabine, Sofosbuvir	S282T, L159F/L320F
PSI-7977	No publicado <i>in vivo</i>
IDX-184	No publicado <i>in vivo</i>
INX-189	No publicado
INN polimerasa NS5B	
Tegobuvir	C316N, Y448H
Filibuvir	M423T/I/V, M426T, I482T
Setrobuvir	M414T/L, G554D, D559G
VCH-759	L419M/V, M423T/I/V, I482L/V/T, V494I/A
VCH-222	L419M, M423T, I482L
ABT-072	C316Y, M414T, Y448H/C, S556G

Tabla 5. *Sustituciones más importantes relacionados con la resistencia viral del VHC en la proteasa NS3, NS5A y polimerasa NS5B. IP (Inhibidores de la proteasa); IAN (Inhibidores análogos de nucleótidos); INN (Inhibidores no nucleosídicos).*

Adaptado de Salvatierra. 2013.

Las mutaciones de resistencia a los nuevos AAD, se han observado tanto *in vitro* como *in vivo* (Kwong *et al.* 2008, Welsch *et al.* 2008, Wyles 2013). Además, las personas infectadas con VHC no tratadas, pueden poseer variantes virales naturales que albergan mutaciones de resistencia. Los datos actuales indican que hay mutaciones preexistentes a inhibidores de la proteasa NS3, a los inhibidores de NS5A, y a los inhibidores no nucleosídicos de la polimerasa NS5B en el 7,7%, 16,2%, y el 22,5%, de los pacientes infectados (López-Labrador *et al.* 2008, Margeridon *et al.* 2010; 2011, Wyles y Gutierrez 2014). Probablemente estas variantes virales contribuyen a la selección de resistencias a AAD durante las semanas iniciales del tratamiento en monoterapia (Sarrazin *et al.* 2007a; 2007b, Kuntzen *et al.* 2008, Susser *et al.* 2011). Además, hay diferencias en la barrera genética de resistencia entre los subtipos virales. Cuanto mayor sea el número de cambios de nucleótidos necesarios para cambiar un aminoácido, mayor será la barrera genética contra la resistencia. El VHC subtipo 1a tiene una menor barrera genética para los IP, y la emergencia de la resistencia es más frecuente que con el subtipo 1b (Halfon y Locarnini 2011). Los inhibidores de NS3 de primera generación, de NS5A, y los INN generalmente tienen una barrera genética baja para el desarrollo de la resistencia, es decir, sólo una o dos sustituciones de nucleótidos dan como resultado la falta de eficacia de los fármacos (Asselah y Marcellin. 2012), y una rápida aparición de resistencia durante la monoterapia (Sarrazin *et al.* 2007a; 2007b, Fridell *et al.* 2011a; 2011b). Por el contrario, los IAN tienen una alta barrera genética a la resistencia; se necesitan tres o más sustituciones de nucleótidos. La resistencia también surge rápidamente cuando se utilizan en combinación dos AAD, ambos con baja barrera genética. Al igual que en el tratamiento del VIH, se requiere una combinación de agentes para optimizar la supresión viral y evitar contra el desarrollo de resistencia (Figura 29). Además de las mutaciones simples que confieran alto nivel de resistencia, la acumulación gradual y sinérgica de mutaciones con menor efecto de resistencia puede llevar también al fallo de futuros tratamientos.

Por otra parte, dentro de cada individuo infectado la población de “cuasiespecies” virales puede contener algún genoma con mutaciones de resistencia en proporciones inferiores a las detectables mediante secuenciación *Sanger* directa estándar. Sin embargo, mediante el análisis “*gold-standar*” de

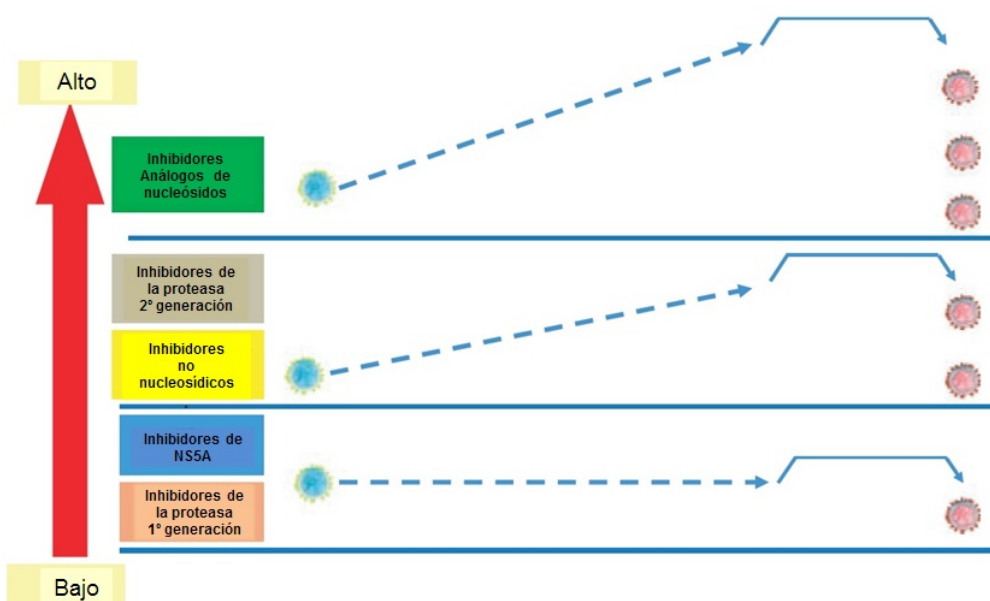


Figura 29. **Barrera genética del VHC a los agentes antivirales de acción directa STAT-C.** La barrera genética se define por el número de mutaciones requerido para que un virus pueda convertirse en resistente a los medicamentos y la probabilidad para seleccionar la mutación en presencia de un fármaco. Adaptado de Halfon y Sarrazin 2012.

secuenciación de múltiples clones se puede aumentar la sensibilidad de la detección de variantes poblacionales virales minoritarias en un mismo individuo (Kieffer *et al.* 2010), evaluando si se convierten en el genoma dominante durante el tratamiento (Thompson *et al.* 2009, Chinnaswamy *et al.* 2010). Por lo tanto, la caracterización de variantes resistentes es óptima y sensible cuando se aborde mediante la secuenciación de varios clones del virus aislado de cada paciente. Mediante secuenciación directa, sólo pueden ser detectadas variantes con una frecuencia de aproximadamente un 20% de la población viral (Torres-Puente *et al.* 2003, Bartels *et al.* 2008, Nasu *et al.* 2011, Fonseca-Coronado *et al.* 2011). Además, el análisis clonal también permite el análisis de mutaciones ligadas en un mismo aislado. Con el desarrollo de nuevas tecnologías de ultrasecuenciación es posible secuenciar una mayor proporción de variantes de forma rápida. La ultrasecuenciación está siendo utilizada para detectar las variantes virales minoritarias de resistencia a antivirales específicos contra el VHC y VIH, ya que alcanza la sensibilidad de la clonación, aunque no informe sobre el ligamiento de las mutaciones. (Fishman y Branch 2009, Fonseca-Coronado *et al.* 2012).

1.8.3.1. *Resistencia a los inhibidores de la proteasa*

El uso de los AAD implica la posibilidad de selección de variantes resistentes. La resistencia a antivirales es como resultado de cambios de aminoácidos que producen cambios conformacionales que interfieren con la interacción fármaco-diana. Normalmente, estas mutaciones suponen un coste biológico y los virus portadores de estas mutaciones se encuentran en menor número que los que poseen el “genotipo salvaje”; sin embargo, pueden ser seleccionados positivamente durante la terapia (Thompson *et al.* 2009). Es decir, teóricamente, todos los pacientes infectados el VHC disponen, antes del inicio de cualquier tratamiento, de una población heterogénea de genomas que puede incluir variantes resistentes a inhibidores a diferentes niveles.

Por ejemplo, la selección de resistencia a los IP lineales y macrocíclicos por sustituciones de aminoácidos está bien documentado *in vitro* e *in vivo* (Kieffer *et al.* 2010, Sarrazin y Zeuzem 2010). La mutación en la posición R155K de la proteasa NS3 confiere resistencia a ambos inhibidores lineales y macrocíclicos *in vitro*, aunque a niveles diferentes. Sobre la base de las diferentes estructuras de los IP (macrocíclicos y lineal), se puede esperar la selección de variantes con cambios en diferentes sitios fuera del sitio activo. Otro ejemplo, la mutación en la posición 168 ha demostrado ser importante para IP macrocíclicos, mientras que en las posiciones 36 o 54 son importantes para los inhibidores lineales (Kieffer *et al.* 2010).

La selección de mutantes resistentes es rápida (durante las primeras semanas de la exposición a AAD), y específica de inhibidor, aunque el tratamiento concomitante con peg-IFN/RBV permite el control viral (Kieffer *et al.* 2007). Una de las principales preocupaciones de resistencia a los IP de primera generación es la resistencia cruzada. Las sustituciones en los residuos de R155 y A156 confieren alto nivel de resistencia tanto a BOC como a TPV, y resistencia cruzada a más inhibidores de la proteasa NS3/4A (Sarrazin y Zeuzem 2010; 2007, Susser *et al.* 2009). Las sustituciones en los residuos de V36 y T54 confieren bajo nivel de resistencia a BOC y TPV, y V170 y V55A sólo a BOC (Susser *et al.* 2009). Existe también alguna resistencia cruzada de las mutaciones en las posiciones 36, 54 y 170 con otros compuestos, mientras que los cambios en las posiciones 80, 155 y 168 están implicados en la resistencia a inhibidores macrocíclicos (Sarrazin *et al.* 2010, Bae *et al.* 2010,

Lim *et al.* 2011, Nijhuis *et al.* 2009). También podemos observar que la mutación V36M, confiere una resistencia baja a moderada a TPV, BOC, y Narlaprevir, y mayor a TPV en combinación con una mutación R155K o A156T (Sarrazin *et al.* 2007). La combinación de dos mutaciones de resistencia para el mismo inhibidor o de clase diferente, puede tener un potencial amplio de resistencia tanto a inhibidores lineales como macrocíclicos (Sarrazin *et al.* 2007). Las variantes resistentes seleccionadas han sido implicadas en la recidiva tardía tras el cese del tratamiento, y pueden disminuir o permanecer detectables en la población viral años después del fracaso del tratamiento (Zeuzem *et al.* 2008, Susser *et al.* 2008; 2010).

La proteasa NS3/4 es polimórfica en sitios asociados con la resistencia, tanto entre los genotipos 1-6 del VHC, como entre algunos subtipos. Debido a esto podemos encontrar variaciones, por ejemplo en la posición V170, que están presentes en la mayoría de los aislados genotipo 1 del VHC, y que el polimorfismo en la posición D168 sea característico del genotipo 3 (López-Labrador *et al.* 2008). Debido a que el desarrollo de los IP se ha basado principalmente en el genotipo 1 del VHC, subtipo 1b, su actividad antiviral con genotipos no-1b, puede no ser tan eficaz, aunque algunos inhibidores de la proteasa inhiben más de un genotipo del VHC (Bae *et al.* 2010, Lim *et al.* 2012, Imhof y Simmonds 2011, Gottwein *et al.* 2011, Moreno *et al.* 2012). Estudios realizados en varios países han encontrado resistencia a AAD en pacientes no tratados previamente (prevalencia hasta el 5,5%), incluso dentro de genotipo 1 del VHC (Bartels *et al.* 2008, Kuntzen *et al.* 2008, Gaudieri *et al.* 2009). Por lo tanto, los polimorfismos de origen natural “genotipo salvaje”; pueden modificar la respuesta al tratamiento por AAD. Las variantes preexistentes resistentes a BOC o TPV pueden afectar la respuesta virológica antes de iniciar el tratamiento y llevar al fracaso terapéutico (Hiraga *et al.* 2011, Vermehren *et al.* 2012). Otra evidencia es la variación Q80K (presente aproximadamente en un 40% de los pacientes infectados con subtipo 1a, en los Estados Unidos y Europa), que confiere resistencia natural al Simeprevir, por lo que se recomienda secuenciar y si se detecta esta mutación antes del inicio del tratamiento, recomendar otras opciones terapéuticas (FDA 2014, EMA 2014, EASL, AASLD 2014).

1.8.3.2. *Resistencia a los inhibidores de la polimerasa*

Aunque el gen NS5B es menos variable que otras partes del genoma del VHC, el polimorfismo genético y la mutación también puede limitar la eficacia de inhibidores específicos de NS5B (Le Pogam *et al.* 2008, Gaudieri *et al.* 2009, Beaulieu *et al.* 2009, Shi *et al.* 2008). El potencial de emergencia de resistencias está afectado por múltiples factores que incluyen si el inhibidor es alostérico o análogo de nucleósido. Los IAN normalmente actúan en el sitio catalítico de la polimerasa NS5B. Se ha estudiado en un modelo de replicón las sustituciones que confieren resistencia a los IAN (S282T, S15G, R222Q, C223Y, C223H, L320I, V321I) (De Francesco *et al.* 2007, Thompson *et al.* 2009, Lam *et al.* 2011), y se requiere una combinación de al menos tres cambios (por ejemplo: S15G/C223H/V321I) para conferir un alto nivel de resistencia (Sofía *et al.* 2012) Además, los IAN poseen una actividad antiviral pangenotípica y muestran una alta barrera genética para la aparición de la resistencia (McCown *et al.* 2008) y no se han observado, hasta el momento, mutaciones de resistencia en monoterapia (Le Pogam *et al.* 2010, Pawlotsky *et al.* 2012a) o en combinación con otros AAD (Gane *et al.* 2010, Le Pogam *et al.* 2012, Najera *et al.* 2013), pero si con peg-IFN- α /RBV, aunque en muy pocos pacientes Además, la utilización de IAN en combinación con peg-IFN- α /RBV, se ha identificado mutaciones de resistencia en muy baja frecuencia (Tong *et al.* 2014a; 2014b, Gane *et al.* 2014b). Los IAN son por lo tanto los fármacos más prometedores debido al número limitado de mutaciones de resistencia descrito (Gelman y Glenn 2011), y por la baja frecuencia de virus resistentes que circulan en la población (Le Pogam *et al.* 2008, Sentandreu *et al.* 2010, Rong *et al.* 2010).

En comparación con los IAN, los INN exhiben diferentes perfiles de resistencia en función del sitio de acción en la polimerasa NS5B. Al contrario que con los IAN las sustituciones asociadas con resistencia a INN son numerosas, y se encuentran principalmente en los cuatro sitios alostéricos A, B, C y D. Algunos cambios particulares pueden ser extremadamente importantes para la resistencia, por ejemplo la mutación en el codón M423V/I, aumenta 31 veces la resistencia a la droga AG-02154 (Shi *et al.* 2008). También las mutaciones secundarias pueden aumentar los perfiles de resistencia. Por ejemplo, cuando se combina algunas de las siguientes sustituciones T19P,

M71V, M423V ó A442T, con A338V se provoca un aumento de hasta 17 veces la resistencia a tiopenos y dihidropironas (Howe *et al.* 2006). La sustitución C316N es frecuente en el VHC subtipo 1b (Le Pogam *et al.* 2008) y junto con Y448H, D559G ó Y555C pueden aumentar hasta 30 veces la resistencia a los benzofuranos. Las respuestas variables ante los diferentes INN puede deberse por tanto a polimorfismos naturales del virus que implica diferente susceptibilidad basal (Sun *et al.* 2011).

JUSTIFICACION

La infección crónica por el VHC sigue siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial, afectando a 200 millones de personas (unas 900.000 en España) y ocasionando unas 10.000 muertes al año. En España, además de ser la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular, la infección es la indicación más frecuente de trasplante hepático.

El tratamiento de la infección crónica basado sólo en peg-IFN- α /RBV tiene un éxito en el 40% de los pacientes y está asociado a efectos secundarios a veces graves, que pueden llevar a la parada del tratamiento. La reinfección del injerto post-trasplante es universal, ocasionando una hepatitis más agresiva y más difícil de tratar con peg-IFN- α /RBV, con efectos adversos muy frecuentes. En pacientes con enfermedad avanzada o trasplantados, el acceso a los nuevos tratamientos con AAD es fundamental para mejorar su pronóstico y detener la progresión de la enfermedad. En España, para aquellos pacientes con infección por VHC genotipo 1, el tratamiento estándar incluye IP de primera (Telaprevir ó Boceprevir) ó de segunda generación (Simeprevir) con unas tasas de respuesta del 75-85%, aunque en los últimos años, se han desarrollado otros AAD (como el Sofosbuvir ó el Daclatasvir) que, en combinación, aumentan la tasa de éxito del tratamiento hasta el 95% incluso en ausencia de interferón. Sin embargo, aunque la tasa de curación con AAD es mayor, se ha observado una menor eficacia en ciertos pacientes, debido a mutaciones de resistencia del virus, bien por selección de mutaciones pre-existentes, ó bien por emergencia durante la administración AAD, Además, en pacientes trasplantados inmunodeprimidos, el VHC puede estar sometido a una menor presión selectiva, y presentar una variabilidad genética diferente en relación a pacientes inmunocompetentes. Por tanto es importante determinar la variación natural del genoma del VHC y su posible impacto en el tratamiento con nuevos AAD en estos grupos de pacientes, para prevenir potenciales fallos terapéuticos y optimizar los futuros regímenes terapéuticos, escogiendo los AAD más adecuados para cada caso.

OBJETIVOS

Objetivo general e hipótesis.

El objetivo de esta tesis doctoral es analizar la variabilidad genética en el gen NS3 y NS5B del VHC (diana de AAD inhibidores de la proteasa y polimerasa viral) en distintos aislados naturales del subtipo 1b obtenidos de pacientes con infección crónica, partiendo de la hipótesis de que ya se encuentran en circulación virus resistentes a estos nuevos fármacos.

Objetivos específicos

1. Poner a punto la secuenciación de la proteasa NS3 y la polimerasa NS5B del VHC en muestras clínicas de pacientes con hepatitis crónica C.
2. Poner a punto el estudio de mutaciones minoritarias de resistencia a AAD mediante clonación y secuenciación, para detectar poblaciones de la “cuasiespecie” del virus indetectables mediante secuenciación directa y que podrían ser seleccionadas durante el tratamiento con AAD.
3. Determinar la prevalencia de polimorfismos naturales relacionados con resistencia a AAD en la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B del VHC en aislados de pacientes infectados por el subtipo 1b del virus, a dos niveles: entre pacientes e intrapaciente.
4. Evaluar la variabilidad genética natural de la proteasa y el grado de polimorfismo de la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B del VHC en posiciones asociadas a resistencia a AAD, en función del origen geográfico de los aislados y de la presencia ó ausencia de inmunosupresión.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Muestras clínicas

Las muestras utilizadas para esta tesis doctoral provienen de un estudio observacional prospectivo de modelo cohorte en dos centros hospitalarios, el Hospital Universitario La Fe (HLF) de Valencia y el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona (HUGTIP), realizado en pacientes con hepatitis crónica C candidatos a tratamiento antiviral para determinar la variabilidad genética y resistencias del VHC. Se incluyeron en el estudio pacientes mayores de edad diagnosticados de hepatitis crónica por VHC naïve o previamente tratados con Peg-IFN+RBV, y naïve a AAD. Los criterios de inclusión fueron: 1) Hepatitis crónica por el VHC (anti-VHC+ ARN-VHC+), incluida la hepatitis C recurrente post-trasplante hepático. Los Criterios de exclusión fueron: 1) Todos aquellos que no firmaron el consentimiento informado. 2) Todos aquellos que no cumplieron los criterios de inclusión. 3) Coinfección con VHB. 4) Coinfección con VIH. Se recogieron sistemáticamente muestras de suero o plasma aprovechando las visitas de seguimiento de los pacientes, que permanecieron congeladas a -70°C hasta el momento de su envío al laboratorio en FISABIO-Salud Pública.

3.2 Extracción de ARN viral y síntesis de ADNc

El ARN total fue extraído de 500 µl de suero utilizando un método de partículas de sílice con un kit comercial (*Nuclisens Magnetic Extraction Reagents miniMag*, Biomérieux, Durham, Inglaterra) y eluyendo con tampón inorgánico en un volumen final de 50 µl, según el protocolo del fabricante (ANEXO I). El método de separación de ácido nucleico está basado en la química de Boom (Boom *et al.* 1990) que utiliza partículas magnéticas de sílice. Brevemente, bajo condiciones de alta salinidad, el ácido nucleico se unirá a las partículas de sílice. Estas partículas de sílice actúan como una fase sólida y los componentes que no sean ácido nucleico se eliminan mediante varios pasos de lavado.

Finalmente, los ácidos nucleicos son eluidos de la fase sólida en 50 µl de tampón de elución (no detallada por el fabricante). Para obtener ADN complementario al ARN viral (ADNc), se realizó una retrotranscripción (RT)

de 15 μ l del ARN extraído, usando la retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, EEUU), y hexámeros aleatorios como cebadores. La mezcla de la reacción de retrotranscripción en un volumen final de 60 μ l fue la siguiente:

-hexámeros 25-250 ng	(3 μ l)
-dNTPs 25mM	(1,2 μ l)
-tampón de reacción SuperSriptIII x5 (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂) pH 8.3 a temperatura ambiente	(12 μ l)
-DTT 0,1M	(0,6 μ l)
- Inhibidor ARNasas (ARNsin Promega) 40U/ μ l	(1,5 μ l)
-SuperScriptIII 200U/ μ l	(3 μ l)
-H ₂ O	(18,3 μ l)
-ARN	(15 μ l)

Las condiciones de temperatura para la síntesis de ADNc fueron las siguientes:

- desnaturalización inicial 65°C, 5 min.
- pasar a hielo 10 min.
- hibridación de cebadores 25°C, 10 min.; 35°C 10 min.
- retrotranscripción: 50°C 60 min.

Posteriormente, se desnaturalizó la retrotranscriptasa (a 70°C, durante 15 min.) para impedir la interferencia en reacciones posteriores. Finalmente, se degrada el ARN original utilizando 1 μ l de ARNsa H de *E.coli* (10 U/ μ l) a 37°C, durante 20 min.

3.3 Amplificación del gen de la proteasa NS3 del VHC

La región NS3 del virus se amplificó a partir del ADNc, utilizando amplificación anidada, debido a la relativamente baja concentración de virus circulante en suero y al tamaño de la región de 1.893 pb.

Los cebadores (Tabla 6) fueron diseñados específicamente para el genotipo 1 del VHC, utilizando un alineamiento de secuencias de ese genotipo obtenido de la base de datos de Los Alamos (<http://hcv.lanl.gov/content/index>). Algunos de los cebadores fueron diseñados con degeneraciones para una mayor

cobertura de amplificación en diversos aislados. La figura 30 muestra el esquema de la estrategia seguida para la amplificación y secuenciación del gen NS3/4A del VHC.

Reacción	Cebador (sentido)	Secuencia (5'-3')
Primera amplificación	-ns3-3243	GAGCCCGTCGTCITCTC
	-ns3a1	VAGGACBCCGCCHACBA
Segunda amplificación 1º ronda	-ns3g2	GCVGCRTGYGGDGACATCAT
	-ns3a2	ACBCCGCCHACBAGCACCCA
Segunda amplificación nested 3'	-ns3-5	ACGTACTCCACCTACGGCAA
	-ns3a2	ACBCCGCCHACBAGCACCCA
Segunda amplificación nested 5'	- ns3g2	GCVGCRTGYGGDGACATCAT
	- ns3-6	AAGGTAGGGTCAAGGCTGAA
Segunda amplificación Control interno	-ns3-7	CATCCCAACATCGAGGAGGT
	-ns3-8	TTGCAGTCTATCACCGAGTC

Tabla 6. *Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de la proteasa NS3.*

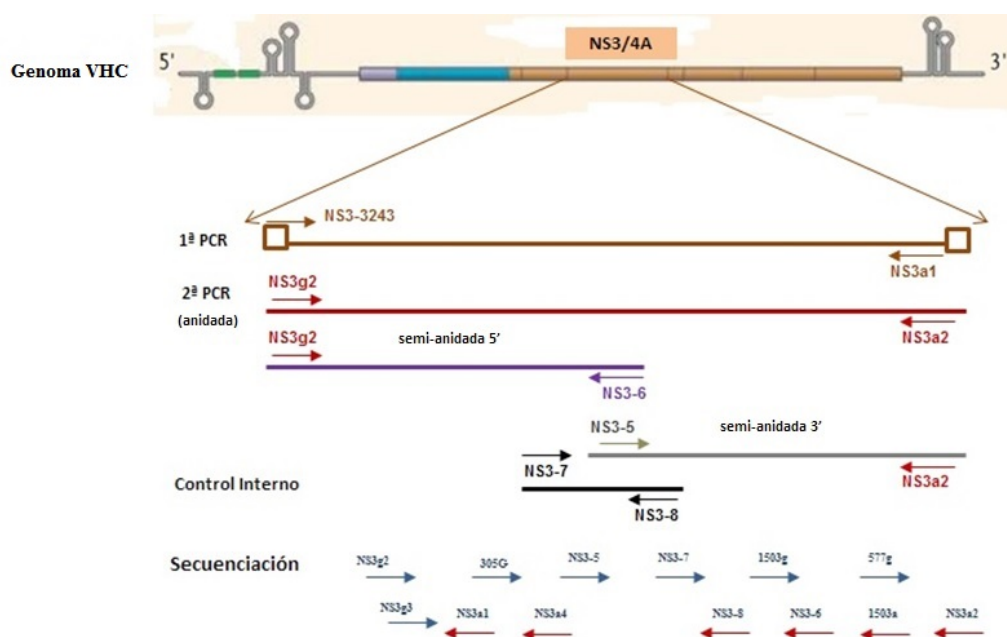


Figura 30. *Estrategia seguida para la amplificación del gen de la proteasa NS3 del VHC.* En la figura se representan esquemáticamente las PCR realizadas así como los cebadores empleados en cada una de ellas. La segunda PCR (anidada) son en realidad cuatro amplificaciones secundarias en paralelo. También se muestran los cebadores utilizados para la secuenciación del gen (ver más adelante). Esquema adaptado de Liang y Ghany 2013.

Para la primera amplificación en un volumen final de 50 μ l se utilizaron:

-tampón de reacción PhuHS HF x5 (7.5 mM MgCl ₂)	(10 μ l)
-dNTPs 2mM	(5 μ l)
-cebadores 10 uM:	
- NS3-3243 (directo)	(2,5 μ l)
- NS3a1 (reverso)	(2,5 μ l)
-H ₂ O	(24,5 μ l)
-polimerasa alta fidelidad (2U/ μ l)	(0,5 μ l)
- ADNc	(5 μ l)

La polimerasa termoestable de alta fidelidad de copia (Phusion™ Hot Start HF II, Finnzymes, Espoo, Finlandia) presenta capacidad correctiva de errores, con una tasa de error igual o menor de 1/9.000 nucleótidos, y una mayor procesividad para fragmentos largos. Las condiciones de reacción de la PCR fueron las siguientes:

- desnaturalización del ADNc 2 minutos a 98°C
- 2 ciclos de 30 seg. a 98°C, 30 seg. a 42°C y 2 min. a 72°C y 35 ciclos de 30 seg. a 98°C, 30 seg. a 55°C y 4 min. a 72°C seguidos por un paso de elongación final de 10 min. a 72°C.

Para la segunda amplificación, se realizaron cuatro amplificaciones secundarias en paralelo (a,b,c,d), utilizando en cada caso 1 μ l de la primera amplificación como ADN molde:

- (a) una segunda amplificación anidada del total del gen NS3 del VHC (cebadores: NS3g2 y NS3a2)
- dos amplificaciones semi-anidadas por separado: (b) de la porción 5' (NS3g2 y NS3-6), ó (c) de la porción 3' (cebadores NS3-5 y NS3a2).
- (d) una amplificación de un fragmento interno corto de NS3 como control positivo de amplificación (cebadores NS3-7 y NS3-8).

Para las segundas amplificaciones también se utilizó la enzima Phusion™ Hot Start II y las condiciones de reacción fueron las siguientes:

- desnaturalización de 2 minutos a 98°C
- 35 ciclos de 30 seg. a 98°C, 30 seg. a 70°C y 4 min. a 72°C seguidos por un paso de elongación final de 10 min. a 72°C.

Tanto en la extracción de ARN, la síntesis de ADNc, amplificaciones primarias como en las secundarias, se incluyeron controles negativos durante todo el proceso (suero y agua).

3.4 Amplificación del gen de la polimerasa NS5B del VHC

La región NS5B del virus (1.773 pb) se amplificó a partir del mismo ADNc, utilizando también amplificación anidada. Los cebadores (Tabla 7) fueron diseñados específicamente para el genotipo 1 del VHC, aunque algunos cebadores fueron diseñados con degeneraciones en algunas posiciones, para aumentar la cobertura de amplificación en diversos aislados.

Reacción	Cebador (sentido)	Secuencia (5'-3')
Primera amplificación	-1b-7481-F1	ATGCCCCCCTYGAGGGRGARCCRGGGA
	-1b-9396-R1	ATGGCCTAWTRWCCTGGAGTG
Segunda amplificación 1° ronda	-1b-7527-F1	CTCAGYGACGGGTCHTGGTCTACCGTGAG
	-11-9371a1	AYCGGTTGGGGAGSAGGTAGA
Segunda amplificación nested 3'	-ns5ba1g- F	TATGATACYCGCTGYTTYGACTC
	-11-9371a1	AYCGGTTGGGGAGSAGGTAGA
Segunda amplificación nested 5'	-1b-7527-F1	CTCAGYGACGGGTCHTGGTCTACCGTGAG
	-ns5ba2a-R	CTCKYAGGCTCGCCGCRTCCCTC
Segunda amplificación Control interno	-ns5ba1g-F	TATGATACYCGCTGYTTYGACTC
	-ns5ba2a-R	CTCKYAGGCTCGCCGCRTCCCTC

Tabla 7. *Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de la polimerasa NS5B.*

La figura 31 muestra el esquema de la estrategia seguida para la amplificación y secuenciación del gen NS5B. También se incluyeron controles negativos durante todo el proceso (de suero y agua). Para la primera amplificación se utilizaron los cebadores 1b-7481-F1 y 1b-9396-R1, en las mismas condiciones de reacción como se describe en el apartado 3.3. Para la segunda amplificación, se realizaron cuatro amplificaciones secundarias en paralelo (a,b,c,d), utilizando en cada caso 1 µl de la primera amplificación como ADN molde:

(a) una segunda amplificación anidada del total del gen NS5B del VHC (cebadores 1b-7527-F1 y 11-9371a1)

- dos amplificaciones semi-anidadas por separado: (b) de la porción 5' (cebadores 1b-7527-F1 y ns5ba2a), ó (c) de la porción 3' (ns5ba1g- F y 11-9371a1).
- (d) una amplificación de un fragmento interno corto de NS5B como control positivo de amplificación (cebadores ns5ba1g- F y ns5ba2a- R).

Para las segundas amplificaciones también se utilizó la enzima Phusion™ Hot Start II y las condiciones de reacción fueron las siguientes:

- desnaturalización de 2 minutos a 98°C
- 35 ciclos de 30 seg. a 98°C, 30 seg. a 60°C y 2 min. a 72°C seguidos por un paso de elongación final de 10 min. a 72°C.

La PCR secundaria (a) (segunda amplificación anidada del total del gen NS5B del VHC) da como resultado un fragmento de 1.773 pb, es decir, abarca todo el gen NS5B; con la semi-anidada de 5' (b) o de 3' (c) se obtienen dos fragmentos correspondientes a la región 5' ó 3' del gen NS5B, respectivamente. Con la amplificación del control interno (d) se obtiene un fragmento corto de 300 pb.

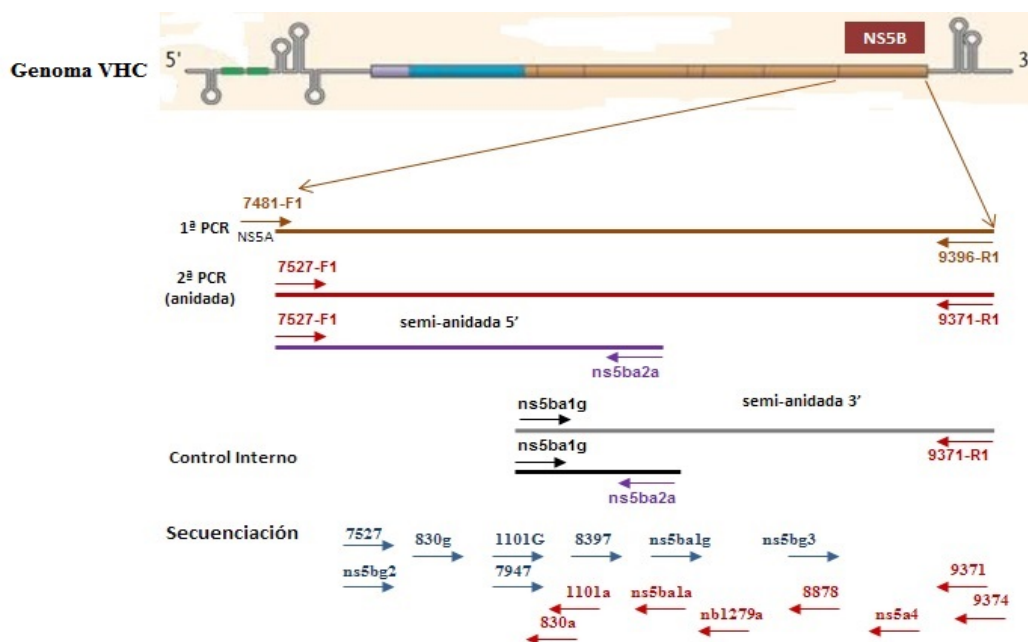


Figura 31. *Estrategia seguida para la amplificación del gen de la polimerasa NS5B del VHC.* En la figura se representan esquemáticamente las PCR realizadas así como los cebadores empleados en cada una de ellas. La segunda PCR (anidada) son en realidad cuatro amplificaciones secundarias en paralelo. También se muestran los cebadores utilizados para la secuenciación del gen (ver más adelante). Esquema adaptado de Liang y Ghany 2013.

3.5 Electroforesis en gel de agarosa

Tras cada PCR, para comprobar la amplificación correcta de los fragmentos de interés y descartar la presencia de amplificaciones inespecíficas, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en una solución tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X (ANEXO II). Para ello se cargaron en el gel para cada muestra 5µl de producto de PCR más 2µl de tampón de carga 6x (ANEXO III) junto con un marcador de peso molecular (ADN Ladder Mix, Fermentas, Vilnius, Lituania), dejándose correr durante 35min a 120V. Posteriormente se tiñe el gel de agarosa en una solución de GelRed™ (Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in H₂O, Biotium, Hayward, California, EE.UU.) al 0,3% durante 30 minutos, y se observa en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.6 Purificación de productos de PCR

Los productos de las amplificaciones positivas fueron purificados mediante filtración en membrana con el kit PCR clean-up NucleoFast 96 PCR (Marcherey-Nagel, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante (ANEXO IV). Durante el proceso, las muestras provenientes de PCR son aplicadas a una membrana de ultrafiltración y mediante vacío los restos de cebadores, dNTPs y sales de la PCR son filtrados y desechados. Los productos de PCR ≥ 150 pb son retenidos por la membrana y recuperados tras la adición de agua o tampón con bajo contenido en sales después de una corta incubación a temperatura ambiente.

3.7 Secuenciación de productos de PCR

Los productos de PCR purificados (aproximadamente 40 ng) se secuenciaron mediante secuenciación cíclica Sanger con terminadores fluorescentes, utilizando el Kit comercial Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) y cebadores específicos en cada caso, incluyendo los mismos empleados para las amplificaciones secundarias (Tabla 8 (a) y (b)). Las condiciones de secuenciación fueron: desnaturalización de 1 minuto a 95°C y 99 ciclos de 30seg. a 95°C, 5 seg. a 50°C y 4 min. a 60°C, utilizando 5µl de ADN y 5 picomoles de cebador. Las reacciones de secuenciación se enviaron al servicio de secuenciación de ADN de la

Universitat de València (<http://scsie.uv.es/scsie-serv/sadn/index.htm>), para procesarlas en un secuenciador automático ABI 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de electroforesis capilar (96 capilares).

(a) NS3	Cebador	Secuencia (5'-3')
Secuenciación (sentido directo)	-ns3g2	GCVGCRTGYGGDGACATCAT
	-ns3g3	GGYYTRCCYGTRTCYGCYCG
	-305g	YTRGTCACSAGRCAAYGC
	-ns3-5	ACGTACTCCACCTACGGCAA
	-ns3-7	CATCCCAACATCGAGGAGGT
	-1503g	GGVAGRCATCTYATYTTCTG
Secuenciación (antisentido)	-ns3a2	ACBCCGCCHACBAGCACCCA
	-ns3a2alma	TGGACYGTBTWYCAYGG
	-ns3a4	GCCGGSACYTTVGTGCT
	-ns3a1	VAGGACBCCGCCHACBA
	-ns3-6	AAGGTAGGGTCAAGGCTGAA
	-ns3-8	TTGCAGTCTATCACCGAGTC
	-1503a	CCBGTRAAGACRCYCTC

(b) NS5B	Cebador	Secuencia (5'-3')
Secuenciación (sentido directo)	-ns5bg2	CTCAGYGACGGGTCHTGGTC
	-1b-7527-F1	CTCAGYGACGGGTCHTGGTCTACCGTGAG
	-1101g	CCACATYMRCTCCGTGT
	-1b-7947-F1	TCCGTGTGGRAGRACYTGCTGGARGACA
	-1b-8397-F1	GGGCAGARCTGYGGHTAYCGCMGGTGCCGC
	-ns5ba1g-F	TATGATACYCGCTGYTTYGACTC
	-830g	GYNTGCTGYTCRATGTC
	-ns5g3	CCTCAGRAARCTTGGGGT
Secuenciación (antisentido)	-830a	GAGTCAAARCARCGGGTR
	-ns5ba1a	GTACCTRGTCATAGCCTCCGTGAA
	-nb1279a	TKATRITTKCCYARCCAGG
	-1b-8878-R1	GAGAAGAARTGRGTCATCARWATCAT
	-11-9371a-1	AYCGGTTGGGGAGSAGGTAGA
	-1b-9374-R1	TTAKCTCMMCAYTCAYCGRKYGGGGAG
	-1101a	GATCACCACGAGATCGTC
	-ns5ba4	TGATAWATGTCTCCCCC

Tabla 8. *Secuencia de los cebadores de secuenciación de la región (a) NS3 y (b) NS5B.*

La secuenciación automática se basa en la utilización de una mezcla de nucleótidos y dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia que se añaden a la síntesis enzimática de nuevo ADN a partir del ADN molde. Cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos está marcado con un fluorocromo diferente, de modo que cada vez que se incorpore un dideoxinucleótido a la cadena naciente se bloqueará la elongación, obteniéndose una población de fragmentos de ADN truncados de diferente longitud. Los productos de reacción se someten entonces a electroforesis capilar durante la cual se excitan los fluorocromos, se capta la luz emitida por cada uno de ellos y se traduce esa luz a señal electrónica, obteniéndose finalmente un gráfico (cromatograma) en el que cada uno de los cuatro nucleótidos está representado por picos de color diferente. Los diferentes cromatogramas obtenidos por el secuenciador automático son remitidos entonces a los investigadores para su análisis. Para evitar señales erróneas y ruido de fondo, previa a la electroforesis capilar, se deben eliminar los terminadores no incorporados durante la reacción de secuenciación. Esto se realizó en el servicio del SCIE, utilizando placas de filtración EDGBIO DTR V3 (Protocolo en ANEXO V). Las placas EDGBIO DTR V3 son placas con columnas de filtración (440 µl volumen) en una matriz estandarizada en gel completamente hidratado. Esta placa ofrece una óptima actuación para la eliminación de los terminadores no incorporados durante la reacción de secuenciación, dNTPs, sales y otros materiales de bajo peso molecular de las reacciones de secuenciación. Estas columnas también eliminan cebadores de ADN y fragmentos de hasta 15 bases, tampones, etc.

3.8 *Análisis de secuencias de nucleótidos*

Las secuencias obtenidas (cromatogramas) fueron revisadas y ensambladas a través de varios procesos utilizando el paquete *Staden* v2.0, dedicado al trabajo con cromatogramas de secuencias de ADN, que consta de varios módulos. Los cromatogramas proporcionados por el servicio de secuenciación en formato (.abi) son pasados primero por el módulo Pregap, el cual realiza una evaluación automática de la calidad, y conversión de los datos en formatos (.exp) y (.ztr). El módulo Pregap proporciona la flexibilidad para seleccionar, configurar y controlar el paso de las lecturas, como así también ampliar el tamaño de las lecturas que pasaron la corrección de calidad. Las

lecturas que superan este módulo son analizadas entonces con el módulo de ensamblaje (Gap4), con el que se construye una base de datos Gap4 para cada muestra, utilizando una secuencia de referencia (aislado HPCJCG del VHC genotipo 1b (código D90208), extraída de la base de datos *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) Mediante este módulo las lecturas se revisan, editan y ensamblan hasta conseguir un solo *contig* para finalmente obtener la secuencia consenso del ensamblaje excluyendo la secuencia de referencia (sólo dominio de la proteasa NS3 y NS5B del VHC) para cada una de las muestras de los diferentes pacientes, en formato *fasta*. Aunque se obtuvieron secuencias del gen NS3/4A completo, para esta tesis doctoral sólo es relevante la secuencia del dominio de la proteasa.

3.9 Determinación de la frecuencia de mutaciones de resistencia a nuevos antivirales

3.9.1 Mutaciones de resistencia a inhibidores de la proteasa NS3

Las secuencias consenso de nucleótidos de la proteasa obtenidas en formato *fasta* (543 pb) fueron alineadas con una secuencia de referencia usando el programa BioEditv7.1.3 (Hall 1999). Este programa contiene un editor y módulos de análisis sencillos de secuencias como el ClustalW v1.4, con el que se alinearon las secuencias (Thompson *et al.* 1994). Posteriormente se tradujeron a aminoácidos, para buscar polimorfismos relacionados con mutaciones descritas en la literatura causantes de resistencia a AAD inhibidores de la proteasa NS3 (IP). Como secuencia de referencia se utilizó la del aislado Con1 del VHC genotipo 1b (código AJ238799), extraída de la base de datos *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) Se utilizó este aislado como referencia porque es el usado para construir el replicón empleado en el desarrollo de la mayoría de AAD.

La frecuencia de mutaciones de resistencia se determinó utilizando el comando de análisis posicional de frecuencia de los aminoácidos del programa BioEditv7.1.3 (Hall 1999).

3.9.1.1 Modelización de mutaciones en la estructura de NS3

Para representar las mutaciones en la estructura tridimensional de la proteasa NS3 se utilizó el programa PyMol 1.1, un visor molecular para producir imágenes 3D y moléculas biológicas como proteínas, que permite la visualización de múltiples conformaciones de una misma molécula (<http://pymol.sourceforge.net>). Como estructura de trabajo se utilizó la del aislado BK del VHC genotipo 1b (código PDB 1CU1) extraída de la base de datos *Protein Data Bank* (www.ebi.ac.uk/pdbsum).

3.9.2 Mutaciones de resistencia a inhibidores de la polimerasa NS5B

Las secuencias consenso de nucleótidos del gen NS5B en formato *fasta* (1.773 pb) también fueron alineadas usando el programa BioEditv7.1.3 mediante el módulo ClustalW v1.4 y se tradujeron a aminoácidos, en busca de mutaciones descritas en la bibliografía como causantes de resistencia a IAN e INN. Como secuencia de referencia en este caso se utilizó la del aislado Con1 del VHC genotipo 1b, descrita anteriormente.

La frecuencia de mutaciones de resistencia se determinó utilizando el comando de análisis posicional de frecuencia de los aminoácidos del programa BioEditv7.1.3 (Hall 1999).

3.9.2.1 Modelización de mutaciones en la estructura de NS5B

Para representar las mutaciones en la estructura tridimensional de la polimerasa NS5B también se utilizó el programa PyMol 1.1. Como estructura de trabajo se utilizó en este caso la del aislado Con1 del VHC genotipo 1b (código PDB 3FQL), extraída de la base de datos *Protein Data Bank* (www.ebi.ac.uk/pdbsum).

3.9.3 Análisis de codones en la región NS3 y NS5B

Se programó un algoritmo en el lenguaje Perl para el análisis de codones en las posiciones de la proteasa NS3 y polimerasa NS5B del VHC asociadas a mutaciones descritas en la bibliografía como causantes de resistencia a AAD. Este análisis permite analizar y observar cuantas sustituciones de nucleótido han ocurrido en cada codón de interés y el tipo de cambio (Figura 32). El algoritmo fue ejecutado en el sistema operativo Windows, utilizando el

intérprete de comandos Active Perl V5.16.3 (Wall *et al.* 2013). Se analizaron las secuencias obtenidas de las regiones NS3 (proteasa) y NS5B de los 60 pacientes incluidos en esta tesis doctoral.

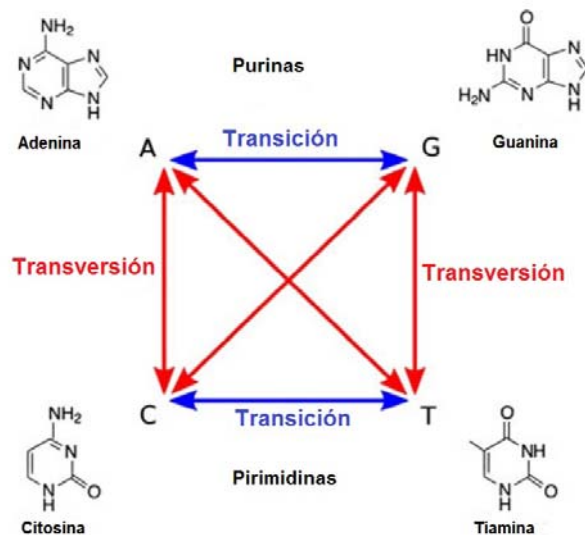


Figura 32. **Definición de transición y transversión nucleotídica.** La barrera genética a la resistencia aumenta con el tipo y número de polimorfismos de un sólo nucleótido, una transición puede conferir una baja barrera genética, en cambio dos transversiones confieren una alta barrera genética. Adaptado de Wyles y Gutierrez 2014.

3.10 Determinación de mutaciones minoritarias en la “cuasiespecie”

Con la técnica de clonación, podemos tener información sobre la heterogeneidad genética de la “cuasiespecie” circulante en cada paciente, mediante el estudio a dos niveles: el número de variantes (complejidad, número de haplotipos) presente en la población viral del paciente, y lo diferente que son entre ellas (diversidad genética). Aproximadamente 30 clones moleculares o variantes virales por paciente/región son suficientes para evaluar las “cuasiespecies” virales presentes en un compartimiento (Torres-Puente *et al.* 2003). Se pretendió poner a punto esta técnica, para detectar variantes minoritarias de resistencia a AAD.

3.10.1 Clonación de productos de PCR

El producto de PCR purificado de las regiones NS3 (proteasa) y NS5B de 10 pacientes (5 pacientes inmunocompetentes y 5 pacientes inmunodeprimidos por trasplante hepático), se utilizó para generar clones mediante ligación con el vector fagémido *pBluescript SK(+)* (Morris *et al.* 1986), linearizado en el sitio de clonaje múltiple (SCM) mediante digestión con *EcoRV* (Figura 33). Las ligaciones con los productos de PCR se realizaron con ADN ligasa del fago T4 y se usaron para la transformación por electroporación de *E. coli* electrocompetentes comerciales (ElectroMax DH5 α cells, Invitrogen). Las células transformadas se pasaron inmediatamente a 1 ml de medio de cultivo SOC (Anexo VI) y tras 1 hr. de incubación a 37°C en agitación (expresión fenotípica), se sembraron en placas de medio LB+ampicilina+X-gal+IPTG (Anexo VII).

3.10.2 PCR de colonia

Se determinó la presencia del inserto en las bacterias que han incorporado y mantenido de forma estable plásmidos recombinantes (trunca el gen de la

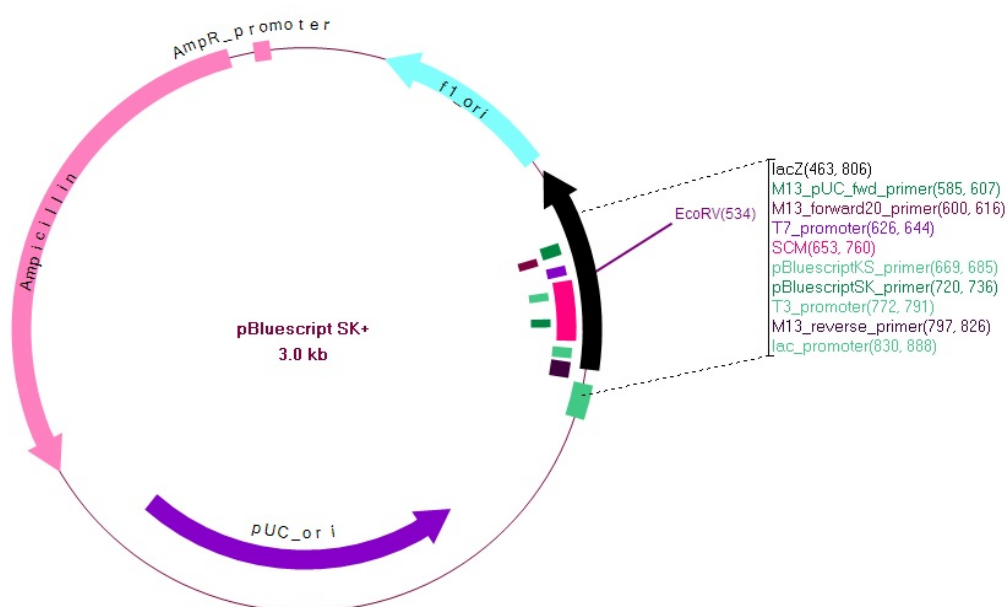


Figura 33. **Esquema del vector fagémido *pBluescript SK(+)*.** En la figura aparecen indicados: el origen de replicación (*pUC ori*), el promotor y gen que confiere a la bacteria resistencia a la ampicilina (*ampicilina*), el origen de replicación del bacteriófago filamentoso *f1* (*f1 ori*), el promotor del gen *lac* (*lac*), el gen *lacZ* que codifica para la β -Galactosidasa (*lacZ*), el SCM y el sitio de corte de *EcoRV*. Esquema realizado con el programa *BVTech Plasmid V5.1*.

β -galactosidasa en el plásmido, dando lugar a colonias de color blanco en placas LB-Xgal-IPTG). Mediante PCR se amplificó el inserto con los cebadores del plásmido SK y KS, que flanquean el SCM. La mezcla de la reacción, en un volumen final de 100 μ l, fue la siguiente:

-Tampón de reacción x10 (Biotools) (75 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH ₄)SO ₄ , 2 mM MgCl ₂) pH 9	(10 μ l)
- dNTPs 25mM	(0,4 μ l)
- cebadores 10 uM:	
- KS (directo)	(2 μ l)
- SK (reverso)	(2 μ l)
-Taq ADN polimerasa (Biotools) 1U/ μ l	(2 μ l)
- H ₂ O	(83,6 μ l)

A la mezcla de reacción de PCR se le inoculó una colonia blanca, utilizando palillos estériles para cada colonia inoculada, y luego se procedió a la amplificación por PCR según las siguientes condiciones:

- lisis y desnaturalización de 5 minutos a 95°C
- 35 ciclos de 30 seg. a 95°C, 30 seg. a 55°C y 4 min. a 72°C seguidos por un paso de elongación final de 2 min. a 72°C.

Seguidamente se comprobó que el tamaño del producto de amplificación obtenido correspondía a la región clonada de la proteasa NS3 del VHC (1.438 pb), ó de la polimerasa NS5B (1.836 pb), mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% como se detalló en el apartado 3.4.1. Luego se purificaron sólo aquellos productos de PCR que correspondían al tamaño esperado de 1.509 y 1.907 pb para NS3 ó NS5B, respectivamente, mediante el método explicado anteriormente en el apartado 3.4.2.

3.10.3 *Secuenciación de clones moleculares*

Los productos de PCR purificados de colonias se secuenciaron utilizando secuenciación cíclica Sanger con terminadores fluorescentes con el kit comercial Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, EEUU), incluyendo los mismos cebadores específicos empleados para secuenciar las amplificaciones secundarias (Tabla VIII (a) y (b) apartado 3.7),

además de los cebadores SK y KS del plásmido (Tabla 9). Las condiciones de secuenciación fueron las mismas explicadas anteriormente en el apartado 3.7.

Reacción	Cebador (sentido)	Secuencia (5'-3')
Secuenciación (Plásmido)	-SK	CGCTCTAGAACTAGTGGATC
	-KS	TCGAGGTCGACGGTATCG

Tabla 9. *Secuencia de los cebadores SK y KS utilizados para la secuenciación de las PCR de colonia.*

3.10.4 *Detección de mutaciones minoritarias de resistencia a inhibidores de la proteasa NS3 y de de la polimerasa NS5B.*

Las secuencias obtenidas (cromatogramas) para cada clon fueron revisadas y ensambladas utilizando el paquete *Staden* (v2.0), como en el apartado 3.5.2. Las secuencias consenso de nucleótidos de NS3 ó de NS5B obtenidas en formato *fasta* de cada clon de cada paciente, fueron alineadas junto con la secuencia directa (consenso) del VHC del paciente, usando el programa BioEditv7.1.3 mediante ClustalW v1.4, como en el apartado 3.6.1. Las secuencias de aminoácidos se alinearon en busca de polimorfismos relacionados con mutaciones conocidas descritas en la literatura como causantes de resistencia a los nuevos antivirales inhibidores de la proteasa NS3 (IP), ó a los inhibidores análogos de nucleótidos (IAN) ó no nucleosídicos (INN) de la polimerasa NS5B. La frecuencia de mutaciones de resistencia dentro de la población de cada paciente se determinó utilizando el análisis posicional de frecuencias de aminoácidos del programa BioEditv7.1.3. Como secuencia de referencia se utilizó la del aislado Con1 del VHC genotipo 1b, extraída de la base de datos GenBank (código AJ238799) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

3.10.5 *Análisis de codones en clones moleculares de las regiones NS3 y NS5B*

Se analizaron los codones de las secuencias de los clones moleculares pertenecientes a los individuos seleccionados para cada una de las regiones NS3 (proteasa) y NS5B, mediante la metodología descrita en el apartado 3.9.3.

3.11 Análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismo

Para el análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismos de los aislados virales, se utilizó el *software* DnaSPv5 (Librado y Rozas 2009), que calcula diferentes estimadores de la variabilidad genética del VHC, según trabajos previos (Jiménez-Hernández 2005). Los estimadores calculados para los virus en cada paciente fueron

k: diferencia nucleotídica.

S: número de posiciones polimórficas o segregantes. Una posición polimórfica se define como aquella en que las diferentes secuencias del alineamiento presentan al menos dos nucleótidos diferentes.

θ : variación genética por nucleótido.

Eta: número total de mutaciones.

nHap: número de haplotipos presente en la muestra. Un haplotipo es una secuencia nucleotídica diferente al resto.

Hd: diversidad de haplotipos en la muestra.

π : diversidad nucleotídica corregida para múltiples sustituciones mediante el método *Jukes-Cantor*. La diversidad nucleotídica es la probabilidad de que al coger dos secuencias al azar difieran en una posición determinada.

Análisis de Neutralidad. Se realizaron también la prueba de Tajima (1989), la prueba Fu y Li (1993), y la prueba de Fu (1997), para contrastar la neutralidad (hipótesis neutra) a partir de un conjunto de secuencias. Bajo la teoría neutral de la evolución todas las mutaciones en una región de ADN son selectivamente neutras, y el mantenimiento del polimorfismo en las poblaciones se debe principalmente a la acción de la deriva genética y la fijación al azar de esas mutaciones neutras o ligeramente deletéreas.

Prueba de Tajima (1989): la cantidad esperada de variación genética por nucleótido es $\theta = 2Ne\mu$, donde Ne es el tamaño poblacional efectivo y μ la tasa de mutación. θ puede ser estimado a partir de dos parámetros π y S . En condiciones de neutralidad las estimas de S y π dan la misma estima de θ , y por tanto la diferencia entre π y S no es significativamente distinta de 0. La presencia de selección natural afecta a ambos parámetros de forma diferente,

ya que π evalúa la frecuencia de alelos mutantes mientras que S examina el número de sitios polimórficos, y obtendremos distintos valores de θ , por tal motivo Tajima (1989) propone la diferencia (D) entre las estimas de θ dadas por π y S , prueba que servirá para detectar desviaciones de neutralidad de las mutaciones ($D=0$ bajo neutralidad). Si nos fijamos en el espectro de frecuencias de polimorfismos (la frecuencia de alelos en cada sitio polimórfico) podemos obtener más información de D , concretamente los cambios debidos a la selección. El número de mutantes deletéreos se mantiene en la población a bajas frecuencias (por acción de la selección purificadora). Debido a que S ignora la frecuencia de mutantes, este parámetro está fuertemente afectado por la existencia de mutaciones deletéreas. No ocurre lo mismo para el parámetro π que sí considera la frecuencia de mutantes. Por tanto, si la población presenta mutaciones deletéreas, la estima de θ basada en S , será mayor que la basada en π , y la diferencia entre ambos parámetros será significativamente menor que 0. Fenómenos como el arrastre selectivo ó la selección de fondo, conducen a un exceso de polimorfismos que segregan a bajas frecuencias, lo que disminuyen el valor de π con respecto al de S , obteniendo también valores de D significativamente menores que 0. No obstante, en el caso de selección estabilizadora los mutantes se mantienen en la población a frecuencias intermedias, aumentando en este caso el valor de π y dando lugar a valores D significativamente mayores que 0.

Por otra parte el cambio en el tamaño de la población también afecta a ambos parámetros. Cuando el tamaño poblacional decrece, π disminuye más rápidamente que S ($D < 0$). Por el contrario cuando el tamaño poblacional aumenta, π aumenta más rápidamente que S ($D > 0$).

Con el modelo de Tajima podemos determinar ciertas tendencias en la población, aunque sea una forma muy general de calcular cualquier desviación del modelo neutral, entonces cuando D tiende a ser significativamente menor que 0, ó bien indica que la selección purificadora, arrastre selectivo ó selección de fondo están actuando, ó bien indica que se ha producido un aumento en el tamaño de la población. Por el contrario si D es significativamente mayor que 0, indica que ó bien está actuando la selección estabilizadora ó que el tamaño de la población ha disminuido.

Prueba de Fu y Li (1993): Estas pruebas hacen estimas de θ a partir del número de mutaciones en las ramas internas y externas de una genealogía utilizando una estructura muy similar a la prueba de Tajima. El número de mutaciones de las ramas externas se estima a partir de los polimorfismos únicos.

El cálculo de θ está basado en el número de mutaciones que aparecen una sola vez entre las secuencias ó polimorfismos de frecuencia única: estadístico D^* , ó entre el número de mutaciones que aparecen una sola vez: estadístico F^* .

Al igual que la prueba de Tajima valores iguales a 0 indican neutralidad, valores significativamente menores que 0 indican selección direccional (exceso de polimorfismos de frecuencia única) ó aumento del tamaño poblacional, valores significativamente mayores que 0 indican la presencia de selección estabilizadora (exceso de polimorfismos a frecuencias intermedias) ó una disminución del tamaño de la población.

La prueba de Fu (1997): evalúa la probabilidad de tener k alelos en una muestra de n secuencias dado θ . F_s tiende a ser negativo cuando se da arrastre selectivo (proceso mediante el cual una posición se encuentra ligada a otra que ha sido fijada por selección en la población) ó crecimiento poblacional. Según Fu la prueba de la F_s es muy potente, detectando crecimiento poblacional y arrastre selectivo, mientras que D^* y F^* lo son detectando selección de fondo.

Análisis de selección. Además, se ha calculado la razón entre la tasa de sustitución no sinónima/tasa de sustitución sinónima: dN/dS , donde dS o Ks o α : número de sustituciones sinónimas por posición sinónima, y dN o Ka o β : número de sustituciones no sinónimas por posición no sinónima. Hablamos de sustitución sinónima cuando el cambio de un nt por otro no comporta cambio aa, debido a la degeneración del código genético. Hablamos de sustitución no sinónima cuando el cambio de nt implica que el codón codifique para otro aa. Esta relación puede indicar el grado de selección natural. Así, $dN/dS > 1$ indica selección positiva mientras que valores menores a 1 indican presión de selección negativa ó purificadora. Se llevaron a cabo estos cálculos según descritos en Jiménez-Hernández (2005) mediante un método de distancia (Nei-Gojobori) utilizando la corrección de Jukes Cantor (Nei y Kumar 2000). Las distancias genéticas (diversidad) fue calculada con el modelo de dos

parámetros de Kimura, modificado con distribución gamma (Kimura 1983). La frecuencia de sustituciones y la distancia genética media fue calculada a nivel nucleotídico, utilizando el programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.* 2011).

Análisis de la varianza molecular. También se estudió la estructura genética de las poblaciones virales por medio del análisis de la varianza molecular (AMOVA) implementado en el *software Arlequin V3.5* (Schneider *et al.* 2000), para describir la partición de la variación genética entre y dentro de los aislados de distintos grupos de pacientes, así como la estimación de la distancia entre haplotipos y sus frecuencias (Excoffier *et al.* 1992).

El *software Arlequin V3.5* (Schneider *et al.* 2000), es un paquete de programas para genética de poblaciones. Calcula los índices estándar de diversidad genética y varias medidas de distancia. El enfoque de AMOVA utilizado en *Arlequin V3.5* está esencialmente basado en el análisis de varianza de las frecuencias génicas, y para ciertos tipos de datos también puede tener en cuenta el número de mutaciones entre los haplotipos moleculares (Schneider *et al.* 2000, Excoffier *et al.* 1992). Para los datos de haplotipos, *Arlequin* estima Φ utilizando información tanto el contenido y la frecuencia alélica de los haplotipos (Excoffier *et al.* 1992), y para los datos genotípicos, AMOVA realiza estimas de los componentes de la varianza y se basa en *phi-statistics (F)* (Excoffier *et al.* 1992; Excoffier 2001). La importancia de los componentes de covarianza asociada con los diferentes niveles posibles de estructura genética (entre los individuos, entre las poblaciones, entre los grupos) se prueba utilizando procedimientos de permutación no paramétricas (Excoffier *et al.* 1992).

3.11.1 Heterogeneidad genética entre aislados (*inter- individuo*).

El cálculo de estos parámetros (detallado en el apartado 3.11) se realizó a partir del alineamiento múltiple con las secuencias nucleotídicas obtenidas de los 60 aislados diferentes, y para cada una de las regiones NS3 (proteasa) y NS5B por separado.

Se realizó AMOVA utilizando todas las secuencias de los pacientes a la vez, pero estableciendo dos tipos de estructura genética para ser contrastadas, mediante la asignación de diferentes grupos y estableciendo dos niveles de

jerarquía: dentro de pacientes y entre pacientes, primero tomando como población a los pacientes inmunocompetentes y pacientes inmunodeprimidos por trasplante hepático, y luego pacientes de Valencia y pacientes de Badalona. El análisis se realizó para ambas regiones estudiadas en esta tesis doctoral.

3.11.2 Heterogeneidad genética de la “cuasiespecie” (intra- individuo)

El cálculo de estos parámetros intrapoblacionales (detallado en el apartado 3.11) se realizó a partir del alineamiento múltiple con las secuencias nucleotídicas obtenidas de los clones moleculares pertenecientes a los individuos seleccionados, y para cada individuo por separado, con las secuencias nucleotídicas de los diferentes clones secuenciados para cada una de las dos regiones analizadas NS3 (proteasa) y NS5B. Además se midió la complejidad de la “cuasiespecie” en las regiones estudiadas (proteasa NS3 y NS5B) mediante el cálculo de la Entropía de Shannon (S) y la entropía de Shannon normalizada (S_n) a nivel nucleotídico (Shannon y Weaver 1949). Este parámetro indica la cantidad de variantes virales identificadas en una muestra y toma valores en un rango entre 0 (cuando todas las secuencias son iguales) y 1 (cuando todas las secuencias son diferentes entre sí). Según la fórmula: $S = -\sum_i [(p_i \times \ln p_i)]$ y $S_n = S / \ln N$ 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 (Wolinsky *et al.* 1996).

Se realizó el análisis de AMOVA, a nivel intrapoblacional, utilizando todas las secuencias de los clones moleculares pertenecientes a los individuos seleccionados a la vez, y estableciendo dos niveles de jerarquía dentro de paciente y entre paciente (pacientes inmunocompetentes y pacientes inmunodeprimidos por trasplante hepático). Estos análisis fueron llevados a cabo tanto para la región NS3 (proteasa) como para la región NS5B por separado. La búsqueda de haplotipos compartidos fue llevada a cabo con el mismo programa, mediante el cálculo de distancias emparejadas. Se realizó la búsqueda entre todos los individuos de un mismo grupo, y entre todos los individuos de ambos grupos (pacientes inmunocompetentes vs. pacientes inmunodeprimidos por trasplante hepático y pacientes de Valencia vs. pacientes de Badalona).

3.12 *Análisis de selección posición a posición*

3.12.1 *Entre individuos*

Para identificar posiciones aminoacídicas individuales sujetas a selección positiva ó negativa en las regiones NS3 (proteasa) y NS5B del VHC, se empleó la aproximación FEL (*Fixed Effects Likelihood*) implementada en el servidor *Datamonkey* (Delport *et al.* 2010a; 2010b, Kosakovsky y Frost 2005). Este método analiza los codones bajo selección positiva ó negativa a lo largo de las ramas de la filogenia, estimando la relación dN/dS (también conocido como Ka/Ks o ω) para cada codón. Se utilizó el modelo de sustitución *General Time Reversible Model* (REV) para sitios seleccionados positiva y negativamente con nivel de significación ($p = 0,1$), basado en el árbol obtenido por *Neighbor Joining*. Se consideró que un codón se encontraba bajo selección significativa cuando $p \leq 0,1$.

3.12.2 *Intra individuos*

Por otro lado, para identificar sitios individuales con evidencia de diversificación de selección episódica en la región NS3 (proteasa) y NS5B del VHC en las secuencias de clones de cada paciente incluidos en este estudio, se empleó el modelo evolutivo de efectos mixtos “MEME” (*Mixed Effects Model of Evolution*) implementado en el servidor *Datamonkey* (Delport *et al.* 2010a; 2010b, Kosakovsky y Frost 2005). Este método también analiza los sitios bajo selección a lo largo de las ramas de la filogenia, pero además MEME es capaz de identificar los casos de selección positiva tanto episódica como generalizada a nivel de un sitio individual (Murrell *et al.* 2012). La selección positiva puede ser inferida siempre que la relación estimada dN/dS entre las tasas de sustitución no sinónimas dN (también conocida como Ka o β) y sinónimas dS (también conocida como Ks o α) supere significativamente uno (Delport *et al.* 2009, Anisimova y Kosiol 2009).

El resultado proporcionado por servidor *Datamonkey* consta de una tabla con las tasas de sustitución sinónimas (α) y no sinónimas (β) en cada posición de un grupo de secuencias alineadas. Para el análisis se utilizó el modelo de sustitución *General Reversible Model* (REV), sitios bajo diversificación de selección episódica con nivel de significación ($p = 0,1$), basado en *Neighbor Joining Tree*, y se consideró que un codón ó sitio se encontraba bajo selección episódica significativa, cuando $p \leq 0,1$.

3.13 Análisis filogenético

Las secuencias consenso de nucleótidos en formato *fasta*, fueron alineadas con secuencias de referencia representativas de todos los genotipos/subtipos confirmados hasta el momento (Smith *et al.* 2013) con el interfaz SSEv1.1 (Simmonds 2012), usando *Muscle* v3.8.31 (Edgar 2004) y refinando el alineamiento manualmente. El interfaz SSEv1.1 (editor de secuencias simples) posee una serie de programas bioinformáticos integrados, donde las secuencias pueden ser alineadas, anotadas, clasificadas en grupos y analizadas directamente. SSEv1.1 tiene un editor de secuencias para la creación de alineamientos de secuencias, mediante un proceso asistido por la integración de los programas *Clustal* y *Muscle* y la eliminación automatizada de indels. Los resultados se pueden dirigir a los archivos de datos tabulados para su exportación a la hoja de cálculo ó programas de base de datos para su posterior análisis. Las secuencias de referencia representativas de todos los genotipos/subtipos confirmados hasta el momento (Smith *et al.* 2013) fueron proporcionadas amablemente por el Doctor Peter Simmonds, The Roslin Institute, University of Edinburgh, Reino Unido, y se detallan en Anexo VIII.

3.13.1 Filogenia inter individuo

Como las secuencias de referencia corresponden a genomas completos y las secuencias de las amplificaciones obtenidas en esta tesis son más cortas, las secuencias de referencia se recortan de manera que todas (referencia y aislados estudiados) sean de la misma longitud de nucleótidos en el alineamiento, tanto para la región NS3 como para la región NS5B.

Se generaron ficheros de alineamiento de las secuencias obtenidas de las regiones NS3 y NS5B, de los 60 pacientes incluidos en esta tesis, junto a las secuencias de referencia, y éstos se convirtieron mediante *PhyIemon 2.0* (Sanchez *et al.* 2011) (<http://phylemon.bioinfo.cipf.es>) de formato *fasta* a formato PHYLIP. La construcción de árboles filogenéticos se realiza por inferencia estadística, para ello se requiere de un modelo de evolución molecular de secuencias con el fin de compensar ó corregir las sustituciones no observadas en las secuencias de estudio pero que pueden haber tenido lugar a lo largo de la filogenia, es decir requiere de un modelo de sustitución de residuos (nt ó aa). Los modelos de sustitución nucleotídica, ó modelos

evolutivos, describen la tasa de cambio de un nt a otro y dado que influye sobre los resultados del análisis filogenético, se debe usar el modelo adecuado. Para inferir un árbol filogenético, hay que buscar el modelo de sustitución que mejor se ajuste a nuestros alineamientos de secuencias de estudio. Para ello utilizamos el *software* jModeltest mediante *PhyIemon 2.0* (Sanchez *et al.* 2011) (<http://phyIemon.bioinfo.cipf.es>), que evalúa el ajuste de los datos a los diferentes modelos mediante pruebas estadísticas, eligiendo el modelo que maximice la verosimilitud. Para la inferencia filogenética también se utilizó el criterio de máxima verosimilitud, basado en el uso de un valor determinado (*log-likelihood*) que evalúa topologías alternativas del árbol filogenético con el fin de encontrar aquella que maximiza este valor. Este método se define por matrices de sustitución que contienen las tasas relativas de ocurrencia de todos los tipos posibles de sustituciones, y nos permite la inferencia de árboles filogenéticos usando modelos evolutivos complejos, estimando los valores de los parámetros del modelo que den el valor más alto de probabilidad. Existen diversos modelos evolutivos que se distinguen por su grado de parametrización, y pueden incluir tres tipos principales de parámetros: 1) parámetros de frecuencia, 2) parámetros de tasa de sustitución, y 3) parámetros de las tasas de variación entre posiciones. El modelo evolutivo utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos en este estudio fue el de los parámetros de las tasas de variación entre posiciones, ya que estos incrementan el ajuste entre los modelos y datos, empleando en conjunción los de frecuencia y tasa. Utiliza la distribución gamma (G) para modelar la heterogeneidad de las tasas de sustitución entre diferentes posiciones de un alineamiento, y el parámetro alfa (α) que controla la forma de la distribución gamma.

Elegido el modelo GTR (*general time reversible*) de sustitución de nucleótidos, una aproximación de la tasa de heterogeneidad de la distribución gamma (+G) bajo el criterio de máxima verosimilitud, y soporte de *bootstrap* por rama de 1.000 réplicas se procedió a reconstruir el árbol filogenético mediante el *software* RAxMLv7.2.6 (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) (Stamatakis 2006, Stamatakis *et al.* 2008), que es un programa para la inferencia secuencial y paralela bajo el criterio de máxima verosimilitud (Felsenstein 1981) sobre la base de grandes árboles filogenéticos, con un coste computacional aceptable. Posteriormente los árboles fueron editados con el

software MEGA5.2 (Tamura *et al.* 2011) utilizando la herramienta *Tree Explorer*, y con el software FigTreev1.4.0 (2006-2012, Andrew Rambaut, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh <http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

3.13.2 *Filogenia intra individuo*

Las secuencias consenso de nucleótidos en formato *fasta*, de la región NS3 y NS5B de los clones moleculares de los 10 pacientes seleccionados para este subanálisis fueron alineadas con secuencias de referencia representativas de todos los genotipos/subtipos confirmados hasta el momento con el interfaz SSEv1 (Simmonds 2012), usando *Muscle*v3.8.31 (Edgar 2004) como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.12.

Tras la conversión de los alineamientos en formato *fasta* a formato PHYLIP mediante *PhyIemon 2.0* (Sanchez *et al.* 2011) (<http://phylemon.bioinfo.cipf.es>), se generaron árboles filogenéticos de la región NS3 y NS5B bajo el criterio de máxima verosimilitud con el programa RAxMLv7.2.6 (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) (Stamatakis 2006, Stamatakis *et al.* 2008) con el modelo GTR (*General Time-Reversible*) de sustitución de nucleótidos, una aproximación de la tasa de heterogeneidad de la distribución gamma y el soporte de *bootstrap* por rama de 1.000 réplicas. Los árboles fueron editados como se describió en el apartado 3.12.

3.14 *Análisis de coevolución intramolecular e intermolecular*

Las mutaciones de resistencia que se detectan en una proteína pueden ir acompañadas de otras mutaciones compensatorias, por tal motivo es importante analizar si en la proteasa NS3 y la polimerasa NS5B se observa mutaciones o polimorfismos compensatorios que podrían contribuir a la resistencia a AAD. También es importante evaluar la posible existencia de una correlación entre mutaciones observadas en una proteína (proteasa NS3) y otra (polimerasa NS5B) en una secuencia determinada, es decir, si una mutación de resistencia en una proteína siempre va acompañada de otra mutación en la otra proteína, de cara a valorar futuros tratamientos combinados.

Para el análisis de coevolución intramolecular entre los sitios de aminoácidos que pertenecen a la misma proteína (en este caso por un lado la

proteína NS3 y por otro lado la proteína NS5B) y para el análisis de ambas proteínas como que interactúan funcionalmente ó físicamente (coevolución intermolecular) se ha utilizado el software CAPS versión 1 (Farés y Travers 2006). CAPS compara la variación correlacionada de las tasas de evolución en dos sitios corregidas por el tiempo transcurrido desde la divergencia de la secuencia de la proteína a la que pertenece. Las sustituciones ó conservación en dos sitios independientes no pueden compararse directamente, debido a su diferencia de composición de aminoácidos. Sin embargo, CAPS compara las probabilidades de transición entre dos secuencias en estos sitios en particular, mediante el uso de bloques de matrices de sustitución (BLOSUM; Henikoff y Henikoff 1992). Para cada alineamiento de proteínas se aplica la correspondiente matriz BLOSUM en función del promedio de identidad de secuencia. CAPS incluye además la detección de correlación en la evolución de las características moleculares y la hidrofobicidad de dos sitios de aminoácidos en alineamientos de secuencias múltiples y realiza un análisis preliminar de mutaciones compensatorias. Debido a que el programa CAPS tiene los algoritmos en el lenguaje Perl, se ejecutó con el sistema operativo Windows y con el intérprete Active Perl v5.16.3 (Wall *et al.* 2013).

Para la visualización gráfica de las posiciones que se encuentran en estado de coevolución, existe un paquete de programas que permite este análisis, teniendo en cuenta la estructura tridimensional de la proteína en el análisis de coevolución. Esta información puede ser muy valiosa (especialmente cuando se está intentando diferenciar coevolución funcional, estructural e interacción) y es útil para determinar si dos sitios que coevolucionan son significativamente cercanos (indica coevolución estructural y, probablemente, funcional) ó distantes (indica coevolución funcional) en las estructuras tridimensionales. El paquete está compuesto por dos programas: 1) el programa *Coevolution*, que muestra un conjunto de átomos que están en coevolución, mostrando aquellos que pertenecen a un mismo grupo de coevolución, y las interdependencias entre los átomos de los diferentes grupos; y 2) el programa *Structure*, que muestra una representación tridimensional de la proteína, identificando sobre ella aquellos átomos que se encuentran en coevolución, y la agrupación de los mismos. Estos dos programas están escritos enteramente en C++ estándar, y utilizan la librería OpenSceneGraph

para la representación gráfica (www.openscenegraph.org), que permite una visión tridimensional de proteínas, átomos y enlaces. Además, se utiliza la librería libpdb++ (UCSF Computer Graphics Laboratory - PDB++ Library www.ccl.net/cca/software/SOURCES/Cpp/PDB++) para interpretar los ficheros de entrada de tipo *Protein Data Bank* (PDB). Ambos programas fueron ejecutados en el sistema operativo Windows.

El análisis de coevolución intra e inter molecular, se realizó con las secuencias consenso obtenidas de la proteasa NS3 y polimerasa NS5B del VHC, de los pacientes incluidos en este estudio. Para representar la estructura tridimensional de la proteasa NS3 se utilizó la del aislado BK del VHC genotipo 1b (código PDB 1CU1), y para la polimerasa NS5B se utilizó la del aislado Con1 del VHC genotipo 1b (código PDB 3FQL) extraídos de la base de datos *Protein Data Bank* (www.ebi.ac.uk/pdbsum), las mismas estructuras utilizadas en los apartados 3.9.1.1 y 3.9.2.1 anteriores.

3.15 Estadística

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa *InfoStat* para Windows versión 2008 (Di Rienzo *et al.* 2008). Se utilizó la prueba de Chi-Cuadrado para comparar las variables categóricas de muestras independientes. De acuerdo al tamaño de muestra se aplicó el estadístico Chi cuadrado de Pearson, en tablas 2x2, cuando todos los valores esperados bajo la hipótesis de independencia eran mayores o iguales a 5, y se aplicó la prueba de Fisher cuando los valores eran < 5 . Un valor de $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo. También se realizó la prueba no paramétrica U Mann-Whitney para las variables continuas de muestras independientes. Un valor de p de 2 colas menor a 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 *Muestras clínicas*

Se remitieron al laboratorio de Genómica y Salud – FISABIO-Salud Pública un total de 84 muestras de suero de pacientes infectados con VHC del Hospital Universitario La Fe de Valencia, así como 41 muestras de ARN total extraído de suero y 16 cromatogramas (tanto de la región de la proteasa NS3 como NS5B del VHC) de pacientes infectados del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona (HUGTIP). Para este estudio se seleccionaron en primer lugar aquellas correspondientes a la infección por subtipo 1b ya que en España es el más frecuente en enfermedad hepática avanzada (López Labrador *et al.* 1997) y previsiblemente los pacientes infectados por este subtipo serán los primeros candidatos a tratamiento urgente.

El registro de muestras se realizó mediante la asignación de un código conformado por números. En todos los casos se obtuvo la firma del consentimiento de cada paciente y se mantuvo la confidencialidad de toda la información recogida (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre la Protección de datos de Carácter Personal y la ley 41/2002 de 14 de noviembre, ley básica reguladora de la autonomía del paciente y derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica), como así también de los resultados de laboratorio obtenidos de acuerdo a las recomendaciones internacionales y la legislación vigente.

El uso de muestras humanas se llevó a cabo conforme a las normas sobre experimentación humana, del código de Nuremberg (1947), declaraciones de Helsinki (1964), Sidney (1968), Tokio (1975), Venecia (1983), Hong-Kong (1989) y complementarias, directiva 91/507/CE, R.D. 561/1993, convenio de Bioética del Consejo de Europa (BOE 20/10/99) R.D. 1716/2011, de biobancos y tratamiento de las muestras biológicas de origen humano; y Código de ética y Deontología Médica vigente. El estudio fue aprobado por los Comités de Ética y de Investigación correspondientes (Hospital La Fe y Hospital Trias i Pujol). En ningún caso se registró ó almacenó información para este estudio que contuviera los nombres ó datos personales de los pacientes y se siguieron estrictamente las pautas éticas internacionales recomendadas para estudios epidemiológicos.

4.2 Extracción de ARN viral y síntesis de cADN

Se realizaron un total de 84 extracciones de ARN total (sueros del Hospital Universitario La Fe de Valencia) y posteriormente junto con los 41 ARN enviados del HUGTIP se realizaron un total de 125 retrotranscripciones (RT), para obtener ADNc de cada muestra, tal y como se describió anteriormente en el apartado 3.2.

4.3 Amplificación del gen de la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B del VHC

Se logró amplificar la región NS3 completa del nucleótido 3.312 al 5.338 (2.026 pb), en 42 muestras (33 del Hospital Universitario La Fe de Valencia y 9 del HUGTIP) y del nucleótido 3.312 al 4.750 (1.438 pb incluyendo la proteasa NS3) en 17 muestras (5 del Hospital Universitario La Fe de Valencia y 12 del HUGTIP), como así también la región NS5B del nucleótido 7.539 al 9.375 (1.836 pb) en 57 muestras (44 del Hospital Universitario La Fe de Valencia y 13 del HUGTIP), mediante el método explicado anteriormente en el apartado 3.3 y 3.4. La numeración se indica según el genoma de referencia Con1.

Tras cada PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, comprobando la correcta amplificación de los fragmentos de interés (Figura 34 (a), (b), (c), (d), (e) y (f)).

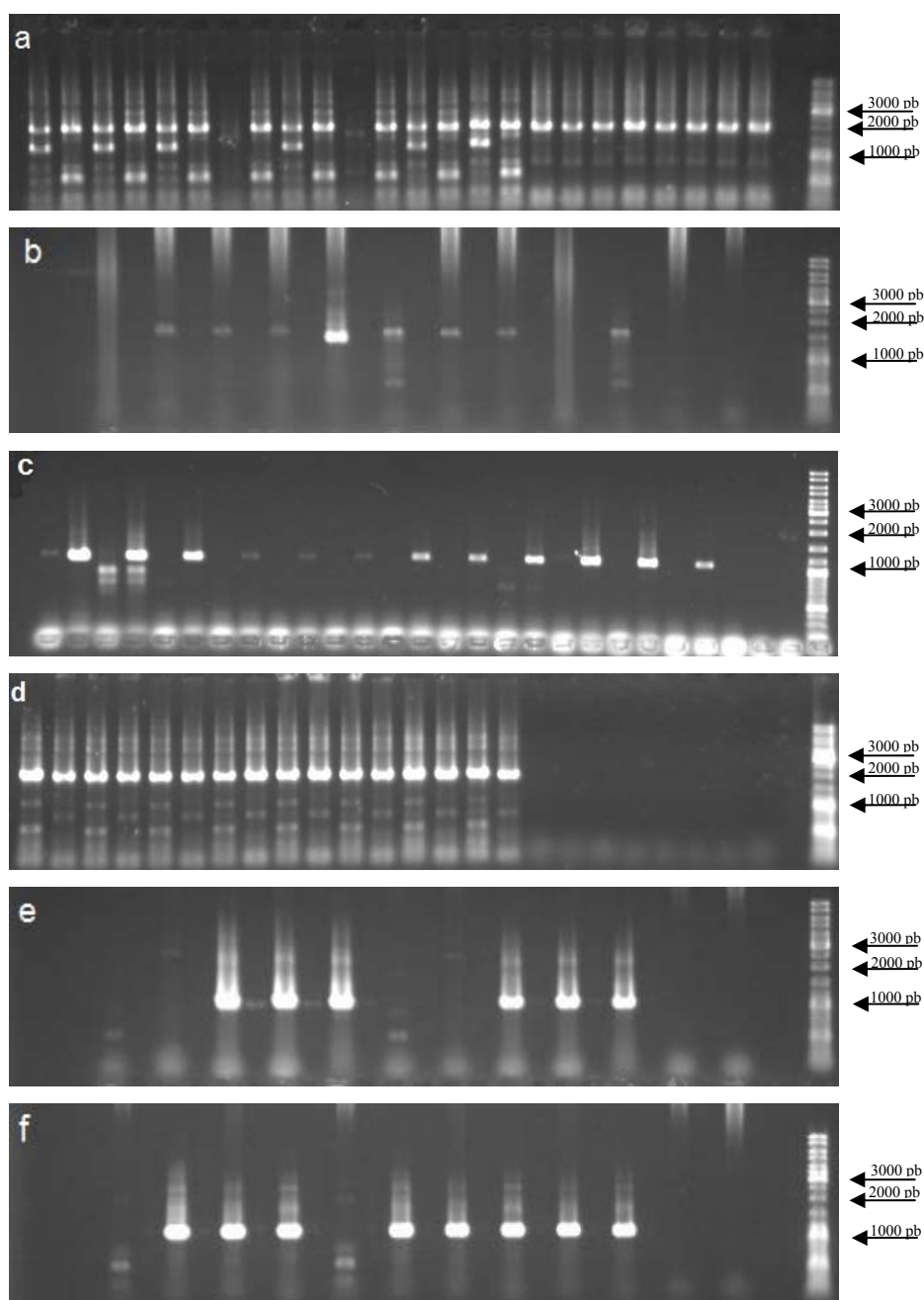


Figura 34. *Gel de electroforesis (agarosa 0,8% y tinción con GelRed 0,3%). (a) Las bandas corresponden a la amplificación anidada de la región NS3 de 2026 pb, (b) región NS3 porción 5' de 1438 pb, (c) región NS3 porción 3' de 1123 pb, (d) las bandas correspondientes a la región NS5B de 1836 pb, (e) región NS5B porción 5' de 1074 pb y (f) región NS5B porción 3' de 1119 pb. En el extremo derecho el marcador de peso molecular (ADN LadderMix Fermentas). Marcado con flechas tenemos los fragmentos del marcador de peso molecular que nos sirven de referencia para distinguir el tamaño de nuestro gen amplificado.*

4.4 Amplificación de NS3 y NS5B en la misma muestra.

A la fecha de escritura de esta tesis se consiguió amplificar tanto la región de la proteasa NS3 como la polimerasa NS5B del VHC en 60 muestras, que fueron seleccionadas para este trabajo. En el resto de las muestras no se pudieron amplificar algunos de los amplicones, debido fundamentalmente a: (i) bajos niveles de carga viral en algunas muestras; (ii) falta de amplificación de alguno de los fragmentos, posiblemente por variación de la diana de los cebadores; y (iii) falta de volumen de muestra suficiente.

De acuerdo a los datos aportados por el Hospital La Fe de la ciudad de Valencia sobre los pacientes que se incluyeron en esta tesis doctoral 13 eran inmunocompetentes y 21 inmunodeprimidos (trasplantados hepáticos). En el caso del del Hospital de Badalona (HUGTIP) fueron incluidos en esta tesis un total de 26 pacientes inmunocompetentes. Se definieron tres grupos de pacientes según se indica: inmunocompetentes Valencia (ICV); inmunodeprimidos Valencia (IDV); e inmunocompetentes Badalona (ICB). También se realizaron comparaciones agrupando inmunocompetentes e inmunodeprimidos de Valencia (ICV+IDV) y todos los inmunocompetentes (ICV+ICB).

Las principales características de los grupos de pacientes se muestran en la tabla 10. No se hallaron diferencias significativas entre los distintos grupos de pacientes en cuanto al sexo, valores de ALT y carga viral, ó porcentaje de pacientes con fibrosis leve-moderada vs. grave ($p > 0,05$). En los pacientes del Hospital La Fe, los pacientes ICV eran significativamente más jóvenes ($p < 0,017$), y con valores menores de AST ($p < 0,046$) que los IDV. Entre los pacientes inmunocompetentes, los del Hospital La Fe (ICV) mostraron valores menores de AST ($p < 0,020$) que los del HUGTIP (ICB).

Los pacientes del grupo IDV eran significativamente de mayor edad que los del grupo ICB del HUGTIP ($p < 0,002$) y que todos los inmunocompetentes (ICV+ICB) ($p < 0,001$), como corresponde a su condición de trasplantados hepáticos tras una evolución más prolongada de la enfermedad. Finalmente, al comparar el conjunto de pacientes del Hospital La Fe (ICV+IDV) con los del HUGTIP (ICB), estos últimos seguían siendo significativamente más jóvenes ($p < 0,019$).

	Hospital La Fe			HUGTIP		Total pacientes	P (ICV vs IDV)	P (ICV vs ICB)	P (IDV vs ICB)	P (IC vs IDV)	P (HLF vs HUGTIP)
	ICV	IDV	ICV+IDV	ICB	Todos IC (ICV+ICB)						
	N=13	N=21	N=34	N=26	N=39	N=60					
Edad (Mediana; min-máx)	50,07 (26,44-64,01)	59,2 (34,79-73,29)	56,18 (26,44-73,29)	47,21 (20,77-63,51)	48,59 (20,77-64,01)	51,23 (20,77-73,29)	0,017	0,676	0,002	0,001	0,019
Sexo (n, % hombres)	7 (53,85%)	14 (60,67%)	21 (61,76%)	15 (57,69%)	22 (56,41%)	36 (60%)	0,455	0,819	0,529	0,439	0,749
ALT (Mediana UI/mL; min-máx)	62 (16-158)	62 (29-306)	62 (16-306)	93 (19-441)	70 (16-441)	68 (16-441)	0,703	0,162	0,424	0,667	0,2
AST (Mediana UI/mL; min-máx)	42 (23-96)	74,5 (29-327)	52 (23-327)	66,5 (18-251)	54 (18-251)	56,5 (18-327)	0,046	0,020	0,784	0,305	0,304
Fibrosis F0-F2 (n, %)	6 (50%)	11 (55%)	17 (53,13%)	12 (60%)	18 (56,25%)	29 (55,77%)	0,784	0,581	0,749	0,929	0,627
F3-F4 (n, %)	6 (50%)	9 (45%)	15 (46,88%)	8 (40%)	14 (43,75%)	23 (44,23%)					
Viremia (Mediana log ₁₀ UI/mL; min-máx)	5,88 (4,6-6,92)	6,47 (4,48-7,08)	6,33 (4,48-7,08)	6,45 (5,01-7,22)	6,3 (4,6-7,22)	6,36 (4,48-7,22)	0,063	0,1731	0,425	0,176	0,936

Tabla 10. **Características principales de los 60 pacientes analizados.** ICV: inmunocompetentes Valencia; IDV: inmunodeprimidos Valencia; ICV +IDV; ICB: inmunocompetentes Badalona; y IC: todos los inmunocompetentes. HLF: Hospital La Fe de Valencia, HUGTIP: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona. En negrita se indican los contrastes con significación estadística. Para las variables continuas de muestras independientes (Edad, ALT, AST y Viremia) prueba no paramétrica U Mann-Whitney, y para las variables categóricas (Sexo y Fibrosis) prueba de Chi-Cuadrado de Pearson.

4.5 Análisis de secuencias de nucleótidos de la proteasa NS3 y la polimerasa NS5B del VHC.

Todos los productos amplificados fueron purificados mediante filtración en membrana con el kit *PCR clean-up NucleoFast 96 PCR* (Marcherey-Nagel, Alemania), tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.6.

Gracias a la estrategia de amplificación utilizada en este trabajo, mediante el método explicado anteriormente en el apartado 3.3 y 3.4, se obtuvo la secuencia completa bidireccional de ambas regiones, la proteasa NS3 y polimerasa NS5B en 60 muestras de pacientes infectados con VHC.

Las secuencias sentido y antisentido, obtenidas para cada porción génica fueron analizados con el paquete *Stadenv2.0*, como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.8. Con los cromatogramas editados se construyó una base de datos *Staden* (Gap4) para cada aislado, y región del virus obteniendo finalmente del ensamblaje un total de 120 secuencias consenso (60 para el gen NS3 y 60 para el gen NS5B del VHC). Para el ensamblaje se utilizó como secuencia de referencia el aislado HPCJCG del VHC genotipo 1b (D90208), extraída de la base de datos *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Las secuencias consenso de nucleótidos de la región NS3 en formato *fasta* de 60 aislados de pacientes fueron alineadas usando el programa *BioEditv7.1.3* (Hall 1999), a la secuencia de referencia prototipo para el subtipo 1b: el aislado Con1 (AJ238799) y se tradujeron las secuencias de nucleótidos (Figura 1 Anexo VIII) a aminoácidos del dominio proteasa (aa 1-180) en busca de polimorfismos relacionados con mutaciones de resistencia conocida para la proteasa NS3 (Figura 2 Anexo IX).

Para la polimerasa NS5B, se procedió de la misma manera. Las secuencias consenso de nucleótidos en formato *fasta* de 60 aislados de pacientes fueron alineadas usando el programa *BioEditv7.1.3* (Hall 1999), a la secuencia de referencia prototipo para el subtipo 1b: el aislado Con1 (AJ238799) y se tradujeron las secuencias de nucleótidos a aminoácidos (aa 1-591) en busca de polimorfismos relacionados con mutaciones de resistencia conocida para el gen NS5B (Figuras 3 y 4 Anexo X).

4.6 Determinación de la frecuencia de mutaciones de resistencia a nuevos antivirales

4.6.1 Mutaciones de resistencia a inhibidores de la proteasa NS3

En primer lugar se realizó una revisión bibliográfica sobre las sustituciones en la proteasa NS3 del VHC asociadas a resistencia a inhibidores de la proteasa (IP) *in vitro* e *in vivo*. Las sustituciones asociadas con resistencia a IP descritas en la literatura y consideradas en este trabajo se especifican en la tabla 11.

Mutación	Identificación	Referencia
C16S	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Yang 2008 no publicado
V36A/M/L/G/I/C	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Sheaffer 2004, Lin 2004, Sarrazin 2007, Tong 2008, Zhou 2008 Sarrazin 2007, Ralston 2007, Kieffer 2007, Tong 2008, Bartels 2008; 2013, Barbotte 2010, Kieffer 2012, Sullivan 2013
A39V	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Yang 2008 no publicado
Q41R/K/P/H	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Sheaffer 2004, Tong 2008, Liverton 2010 Vermehren 2012
F43S/C/Y/V/I/L	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Tong 2008, Liverton 2010 Vermehren 2012, Kwong 2011
T54A/S/V/G/C	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Sheaffer 2004, Zeuzem 2005, Tong 2006, Sarrazin 2007 Sarrazin 2007, Curry 2008, Tong 2008, Susser 2009, Gaudieri 2009, Bae 2010, Kwong 2011, Kieffer 2012, Bartels 2013
V55A/F/I/K/T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Susser 2008, Qiu 2009 Susser 2009, Vermehren 2012, Paolucci 2012, Bartels 2013
D79E	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Thibeault 2004 no publicado
Q80K/R/L/N/H/G	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lenz 2010 Bae 2010, Paolucci 2012, McPhee 2012, Bartels 2013
A87T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Susser 2009 Besse 2012, Susser 2012
Y105C	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	McPhee 2012 no publicado
R109K	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Yi 2006 Bartels 2008
R117H	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Susser 2009 Besse 2012, Susser 2012
S122G/A/R/N/T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Tong 2006, McPhee 2012 McPhee 2012, Tong 2014
R123T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lin 2004, Tong 2006 no publicado
S138T/D/P	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Seiwert 2006; 2007, Imhof 2011 Besse 2012

Tabla 11. Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a IP.

Mutación	Identificación	Referencia
R155G/K/T/M/I/L/ S/Q/P/N/W	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lu 2004, Lin 2004, Zhou 2007, Sarrazin 2007, Lagacé 2012 Sarrazin 2007; 2010, Kieffer 2007, Bartels 2008; 2013, Susser 2009, Colson 2008
A156F/N/S/T/V/G/ D	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Sheaffer 2004, Lu 2004, Lin 2004; 2005, Tong 2006, Sarrazin 2007, He 2008 Sarrazin 2007, Kieffer 2007, Hiraga 2011
V158I/M	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Qiu 2009, Flint 2009, Kieffer 2007 Kwo 2010, Bartels 2013
V163L	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Taremi 1998, Qiu 2009 no publicado
D168Q/A/Y/V/E/T/ N/P/I/H/G/F/S/K	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lin 2004, Sheaffer 2004, Lu 2004, Seiwert 2007, He 2008, Koev 2007, Lagacé 2012 Bae 2010, Zeuzem 2012, Vermehren 2012, Bartels 2013
V170A/T/G/L/M	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Zeuzem 2005, Tong 2006 Curry 2008, Bartels 2008; 2013 Susser 2009, Besse 2012
E173G	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	McPhee 2012 no publicado
S174F/P	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Imhof 2011 Besse 2012, Susser 2012
M175L	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Romano 2010 Paolucci 2012, Barnard 2013, Bartels 2013
E176G	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Krieger 2001, Abe 2007, Flint 2009 no publicado

Tabla 11 (continuación). *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a IP.*

Para obtener una localización espacial, se utilizó la estructura tridimensional de la proteasa NS3 del aislado prototipo BK del VHC genotipo 1b (PDB 1CU1). Mediante el programa PyMol v1.1 se representaron con esferas los residuos aminoacídicos relacionados en la literatura con resistencia a los IP (Figura 35). Como se puede observar, se han descrito mutaciones de resistencia tanto en el sitio activo, como en zonas distantes.

En segundo lugar se realizó un alineamiento con las secuencias de aa de la proteasa NS3 del VHC de los 60 aislados estudiados, con respecto a la secuencia de referencia del aislado Con1, subtipo 1b. En la figura 36 se muestra el alineamiento de la proteasa NS3 de los aislados respecto al aislado de referencia, sólo en aquellas posiciones de aminoácido asociadas a mutaciones de resistencia a IP.

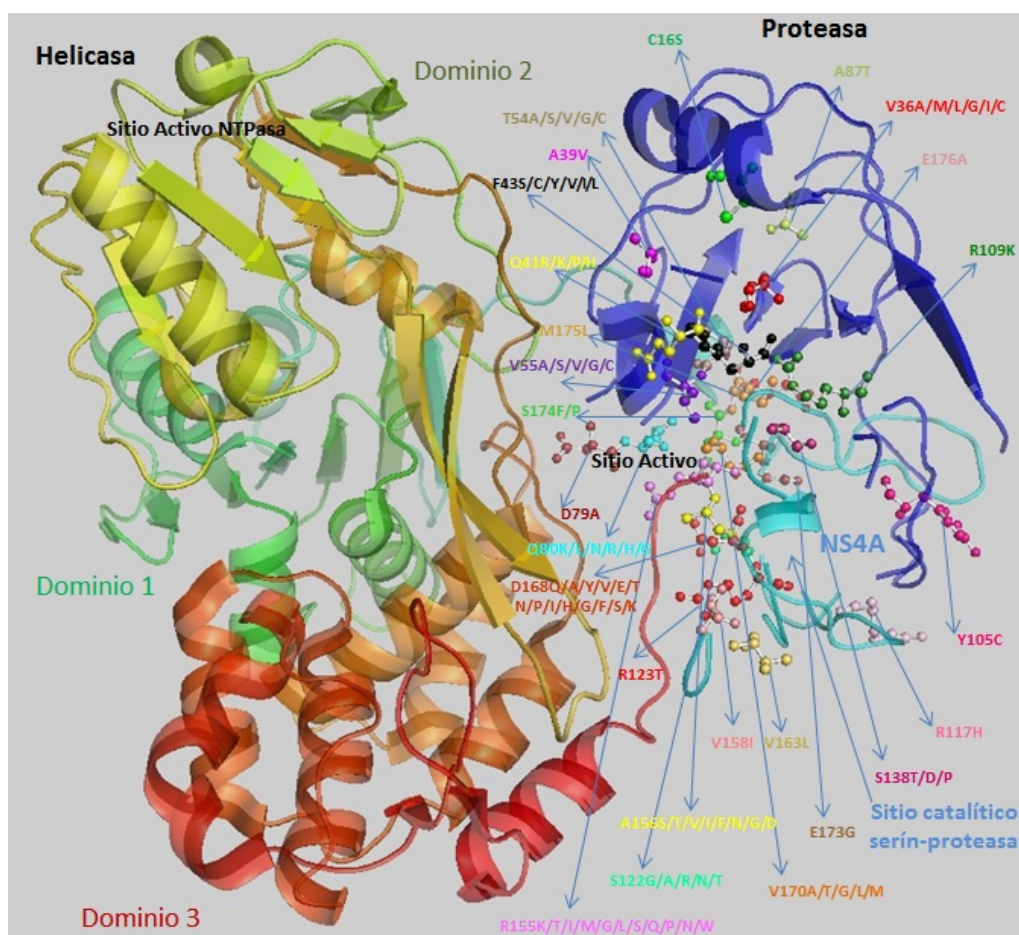


Figura 35. *Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a IP descritas en la literatura. Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.*

De todas las variaciones que confieren resistencia a IP, en los aislados del VHC-1b estudiados en este trabajo se encontraron con una frecuencia del 1,67% (1/60 de las secuencias analizadas) las variaciones: **V36L** asociada a resistencia a TPV, BOC y VPV; **V55A** asociada a resistencia a TPV, BOC, SOV, PHX1766; **A87T** y **R117H** asociadas a resistencia a TPV y BOC; **S122G** asociada a resistencia a SMV; y **V170T** asociada a resistencia a TPV, BOC, NLV, FDV, SMV y DNV. Además se encontraron las variaciones **S122T** y **S122N** con una frecuencia del 5% (3/60 de las secuencias analizadas) ambas asociadas a resistencia a SMV (Tabla 12).

Posición aa NS3 Mutaciones IP

	00000000001111111111111111
	13344557880012235556677777
	66913459075972385683803456
1b. Con1. GER	CVAQFTVDQAYRRRSRAVVDVESME
680_013V.....
974_028
341_032
308_056
433_059
429_066H.....
416_100F.....
665_101
856_105
502_106N.....
189_123
132_129A.....
255_156
213_173
146_178I.....
915_183
482_194	..S.....N.....
186_197T.....
090_198I.....
373_200
978_202
448_203T.....
443_205A.....
304_206I.....
859_207
575_210H.....I.....
865_211
200_213
767_214
259_219
610_220I.....
384_587
804_747I.....
345_801
775_1066I.....
507_1434I.....
478_1457C.....
894_1493
570_1526I.....
941_1530	..L.....
937_1740I.....
544_1852
905_2349
149_2395
20I.....
30I.....
33
41T.....I.....
45T.....I.C.....
54T.....I.....
55
59I.....
65
66
70I.....
71G.....I.....
72
162I.....
163S..N.....I.....
164I.....

Figura 36. *Presencia de variaciones asociadas a resistencia a IP en aislados del VHC de 60 pacientes.* La primera secuencia corresponde al aislado prototipo Con1 (VHC-1b). Los puntos indican identidad con el prototipo. Los colores empleados en la tabla se corresponden con la naturaleza del aminoácido y de la cadena lateral: rojo para aminoácidos polares con carga positiva; negro para polares con carga negativa; azul para aminoácidos con cadenas laterales polares pero sin carga; verde para los aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas y granate para cisteína, naranja para glicina y gris para prolina.

NS3 Posiciones aa	Fármaco*	Resistencias/ Aislamientos (%)	Observaciones
V36A/M/L/G/I/C	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /SMV ^{AP} /VPV ^I /D ^{II} /DNV ^{III} /ABT-450 ^{III} /ASV ^{III} / VDV ^{II} /NLV ^{II} /PHX1766 [†]	V36L 1/60 (1,67%)	
A39V	GS-9132 ^{NS4A}	NINGÚNA	A39S 1/60 (1,67%)
V55A/F/I/K/T	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /VPV ^{III} /D ^{II} /ABT-450 ^{III} /SOV ^{II} / PHX1766 [†]	V55A 1/60 (1,67%)	
D79E	TPV ^{AP} /BOC ^{AP}	NINGÚNA	D79H 1/60 (1,67%)
A87T	TPV ^{AP} /BOC ^{AP}	A87T 1/60 (1,67%)	A87S 1/60 (1,67%) A87V 1/60 (1,67%)
Y105C	ASV ^{III}	NINGÚNA	Y105F 1/60 (1,67%)
R117H	TPV ^{AP} /BOC ^{AP}	R117H 1/60 (1,67%)	R117C 1/60 (1,67%)
S122G/A/R/N/T	SMV ^{AP}	S122T 3/60 (5%) S122N 3/60 (5%) S122G 1/60 (1,67%)	
V170A/T/G/L/M	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /SMV ^{AP} /FDV [†] /D ^{III} /ASV ^{III} /NLV ^{II} /SCH5 67312 ^I /PHX1766 [†]	V170T 1/60 (1,67%)	V170I 21/60 (35%)
S174F/P	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /D ^{III}	NINGÚNA	S174C 1/60 (1,67%)
E176G	TPV ^{AP} /BOC ^{AP}	NINGÚNA	E176A 1/60 (1,67%)

* Sitio de unión a NS3: Sitio Activo; Sitio de unión: NS4A

† Fase de estudio detenido.

(I) Fase pre-clínico/Fase 1 de desarrollo clínico.

(II) Fase 2 de desarrollo clínico.

(III) Fase 3 de desarrollo clínico.

(AP) Aprobado.

(IP-Macrocíclicos (azul)

IP-Lineares (verde)

Tabla 12. *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a IP. Valor absoluto y porcentaje de posiciones detectadas en el análisis de cambio en la composición aminoacídica de los 60 aislados. Resaltando en rojo las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia a algún inhibidor. En observaciones y en negrita se indican variaciones (polimorfismos) que no se sabe si son responsables de alguna resistencia a algún inhibidor.*

Como puede observarse, se encontraron variaciones que confieren bajo nivel de resistencia a IP en un porcentaje relativamente bajo: 12/60 (20%) de los aislados. En ningún caso se detectaron variaciones que confieren altos niveles de resistencia (V36M T54S, R155K/T, A156S/V/T, D168A/V ó V170A). Sin embargo, se identificaron algunos polimorfismos con efecto desconocido, no relacionados con resistencias en la literatura. Los polimorfismos son los siguientes: A39S, D79H, A87S/V, Y105F, R117C, S174C y E176A. En la posición 170 la variación de una Valina por una Isoleucina fue muy frecuente: encontrada en un 35% (21/60) de las secuencias analizadas (Tabla 12). En ANEXO XI tabla 1 se detallan las posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a IP donde no se detectó variación en ninguno de los 60 aislados. La combinación de dos mutaciones de resistencia para el mismo inhibidor ó de clase diferente, puede tener un potencial amplio de resistencia tanto a IP (lineales y/o macrocíclicos) (Sarrazin *et al.* 2007a; 2007b). Con respecto a los aislados analizados en estas tesis no se encontró más de una mutación de resistencia a IP en cada aislado.

En la figura 37 se muestran con esferas en la estructura de la proteasa NS3 del aislado BK (VHC-1b) los residuos aminoacídicos asociados a mutaciones de resistencia a IP encontradas en los 60 aislados analizados en este trabajo. Como puede observarse, de todos los cambios encontrados asociados a resistencias a IP **V55A**, **R117H**, **S122/T/N/G**, y **V170T** se encuentran cercanos al sitio activo/catalítico serín-proteasa, mientras que **V36L** y **A87T** se encuentran lejanas al sitio activo. Los cambios encontrados en las posiciones cercanas al sitio activo podrían afectar la unión ó contacto del IP, mientras que los cambios en posiciones lejanas al sitio activo un mecanismo indirecto que afectaría la interacción del IP con su diana. Con respecto a los polimorfismos encontrados: **D79H**, **Y105F**, **R117C**, **S174C** y **E176A** se encuentran cercanos al sitio activo/catalítico serín-proteasa, mientras que **A39S** y **A87S/V** están lejanos. Los polimorfismos encontrados cercanos al sitio activo podrían también afectar la unión de los IP.

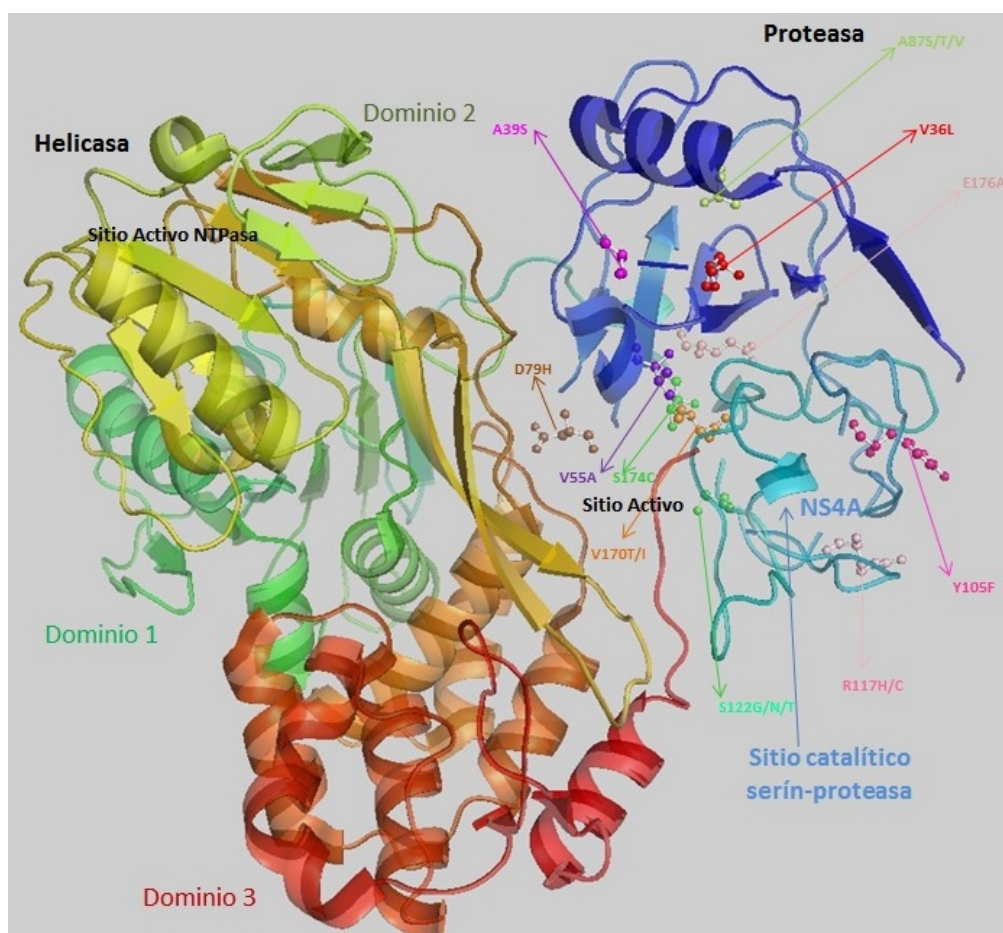


Figura 37. Posición en la proteína NS3 del VHC de los aminoácidos relacionados con resistencia a IP encontrados en los 60 aislados amplificados en este trabajo. Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.

4.6.2 Mutaciones de resistencia a inhibidores de la polimerasa NS5B

En primer lugar se realizó una revisión bibliográfica sobre las sustituciones en la polimerasa NS5B del VHC asociadas a resistencia a IAN e INN *in vitro* e *in vivo*. Las sustituciones asociadas con resistencia a IAN consideradas en este trabajo y descritas en la literatura se especifican en la tabla 13.

Mutación	Identificación	Referencia
A15G	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lam 2011 no publicado
K72M	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Ali 2008 no publicado
S96T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Le Pogam 2006, Ali 2008, Lam 2011 no publicado
N142T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Le Pogam 2006, Ali 2008 no publicado
L159F	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Tong 2014 Paolucci 2013, Tong 2014, Gane 2014
R222Q	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lam 2011 no publicado
IAN C223H/Y	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lam 2011 no publicado
I239V/L	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Ali 2008 no publicado
S282T/R	<i>in vitro</i> <i>in vivo (gt1a)</i>	Migliaccio 2003, Le Pogam 2006, Lam 2012 Gane 2014, Tong 2014
L320F/I	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Ali 2008, Lam 2011, Tong 2014 Tong 2014, Gane 2014
V321I	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lam 2011 Paolucci 2013, Bartels 2013
A396G	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Ali 2008 no publicado
Y586C	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Ali 2008 no publicado

Tabla 13. *Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a IAN descritas en la literatura.*

Las sustituciones asociadas con resistencia a INN consideradas en este trabajo y descritas en la literatura se especifican en la tabla 14.

Mutación	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Referencia
T19S/P	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Howe 2006 no publicado
K50R	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Nguyen 2003, no publicado
D55E	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Mo 2005 no publicado
M71V	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Nguyen 2003, Howe 2006 no publicado
H95Q/R	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Tomei 2004, Mo 2005 no publicado
138I	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Mo 2005, Gaudieri 2009 no publicado
A300T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Ali 2008 no publicado
L314F	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Howe 2008 no publicado
C316Y/F/N/S	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Villano 2006, Howe 2008, Shi 2008, Flint 2009 Middleton T 2010, Sun 2011, Zeuzem 2012, Treviño 2011, Bartels 2013, Paolucci 2013
INN A338V	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Howe 2006 no publicado
I363V	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Howe 2008 no publicado
S365T/A/L/F	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Howe 2008, McCown 2008, Hang 2009 no publicado
S368A/T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lu 2007, no publicado
T389A/S	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Delang 2012 no publicado
L392I	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Rydberg 2009 no publicado
N411S	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Nguyen 2003, Mo 2005 no publicado
M414L/T/I/V/Q	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Nguyen 2003, Tomei 2004, Mo 2005, Lu 2007, Howe 2008, Thompson 2008, Koev 2009 Middleton 2010, Bartels 2013
L419M/V/S/I	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Le Pogam 2006, Cooper 2009 Bartels 2010, Zhang 2012
A421V	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	McPhee 2012 McPhee 2012, Bartels 2013

Tabla 14. *Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a INN descritas en la literatura.*

INN

Mutación	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Referencia
R422K	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	no publicado Bartels 2010, Troke 2011, Zhang 2012
M423T/V/I/A	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Howe 2006, Le Pogam 2006, Shi 2008 Bartels 2010, 2013, Troke 2011, Mori 2010
I424V	<i>in vivo</i> <i>in vivo</i>	Alves 2013 No publicado
M426T/V/I	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Shi 2008 Troke 2011, Paolucci 2013
A442T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Howe 2006 no publicado
C445F	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Shih 2011, Delang 2011 Hebner 2011, Zeuzem 2012, Bartels 2013
I447F	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Gray 2007 No publicado
Y448H/C	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	no publicado Lawitz 2010, Middleton 2010, Zeuzem 2012, Bartels 2013
C451R	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Tomei 2004 no publicado
Y452H	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Shih 2011 Bartels 2013, Paolucci 2013
I462T	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Kieffer 2010 no publicado
R465G	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Shih 2011 Paolucci 2013
I482L/V/T/S	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Le Pogam 2006, Shi 2008, Nicolas 2008, Cooper 2009 Nicolas 2009, Bartels 2010
A486V/I/T/M	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	no publicado Bartels 2010
V494A/I	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Shi 2008, Cooper 2009 Bartels 2010, 2013
P495L/A/S/T/Q	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Tomei 2003, Delang 2012, Lemm 2014 Zeuzem 2012, Sims 2014
P496A/T/S	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Kukolj 2005 Bartels 2013
V499A	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Kukolj 2005 Gaudieri 2009, Treviño 2011, Bartels 2013, Paolucci 2013
R531K	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Howe 2006 Villano 2006
G554D/S	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lu 2006; 2007, Thompson 2008 no publicado

Tabla 14. (Continuación).

	Mutación	<i>in vitro / in vivo</i>	Referencia
INN	Y555C	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lu 2007, no publicado
	S556G/N/C	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Koev 2009 Middleton 2010, Sun 2011, Bartels 2013
	G558R	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Tomei 2004 no publicado
	D559G/S/N	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Lu 2007, Middleton 2010
	W571R	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Shih 2011 no publicado

Tabla 14. (Continuación).

Para obtener una localización espacial de las mutaciones de resistencia a inhibidores análogos de nucleótidos (IAN) ó a inhibidores no nucleosídicos (INN), éstas se representaron en la estructura tridimensional de la polimerasa NS5B del aislado Con1 del VHC genotipo 1b (PDB 3FQL) mediante el programa PyMol v1.1, donde se destacan con esferas los residuos aminoacídicos relacionados con variaciones descritas en la literatura que confieren resistencia a los IAN y INN de la polimerasa NS5B (figura 38).

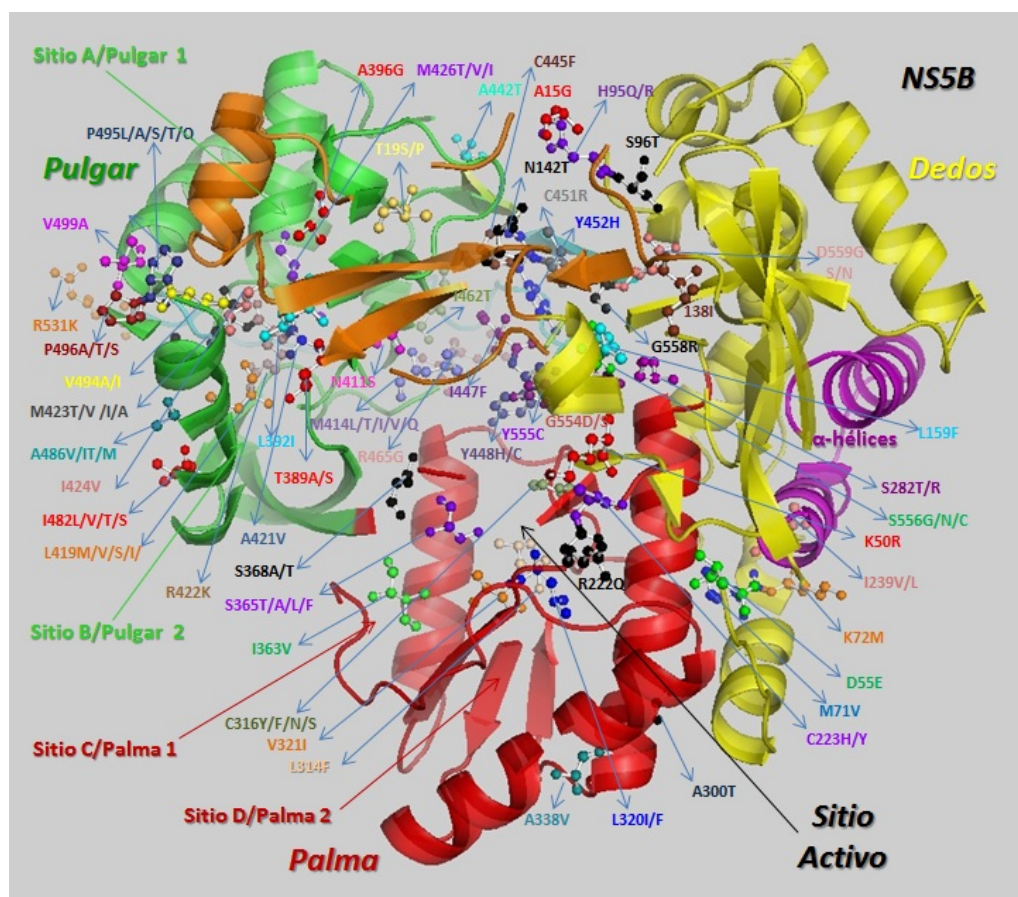


Figura 38. Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a los IAN e INN descritas en la literatura. Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.

En segundo lugar se determinó el número y la frecuencia de variaciones aminoacídicas relacionadas con resistencias en la proteína NS5B del VHC de los 60 aislados estudiados. El resultado del alineamiento realizado con las secuencias de aminoácidos de NS5B de los 60 aislados se detalla en la figura 39, mostrando sólo aquellas posiciones asociadas en la literatura a mutaciones causantes de resistencia IAN ó INN, (paneles a y b, respectivamente).

Resistencia a IAN

En la tabla 15 se describen las mutaciones de resistencia a fármacos IAN (respecto al aislado Con1 genotipo 1b del VHC) encontradas en los 60 aislados del VHC secuenciados.

NS5B Posiciones aa	Fármaco IAN*	Resistencias/ Aislamientos	Observaciones
A15G	Sofosbuvir ^{AP} /PSI-938 [†] /PSI-661 ^I	NINGÚNA	
K72M	Mericitabine ^{III}	NINGÚNA	
S96T	Sofosbuvir ^{AP} /Balapiravir [†]	NINGÚNA	
N142T	Balapiravir [†]	NINGÚNA	N142S 1/60 (1,67%)
R222Q	PSI-938 [†] /PSI-661 ^I	NINGÚNA	
L159F	Sofosbuvir ^{AP} /Mericitabine ^{III} /PSI-938 [†]	L159F 15/60 (25%)	
C223H/Y	Sofosbuvir ^{AP} /PSI-938 [†] /PSI-661 ^I	NINGÚNA	
I239V/L	Mericitabine ^{III}	I239L 1/60 (1,67%)	
S282T/R	Sofosbuvir ^{AP} /Mericitabine ^{III} /IDX184 [†] / PSI-938 [†] /Valopicitabine [†]	NINGÚNA	
L320I/F	Sofosbuvir ^{AP} /PSI-938 [†] /PSI-661 ^I	NINGÚNA	
V321I	Sofosbuvir ^{AP} /PSI-938 [†] /PSI-661 ^I	NINGÚNA	
A396G	Mericitabine ^{III}	NINGÚNA	
Y586C	Mericitabine ^{III}	NINGÚNA	

Tabla 15. *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a los inhibidores análogos de nucleótidos (IAN) de la polimerasa NS5B del VHC. Valor absoluto y porcentaje de posiciones detectadas en el análisis de cambio en la composición aminoacídica de los 60 aislados. En rojo se indican las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia encontradas.*

* Sitio de unión a NS5B: Sitio Activo

[†] Fase de estudio detenido.

(I) Fase pre-clínico/Fase 1 de desarrollo clínico.

(II) Fase 2 de desarrollo clínico.

(III) Fase 3 de desarrollo clínico.

(AP) Aprobado

No se encontró la principal mutación de resistencia a IAN (**S282T**) en ninguno de los 60 aislados secuenciados. La mutación **L159F** fue encontrada en 15/60 (25%) de las secuencias analizadas, aunque no se encontró ningún doble mutante **L159F+L320F**, recientemente asociados con resistencia a Sofosbuvir, Mericitabine y PSI-938 (Tong *et al.* 2014a). La variación **I239L** que confiere resistencia a Mericitabine (Ali *et al.* 2008) se encontró en un 1,67% (1/60) de las secuencias.

Finalmente, se encontró un polimorfismo natural con efecto desconocido (**N142S**) en uno de los aislados analizados.

Resistencia a INN

Las sustituciones relacionadas con resistencia a los INN, son muchos más frecuentes y se localizan según la diana del fármaco en los distintos sitios alostéricos de la polimerasa viral.

En la tabla 16 se muestran las mutaciones de resistencia a INN que afectan el pulgar I, sitio alostérico (A) encontradas en los 60 aislados secuenciados. Se encontró la mutación **T389A** asociada con resistencia a JT-16 con una frecuencia de 2/60 (3,33%) y la mutación **A421V** asociada con resistencia a BMS-791325 en 4/60 (6,67%) de los aislados analizados. Las mutaciones **P496S** y **V499A** asociadas con resistencia a Tegobuvir, BI207127, MK-3281, JTK-109 y BILB1941, se encontraron en 1/60 (1,67%) y el 3/60 (5%) de los aislados, respectivamente. Sin embargo las mutaciones **L392I** y **P495L/A/S/T/Q** asociadas con resistencia a Indol-N-acetamidas y BI207127, BMS-791325, Tegobuvir; MK-3281, JTK-109, BILB1941 y JT-16 no se encontraron en ninguna de las muestras analizadas en este trabajo, aunque se identificó un polimorfismo natural (**L392F**) en un caso.

NS5B Posiciones aa	Fármaco INN-A*	Resistencias/ Aislamientos	Observaciones
T389S/A	JT-16 ^I	T389A 2/60 (3,33%)	
L392I	Indol-N-acetamidas	NINGÚNA	L392F 1/60 (1,67%)
A421V	BMS-791325 ^{III}	A421V 4/60 (6,67%)	
P495L/A/S/T/Q	BI207127 ^{III} /BMS-791325 ^{III} / Tegobuvir ^{II} /MK-3281 [†] /JTK-109 [†] / BILB1941 [†] /JT-16 ^I	NINGÚNA	
P496A/T/S	BI207127 ^{III} /Tegobuvir ^{II} MK-3281 [†] /JTK-109 [†] /BILB1941 [†] /	P496S 1/60 (1,67%)	
V499A	BI207127 ^{III} /Tegobuvir ^{II} MK-3281 [†] /JTK-109 [†] /BILB1941 [†] /	V499A 3/60 (5%)	

Tabla 16. *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a los Inhibidores no nucleosídicos (INN) de la Polimerasa NS5B del VHC en el Pulgar I sitio alostérico (A). Valor absoluto y porcentaje de posiciones detectadas en el análisis de cambio en la composición aminoacídica de los 60 aislados. En rojo se indican las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia encontradas.*

* Sitio de unión a NS5B: "A"/Pulgar 1

† Fase de estudio detenido.

(I) Fase pre-clínico/ Fase 1 de desarrollo clínico

(II) Fase 2 de desarrollo clínico.

(III) Fase 3 de desarrollo clínico.

Con respecto a las resistencias a INN que afectan el pulgar II, sitio alostérico (B) de la polimerasa viral, las mutaciones encontradas en los 60 aislados analizados, se muestran en la tabla 17.

NS5B Posiciones aa	Fármaco INN-B*	Resistencias/ Aislamientos	Observaciones
T19S/P	Filibuvir ^{II} /VCH-759 [†]	T19S 58/60 (96,67%)	
M71V	Filibuvir ^{II} /VCH-759 [†]	NINGÚNA	M71I 1/60 (1,67%)
L419M/V/S/I	Filibuvir ^{II} /GS-9669 ^{II} / Lomibuvir ^{II} /VCH-759 [†] /VCH- 916 [†] /AG-021541 [†] /VCH-371 [†]	L419V 1/60 (1,67%)	
R422K	Filibuvir ^{II} /GS-9669 ^{II} /VCH- 759 [†] /VCH-916 [†] /AG-021541 [†]	NINGÚNA	
M423T/V/I/A	Filibuvir ^{II} /GS-9669 ^{II} /VCH- 759 [†] /VCH-916 [†] /AG-021541 [†]	NINGÚNA	
I424V	Filibuvir ^{II} /BILB 1941 [†]	I424V 9/60 (15%)	
M426T/V/I	Filibuvir ^{II} /VCH-759 [†] /VCH- 916 [†] /AG-021541 [†]	NINGÚNA	M426A 1/60 (1,67%) M426L 4/60 (6,67%)
A442T	Filibuvir ^{II} /Lomibuvir ^{II} / VCH-759 [†] /VCH-916 [†] /VCH-371 [†]	A442T 3/60 (5%)	
I462T	Filibuvir ^{II} /VCH-759 [†] /VCH-916 [†] / AG-021541 [†]	NINGÚNA	
R465G	Tegobuvir ^{II}	NINGÚNA	
I482L/V/T/S	Filibuvir ^{II} /GS-9669 ^{II} / Lomibuvir ^{II} /VCH-759 [†] /VCH- 916 [†] /AG-021541 [†] /VCH-371 [†]	NINGÚNA	
A486V/I/T/M	GS-9669 ^{II}	NINGÚNA	
V494A/I	Filibuvir ^{II} /GS-9669 ^{II} / Lomibuvir ^{II} /VCH-759 [†] /VCH- 916 [†] /AG-021541 [†] /BILB 1941 [†]	NINGÚNA	
R531K	Nesbuvir [†]	R531K 16/60 (26,67%)	

Tabla 17. *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a los Inhibidores no nucleosídicos (INN) de la Polimerasa NS5B del VHC en el Pulgar II sitio alostérico (B). Valor absoluto y porcentaje de posiciones detectadas en el análisis de cambio en la composición aminoacídica de los 60 aislados. Resaltando en rojo las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia encontradas.*

* Sitio de unión a NS5B: "B"/Pulgar 2; † Fase de estudio detenido; (I) Fase pre-clínico/ Fase 1 de desarrollo clínico; (II) Fase 2 de desarrollo clínico; (III) Fase 3 de desarrollo clínico.

La mutación **T19P** asociada a la resistencia de Filibuvir y VCH-759, presentó una frecuencia muy alta (58/60; 96,67%), en las secuencias analizadas. Por otro lado **L419V** (resistencia a Filibuvir, GS-9669, Lomibuvir, VCH-759, VCH-916, AG-021541 y VCH-371) solamente se encontró en un aislado. De las demás mutaciones relacionadas con resistencia a INN-B se encontró **I424V** (resistencia a Filibuvir y BILB 1491), **A442T** (resistencia a Filibuvir, Lomibuvir, VCH-759, VCH-916, y VCH-371), y **R531K** (resistencia a Nesbuvir) en 9/60 (15%), 3/60 (5%) y 16/60 (26,67%) de los aislados, respectivamente.

Las mutaciones **M71V** (resistencia a Filibuvir y VCH-759), **M426T/V/I** (resistencia a Filibuvir, VCH-759, VCH-916 y AG-021541 estos últimos fuera de desarrollo por efectos secundarios) no se identificaron en ninguno de los 60 aislados. Finalmente, se identificaron varios polimorfismos naturales: **M71I**, **M426A** y **M426L** con una frecuencia de 1/60 (1,67%) para los dos primeros y de 4/60 (6,67%) para el último.

En la tabla 18 se resumen las mutaciones de resistencia a INN que afectan la palma I, sitio alostérico (C) y la horquilla- β de la polimerasa encontradas en los 60 aislados. Se encontró que 57/60 (95%) tenían **I138** (resistencia a un prototipo de benzotiazidina, A782759), como la secuencia de referencia Con1 que ya es resistente al compuesto (Mo *et al.* 2005). Los replicones con I138 son también sensibles a otros INNs (Mo *et al.* 2005). Este resultado indica que nuestros aislados del subtipo 1b del virus tienen también esta característica identificada en otras en poblaciones naturales. En los 3/60 (5%) aislados restantes encontramos el polimorfismo **I138V**, no relacionado con resistencia.

Por otro lado, se encontraron varias mutaciones presentes sólo en unos pocos aislados. La mutación **S368A** solamente en un aislado 1/60 (1,67%). En la literatura la mutación **S368A/T** se asocia a resistencia a ABT-333, Setrobuvir, Tegobuvir, A782759, A837093, Nesbuvir y ABT-072.

NS5B Posicion aa	Fármaco INN-C*	Resistencias/ Aislamientos	Observaciones
K50R	Benzotiazidina	NINGÚNA	
D55E	A782759 ^I	NINGÚNA	
H95Q/R	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT-72 [†]	NINGÚNA	
138I	A782759 ^I	138I 57/60 (95%)	138V 3/60 (5%)
S368A/T	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT-72 [†]	S368A 1/60 (1,67%)	
N411S	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT-72 [†]	NINGÚNA	
M414L/T/I/V/Q	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} A782759 ^I /A837093 ^I /GSK-G25433 ^I Nesbuvir [†] /ABT-072 [†]	M414L 2/60 (3,33%)	
I447F	GSK-625433 ^I	NINGÚNA	
Y448H/C	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT- 072 [†] /VCH-759 [†] /VCH-916 [†]	NINGÚNA	Y448S 1/60 (1,67%)
C451R	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} /A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT-72 [†]	NINGÚNA	C451Y 5/60 (8,33%) C451H 3/60 (5%) C451N 1/60 (1,67%)
G554D/S	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT-72 [†]	NINGÚNA	
Y555C	Tegobuvir ^{II} /A782759 ^I /A837093 ^I	NINGÚNA	
S556G/N/C	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} Nesbuvir [†] /ABT-072 [†]	S556G 4/60 (6,66%) S556N 1/60 (1,66%)	INN-D: 30x a Benzofuranos
G558R	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT-72 [†]	NINGÚNA	
D559G/S/N	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT-72 [†]	NINGÚNA	

Tabla 18. *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a los Inhibidores no nucleosídicos (INN) de la Polimerasa NS5B del VHC en Palma I y Horquilla-β sitio alostérico (C). Valor absoluto y porcentaje de posiciones detectadas en el análisis de cambio en la composición aminoacídica de los 60 aislados. Resaltando en rojo las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia encontradas.*

* Sitio de unión a NS5B: "C"/Palma I; † Fase de estudio detenido; (I) Fase pre-clínico/ Fase 1 de desarrollo clínico; (II) Fase 2 de desarrollo clínico; (III) Fase 3 de desarrollo clínico.

También se identificó la mutación **M414L** con una frecuencia de 2/60 (3,33%) en las secuencias analizadas, relacionada a resistencia a ABT-333, Setrobuvir, Tegobuvir, A782759, A837093, GSK-G25433, Nesbuvir y ABT-072, como así también la mutación **S556G** en 4/60 (6,33%) y **S556N** en 1/60 (1,67%), con resistencia a ABT-333, Setrobuvir, Tegobuvir, Nesbuvir y ABT-072.

No se identificaron las mutaciones **Y448H/C** y **C451R** (resistencia a ABT-333, Setrobuvir, Tegobuvir, A782759, A837093, Nesbuvir, ABT-072, VCH-759 y VCH-916) en ninguna de las secuencias analizadas, pero en esas posiciones se encontraron varios polimorfismos con efecto desconocido: **Y448S**, **C451Y**, **C451H** y **C451N**, con frecuencias de 1/60 (1,67%), 5/60 (8,33%), 3/60 (5%) y 1/60 (1,67%) respectivamente.

Finalmente, las variaciones que causan resistencia a INN cuya diana es la palma II, sitio alostérico (D) de la polimerasa viral encontradas en los 60 aislados se resumen en la tabla 19. Casi todos (59/60; 98,33%) los aislados mostraron la mutación **A338V** en el sitio de unión piranoindoles (asociada, en presencia de M423V, a resistencia *in vitro* a benzotiadiazinas como A837093). En el 28/60 (46,67%) de los aislados se encontró la mutación **A300T**, que confiere resistencia a Nesbuvir. Además, en esta misma posición se encontró el polimorfismo **A300S** en 25/60 aislados (41,67%) cuyo efecto es desconocido. Por otro lado la mitad de los aislados presentaron la mutación **C316N** relacionada con resistencia a ABT-333, BI207127, Setrobuvir, Tegobuvir, A782759, A837093, Nesbuvir, y ABT-072. También se encontraron mutaciones de resistencia a Tegobuvir: C445F y Y452H en 2/60 (3,33%) y 1/60 (1,67%) aislados respectivamente.

La localización espacial de los residuos de NS5B identificados con variaciones relacionadas con resistencias se detallan en varias figuras para su mejor comprensión, de acuerdo a su sitio de acción. Se utilizó la estructura tridimensional de la polimerasa NS5B del aislado Con1 del VHC genotipo 1b (PDB 3FQL) y el programa PyMol v1.1.

NS5B Posición aa	Fármaco INN-D*	Resistencias/ Aislamientos	Observaciones
A300T	Nesbuvir [†]	A300T 28/60 (46,67%)	A300S 25/60 (41,67%)
L314F	Nesbuvir [†]	NINGÚNA	
C316N/Y/F/S	ABT-333 ^{III} /BI207127 ^{III} /Setrobuvir ^{II} / Tegobuvir ^{II} /A782759 ^I /A837093 ^I / Nesbuvir [†] /ABT-072 [†]	C316N 30/60 (50%)	
A338V	A837093 ^I	A338V 59/60 (98,33%)	17x a INN-B junto T19S, M71V, R422K, M423A/I/T/V
I363V	Nesbuvir [†]	NINGÚNA	
S365T/A/L/F	ABT-333 ^{III} /Setrobuvir ^{II} /Tegobuvir ^{II} / A782759 ^I /A837093 ^I /Nesbuvir [†] /ABT-072 [†]	NINGÚNA	
C445F	Tegobuvir ^{II}	C445F 2/60 (3,33%)	
Y452H	Tegobuvir ^{II}	Y452H 1/60 (1,67%)	

Tabla 19. *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a los Inhibidores no nucleosídicos de la Polimerasa (INN) en Palma II sitio alostérico (D). Valor absoluto y porcentaje de posiciones detectadas en el análisis de cambio en la composición aminocídica de los 60 aislados. En rojo variaciones encontradas asociadas a resistencia.*

* Sitio de unión a NS5B: "D"/Palma 2

† Fase de estudio detenido

(I) Fase pre-clínico/ Fase 1 de desarrollo clínico

(II) Fase 2 de desarrollo clínico

(III) Fase 3 de desarrollo clínico.

La figura 40 muestra la localización espacial de los residuos aminoacídicos asociados a mutaciones (a) descritas en la literatura como causantes de resistencia a IAN y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados. Los inhibidores no nucleosídicos (INN) tienen varios sitios de unión alostéricos en la polimerasa NS5B del VHC, agrupados en cuatro zonas: el sitio A y el sitio B están ubicados en el dominio del pulgar, mientras el C y D están más cerca del sitio activo, en el dominio de la palma. En la figura 41 se representa la proteína NS5B del VHC destacando las posiciones de aminoácidos implicadas en resistencia a los INN (a) descritas en la literatura y (b) las encontradas en los 60 aislados analizados en esta tesis doctoral.

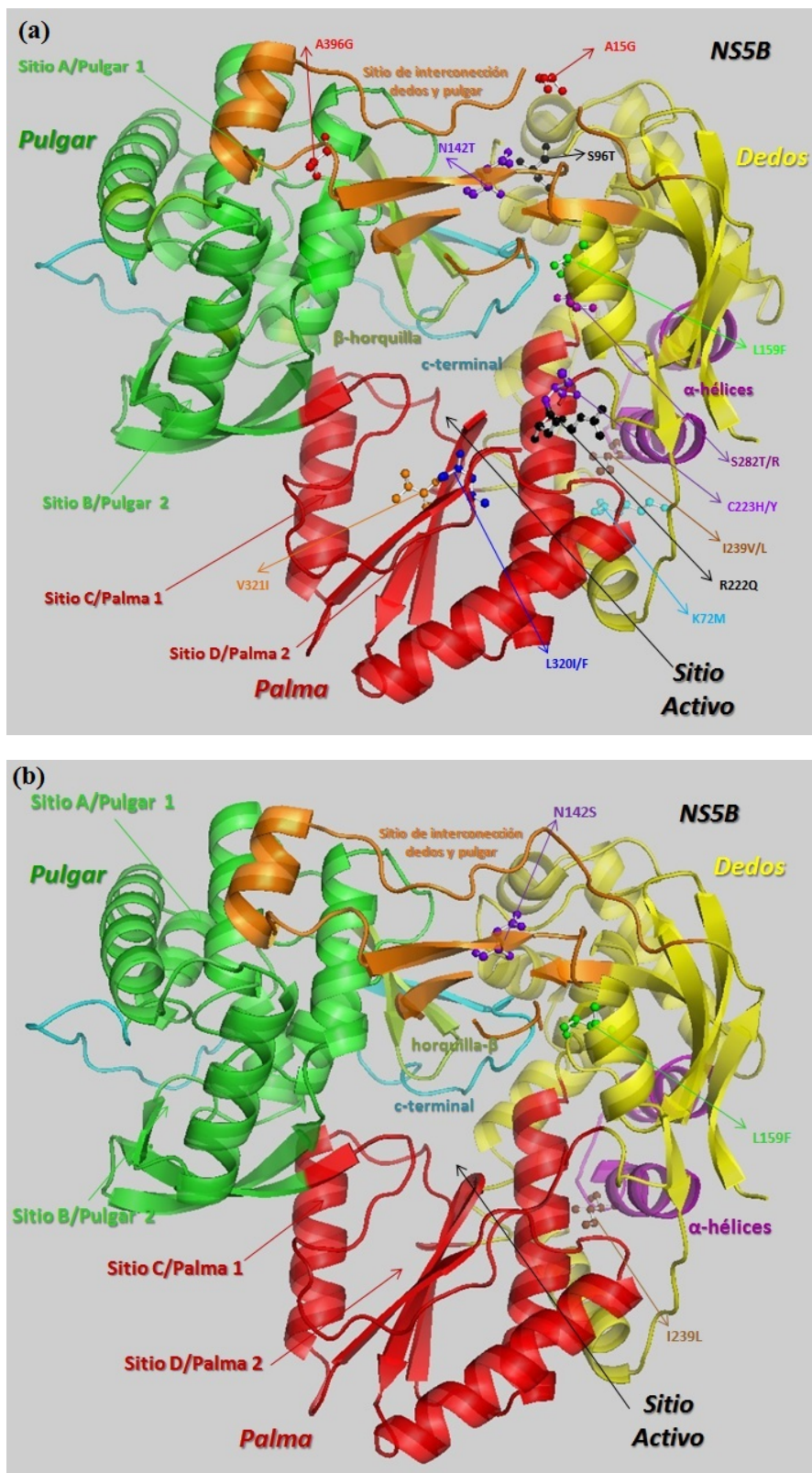


Figura 40. *Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a los IAN (a) descritas en la literatura y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados en este trabajo. Las esferas en colores representan los aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.*

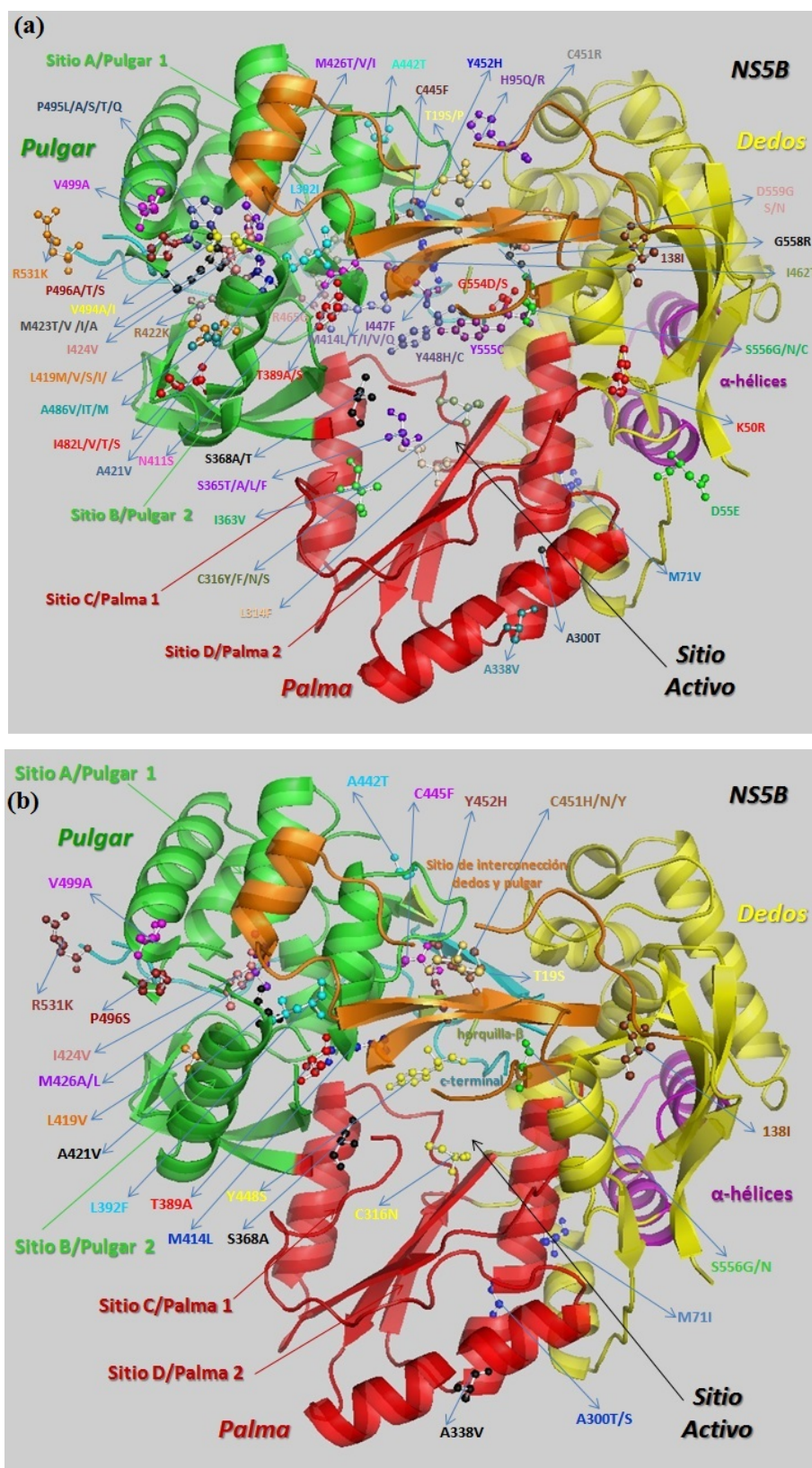


Figura 41. Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a los INN (a) descritas en la literatura y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados. Las esferas en colores representan los aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.

Para mayor claridad, la representación espacial de las mutaciones de resistencia a INN se desglosó en varias figuras adicionales de acuerdo al sitio alostérico. La figura 42 muestra los residuos aminoacídicos asociados a mutaciones de resistencia a INN en el sitio de unión alostérico A del pulgar I (a) descritas en la literatura y (b) encontradas en los 60 aislados analizados. La figura 43 muestra los residuos aminoacídicos asociados a mutaciones a INN con sitio de unión alostérico B pulgar II (a) descritas en la literatura y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados. La figura 44 muestra los residuos aminoacídicos asociados a mutaciones como causantes de resistencia a INN con sitio de unión alostérico C palma I y horquilla- β (a) descritas en la literatura (b) y los encontrados en los 60 aislados analizados. Finalmente, la figura 45 muestra los residuos aminoacídicos asociados a mutaciones como causantes de resistencia a INN con sitio de unión alostérico D palma II (a) descritas en la literatura y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados.

Las pocas variaciones asociadas a resistencia a IAN encontradas se encuentran fuera del sitio activo. Las variaciones asociadas a resistencias a INN son frecuentes, y están distribuidas tanto cercanas al sitio activo como en los distintos sitios alostéricos de la polimerasa viral (los sitios A y B están ubicados en el pulgar, mientras los C y D están más cerca del sitio activo, en la palma). Estos cambios de aminoácido encontrados en las posiciones implicadas en resistencias a IAN e INN podrían interferir en la correcta unión ó contacto de los fármacos con la polimerasa NS5B, afectando su eficacia. Cabe destacar la proximidad de la posición C316 al sitio activo (diana de los IAN), una posición donde el 50% de los aislados analizados tenían la sustitución C316N. Además podría existir una eficacia diferencial entre los distintos INN en nuestros aislados de subtipo 1b: la resistencia a Filibuvir es muy frecuente (>90%), y la resistencia a ABT-333, Nesbuvir y ABT-072 está presente en la mitad de ellos. Nuestros datos también sugieren una mayor efectividad de los IAN en relación a los INN para los pacientes infectados por el VHC-1b de nuestra área. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los de estudios muy recientes que sugieren que la sustitución C316N, asociada hasta ahora a resistencias a INN, puede también ser responsable de resistencia al IAN sofosbuvir en algunos pacientes infectados por VHC subtipo 1b (Donaldson *et al.* 2014).

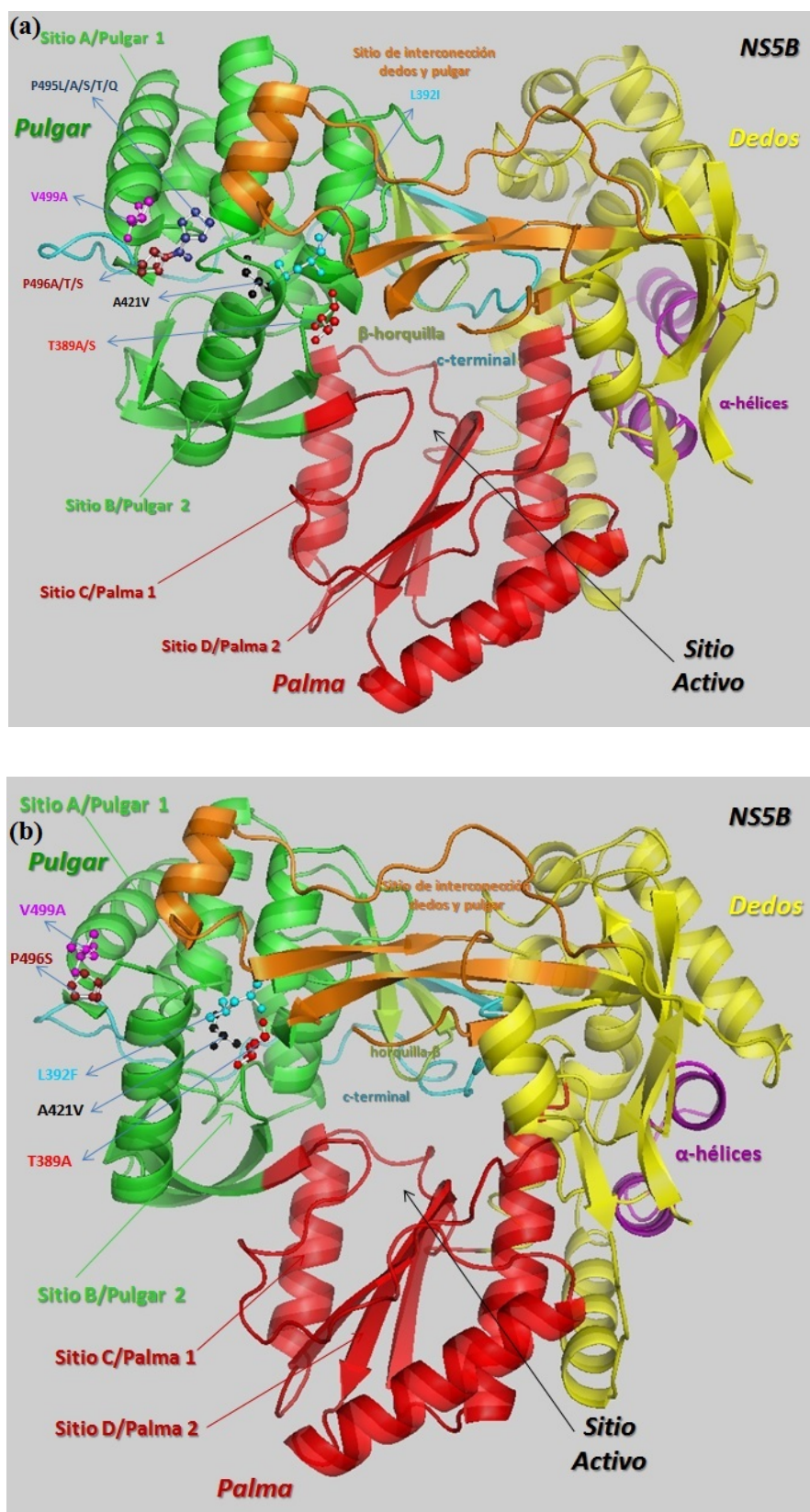


Figura 42. Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a los INN con sitio de unión Pulgar I sitio alostérico (A) (a) descritas en la literatura y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados. Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.

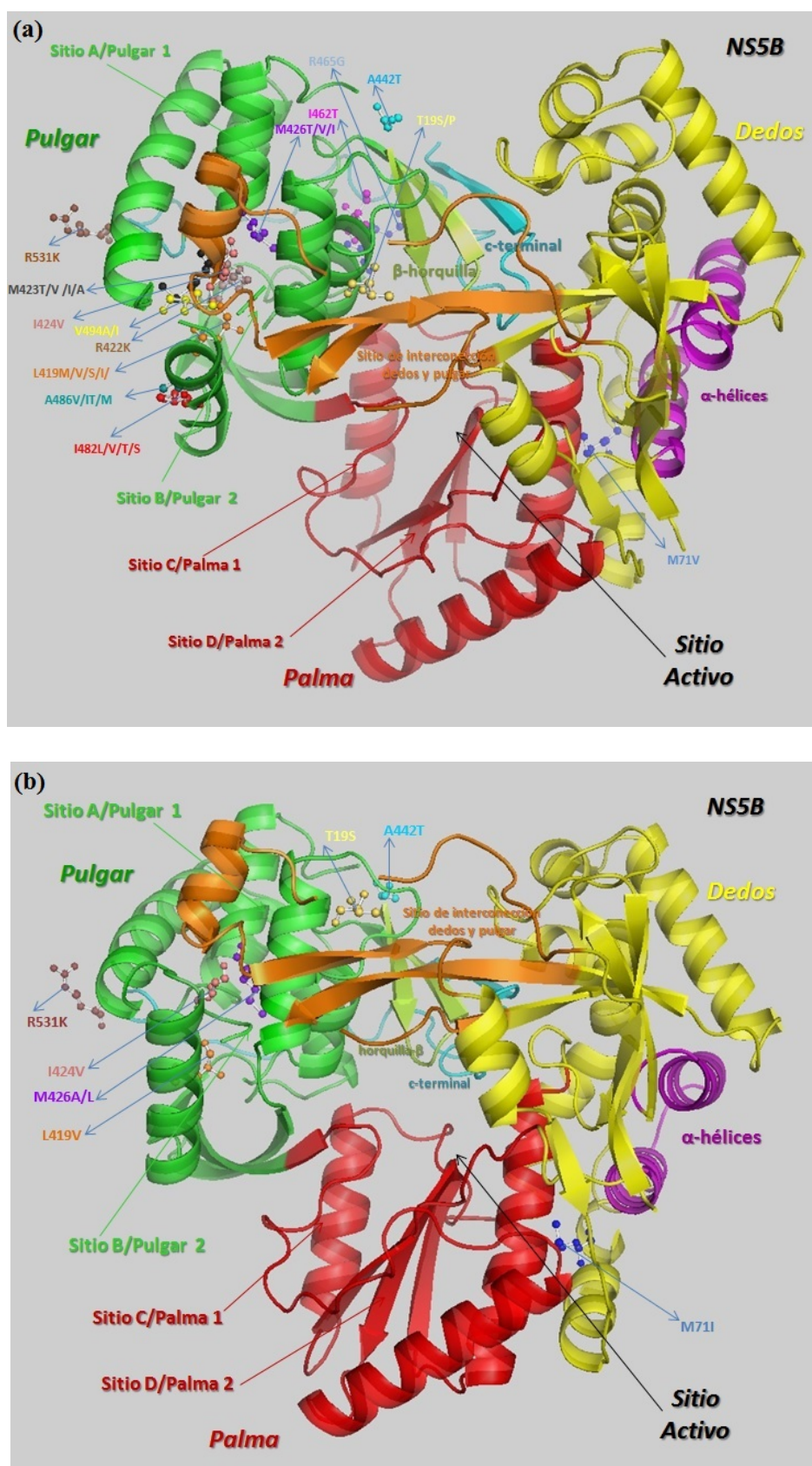


Figura 43. Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a los INN con sitio de unión Pulgar II sitio alostérico (B) (a) descritas en la literatura y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados. Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.

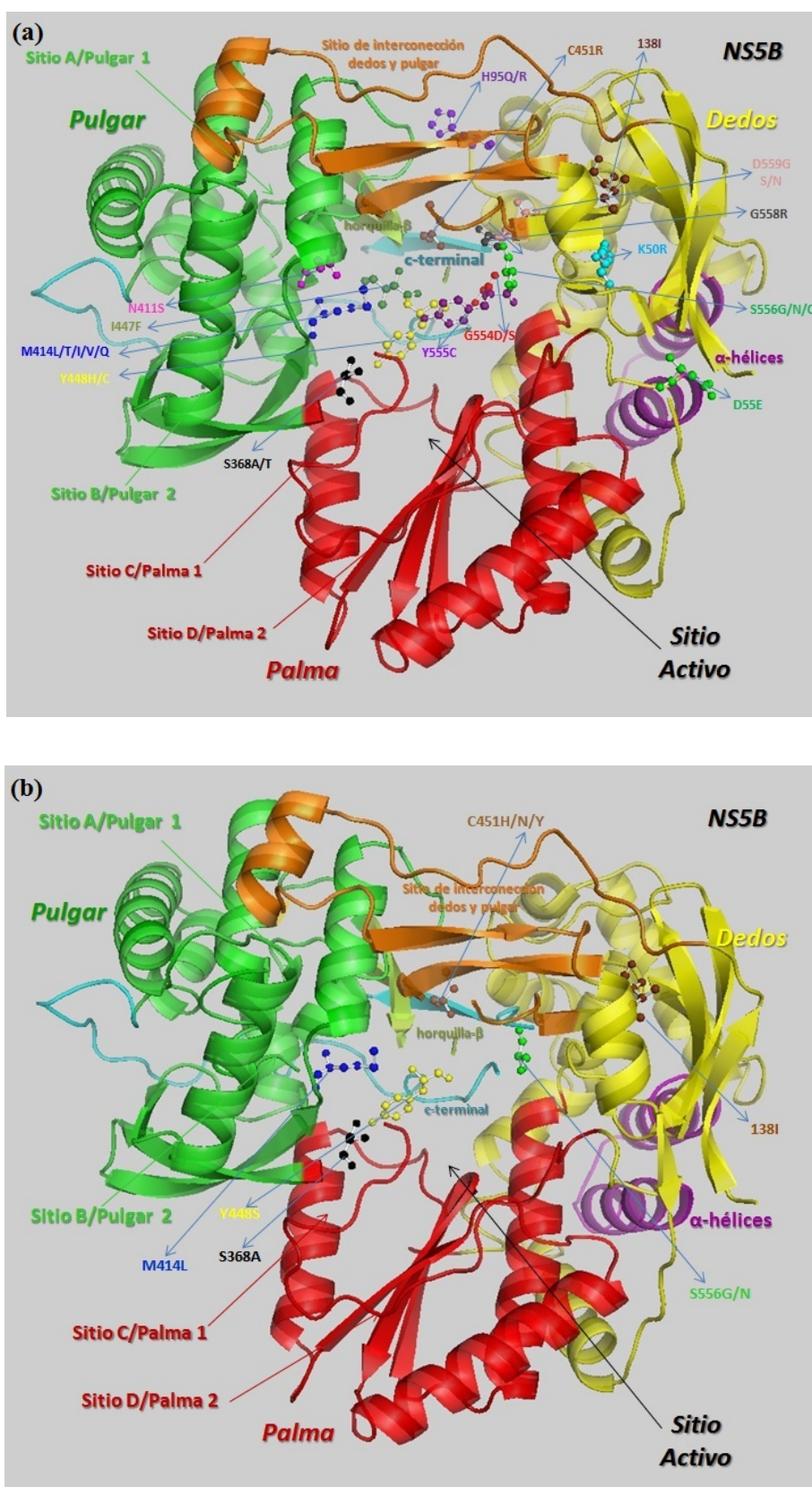


Figura 44. Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a los INN con sitio de unión Palma I y Horquilla- β sitio alostérico (C) (a) descritas en la literatura y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados. Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.

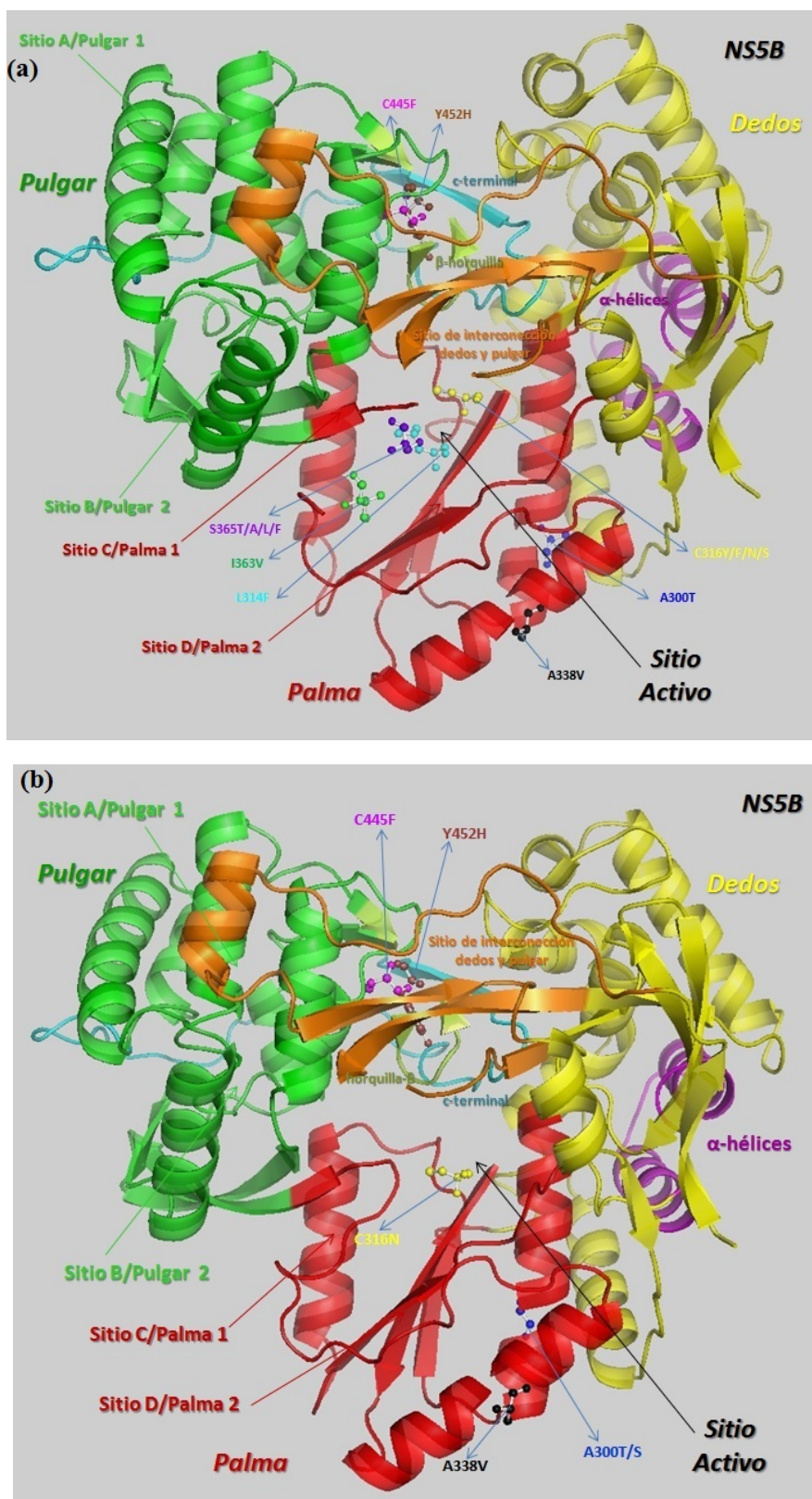


Figura 45. Posición de los aminoácidos relacionados con resistencia a los INN con sitio de unión Palma II sitio alostérico (D) (a) descritas en la literatura y (b) los encontrados en los 60 aislados analizados. Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos afectados por las diferentes variaciones que se indican con las flechas.

Resistencia doble a IP e IAN ó INN

En la figura 46 se muestra la combinación de los alineamientos realizados con las secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones NS3 (proteasa) y NS5B del virus del VHC de los 60 pacientes estudiados. En el alineamiento sólo se muestran las posiciones asociadas a mutaciones descritas en la literatura como causantes de resistencia a IP, IAN e INN. Como puede observarse, cada uno de los 60 aislados de VHC-1b estudiados posee al menos una variación asociada a mutaciones de resistencia, ya sea a IP y/o IAN e INN.

En la tabla 20 se resumen las mutaciones encontradas asociadas a resistencia a IP, IAN e INN y los polimorfismos con efecto desconocido. Los aislamientos virales de los pacientes inmunocompetentes del Hospital La Fe (HLF) mostraron una mediana de 0 (rango 0-1) sustituciones que confieren resistencia a IP ó a IAN, mientras que la mediana de las mutaciones a INN fue de 4 (rango 1-6). Los aislados de los pacientes inmunodeprimidos (IDV) presentaron también una mediana de 0 (rango 0-1) mutaciones de resistencia a IP ó IAN y una mediana de 2 (rango 1-4) a INN. Los aislados de los pacientes inmunocompetentes del HUGTIP (ICB) presentaron también una mediana de 0 (0-1) mutaciones de resistencia a IP ó IAN, pero de 3 (1-5) para INN. En resumen, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ó subgrupos de pacientes ($p > 0,05$).

En un segundo análisis, se categorizaron los aislados según el número de mutaciones de resistencia ó polimorfismos en 0 ó 1 mutaciones/polimorfismos a IP ó IAN de NS5B y en 0, 1, 2-3, ó más de 3 mutaciones/polimorfismos a INN de NS5B. Los resultados se resumen en la tabla 21 donde se aprecia que no hay una distribución de mutaciones diferencial según el grupo ó subgrupo de pacientes y que en la mayoría de ellos el virus no muestra mutaciones a IP ó IAN pero sí a INN.

Posición aaNS3 Mutaciones IP	Posición aaNS5B Mutaciones IAN-INN	
00000000011111111111111111111111	000000001112222 333333 333333 444444 444444 444444 444444 555555 55	
13344557880012235556677777	115577993 452238 011223 666899 111222 224444 555668 899993 555557 8	
66913459075972385683803456	590512568 292392 046018 358926 149123 462578 125252 645691 456891 6	
1b. Con1. GER	CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDVESME	ATKDMKHSINLRCSALCLVAISSTLANMLARMIMACIYCYIRIAVPPVRGYSGDWY
680_013V.....S.....T.N.V.....
974_028S.....S.....N.V.....V.V.....
341_032S.....S.....T.N.V.....
308_056S.....S.....V.....T.N.V.....
433_059S.....S.....T.N.V.....
429_066H.....S.....T.N.V.....K.G.....
416_100F.....S.....S.N.V.....H.....K.G.....
665_101S.....S.....F.....S.N.V.....K.....
856_105S.....S.....T.....V.....T.....
502_106N.....S.....L.T.....V.....V.....
189_123S.....S.....S.....V.....K.....
132_129A.....S.....T.....V.....
255_156S.....S.....T.....V.....
213_173S.....S.....S.....V.....V.F.....K.....
146_178I.....S.....T.....V.....
915_183S.....S.....T.....V.....N.....
482_194S.....N.....S.....F.....T.N.V.....K.....
186_197T.....S.....T.....V.....
090_198I.....S.....S.....V.....H.....K.....
373_200S.....S.....T.....V.....
978_202S.....S.....T.....V.....
448_203T.....S.....S.N.V.....V.V.....
443_205I.....A.....S.....S.....V.....Y.....
304_206I.....S.....F.....S.N.V.....T.....G.....
859_207H.....S.....F.....S.N.V.....F.....V.....Y.....AK.G.....
575_210H.....I.....S.....V.....T.....V.....
865_211S.....S.....N.V.....T.....
200_213S.....S.....F.....T.N.V.....K.....
767_214S.....S.....T.N.V.....K.....
259_219S.....S.....S.....V.....H.....G.....
610_220I.....S.....T.....V.....H.....
384_587S.....S.....T.....V.....K.....
804_747I.....S.....N.V.....K.....
345_801S.....S.....F.....S.N.V.....
775_1066I.....S.....S.....N.V.....
507_1434I.....S.....S.....N.V.....
478_1457C.....S.....T.....V.....Y.....AK.....
894_1493S.....S.....S.....V.....S.....
570_1526I.....S.....N.V.....
941_1530L.....S.....N.V.....V.....S.....
937_1740I.....S.....F.....S.N.V.....G.....
544_1852S.....S.....T.....V.....F.....
905_2349S.....S.....T.....V.....V.VL.....
149_2395S.....S.....F.....S.N.V.....
20I.....S.....F.....S.N.V.....L.....
30I.....S.....T.N.V.....
33S.....I.....S.....T.....V.....
41T.....I.....S.....F.....S.N.V.....
45T.....T.....I.C.....S.....F.....S.N.V.....N.....K.....
54T.....I.....S.....N.V.....
55S.....S.....S.....N.V.....A.....
59I.....S.....F.....S.N.V.....
65S.....S.....T.....V.....
66S.....S.....F.....S.N.V.....K.G.....
70I.....S.....V.....S.....V.....A.L.....Y.....K.....
71G.....I.....S.....F.....S.N.V.....A.L.....VA.....
72S.....S.....T.....V.....A.....V.VL.....Y.....
162I.....S.....T.....V.....V.VL.....Y.....
163S.N.....I.....S.....T.....V.....
164I.....S.....F.....S.N.V.....K.G.....

Figura 46. *Presencia de variaciones asociadas con resistencia a los Antivirales de acción Directa (AAD) en los 60 aislados analizados. Inhibidores de la proteasa NS3 (IP), inhibidores análogos de nucleótidos (IAN) e inhibidores no nucleosídicos (INN) de la polimerasa NS5b. La primera secuencia corresponde al aislado prototipo Con1 (VHC-1b). Los puntos indican identidad con el prototipo. Los colores empleados en la tabla se corresponden con la naturaleza del aminoácido y de la cadena lateral: rojo para aminoácidos polares con carga positiva; negro para polares con carga negativa; azul para aminoácidos con cadenas laterales polares pero sin carga; verde para los aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas y granate para cisteína, naranja para glicina y gris para prolina.*

	Hospital La Fe			HUGTIP		Total pacientes	<i>P</i> (ICV vs IDV)	<i>P</i> (ICV vs ICB)	<i>P</i> (IDV vs ICB)	<i>P</i> (IC vs IDV)	<i>P</i> (HLF vs HUGTIP)
	ICV	IDV	ICV+IDV	ICB	Todos IC						
	N=13	N=21	N=34	N=26	N=39	N=60					
Resistencia a IP NS3											
Mutaciones											
Mediana (min-máx)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,561	0,771	0,706	0,591	0,897
Polimorfismos											
Mediana (min-máx)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0,669	0,095	0,136	0,360	0,058
Resistencia a IAN NS5B											
Mutaciones											
Mediana (min-máx)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,520	0,343	0,068	0,115	0,073
Polimorfismos											
Mediana (min-máx)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,669	0,479	0,369	0,463	0,253
Resistencia a INN NS5B											
Mutaciones											
Mediana (min-máx)	4 (1-6)	2 (1-4)	3 (1-6)	3 (1-5)	3 (1-6)	3 (1-6)	0,056	0,136	0,363	0,137	0,900
Polimorfismos											
Mediana (min-máx)	0 (0-3)	0 (0-2)	0 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)	0,606	0,450	0,087	0,147	0,117

Tabla 20. *Mutaciones de resistencias a los IP, IAN e INN y polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia. Valor expresado en Mediana (mínimo-máximo) detectada en los aislados de los 60 pacientes analizados. ICV: inmunocompetentes Valencia; IDV: inmunodeprimidos Valencia; ICV +IDV; ICB: inmunocompetentes Badalona; y IC: todos los inmunocompetentes. HLF: Hospital La Fe de Valencia, HUGTIP: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.*

	Hospital La Fe			HUGTIP			<i>P</i> (ICV vs IDV)	<i>P</i> (ICV vs ICB)	<i>P</i> (IDV vs ICB)	<i>P</i> (IC vs IDV)	<i>P</i> (HLF vs HUGTIP)
	ICV	IDV	ICV+IDV	ICB	Todos IC	Total pacientes					
	N=13	N=21	N=34	N=26	N=39	N=60					
Resistencia IP NS3											
Mutaciones n (%)							0,682 ^F	> 0,999 ^F	0,703 ^{x²}	0,588 ^{x²}	0,896 ^{x²}
0	11 (84,62%)	16 (76,19%)	27 (79,41%)	21 (80,77%)	48 (80%)	48 (80%)					
1	2 (15,38%)	5 (23,81%)	7 (20,59%)	5 (19,23%)	12 (20%)	12 (20%)					
Polimorfismos n (%)							0,727 ^F	0,227 ^{x²}	0,239 ^{x²}	0,483 ^{x²}	0,094 ^{x²}
0	9 (69,23%)	13 (61,90%)	22 (64,71%)	11 (42,31%)	20 (51,28%)	33 (55%)					
1	4 (30,77%)	8 (38,10%)	12 (35,29%)	15 (57,69%)*	19 (48,72%)*	27 (45%)*					
Resistencia a IAN NS5B											
Mutaciones n (%)							0,653 ^F	0,477 ^F	0,102 ^F	0,136 ^F	0,071 ^{x²}
0	10 (76,92%)	18 (85,71%)	28 (82,35%)	16 (61,54%)	26 (66,67%)	44 (73,33%)					
1	3 (23,08%)	3 (14,29%)	6 (17,65%)	10 (38,46%)	13 (33,33%)	16 (26,67%)					
Polimorfismos n (%)							0,170 ^{x²}	> 0,999 ^F	> 0,999 ^F	> 0,999 ^F	0,433 ^F
0	13 (100%)	21 (100%)	34 (100%)	25 (96,15%)	38 (97,44%)	59 (98,33%)					
1	0	0	0	1 (3,85%)	1 (2,56%)	1 (1,67%)					
Resistencia a INN NS5B											
Mutaciones n (%)							0,104 ^{x²}	0,060 ^{x²}	0,728 ^{x²}	0,546 ^{x²}	0,329 ^{x²}
0	0	0	0	0	0	0					
1	1 (7,69%)	2 (9,52%)	3 (8,82%)	1 (3,85%)	2 (5,13%)	4 (6,67%)					
2-3	5 (38,46%)	15 (71,43%)	20 (58,82%)	20 (76,92%)	25 (64,10%)	40 (66,67%)					
>3	7 (53,85%)	4 (19,05%)	11 (32,35%)	5 (19,23%)	12 (30,77%)	16 (26,67%)					
Polimorfismos n (%)							0,521 ^{x²}	0,186 ^{x²}	0,191 ^{x²}	0,356 ^{x²}	0,118 ^{x²}
0	7 (53,85%)	12 (57,14%)	19 (55,88%)	8 (30,77%)	15 (38,46%)	27 (45%)					
1	3 (23,08%)	7 (33,33%)	10 (29,41%)	14 (53,85%)	17 (43,59%)	24 (40%)					
2-3	3 (23,08%)	2 (9,52%)	5 (14,71%)	4 (15,38%)	7 (17,95%)	9 (15%)					

Tabla 21. **Mutaciones de resistencias a los IP, IAN e INN y polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia.** Valor absoluto y porcentaje detectadas en los 60 aislados. F: Prueba de Fisher; x²: Prueba de Chi cuadrado de Pearson; *: 2 aislados poseen 2 polimorfismos. ICV: inmunocompetentes Valencia; IDV: inmunodeprimidos Valencia; ICV +IDV; ICB: inmunocompetentes Badalona; y IC: todos los inmunocompetentes. HLF: Hospital La Fe de Valencia, HUGTIP: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.

4.6.3 *Análisis de codones y barrera genética en las regiones NS3 y NS5B del VHC*

En los aislados analizados, las variaciones asociadas con resistencia pueden tener lugar por mutación espontánea ó presión inmunológica, ya que no hubo presión selectiva del antiviral, ó bien por polimorfismo natural de nuestros aislados respecto a la secuencia de referencia (Con1-1b), utilizada en los ensayos de replicón para definir la efectividad de los fármacos. El análisis de codón en las posiciones asociadas a resistencia a los IP, permitió determinar en cada caso el número de sustituciones nucleotídicas necesarias para que cambie el aminoácido y se genere resistencia (lo que se conoce como barrera genética), y la frecuencia. Los cambios de aminoácidos pueden requerir un sólo cambio de nucleótido (baja barrera genética) ó varios (mayor barrera genética). Los resultados globales se detallan en el (Anexo XII Tabla 2) y se resumen a continuación cada codón en los aislados estudiados.

Para los cambios de aminoácido observados asociados a resistencia a IP, en la posición 36 **GTC (V)**, el cambio en el codón fue de sólo un nucleótido **CTC (L)**, como así también en las posiciones 55 [**GTC (V)** → **GCC (A)**], 87 [**GCG (A)** → **ACG (T)**], 117 [**CGC (R)** → **CAC (H)**] y 122 [**AGC (S)** → **ACC (T)**, **AAC (N)** y **GGC (G)**]. Sin embargo en la posición 170 el cambio fue de dos nucleótidos [**GTA (V)** → **ACA (T)**] (Anexo XII Tabla 2). En las demás posiciones de interés no hubo cambio de aminoácido que se asociara a mutaciones de resistencia a los IP, si bien se encontraron algunos de nucleótido no suficientes para el cambio de aminoácido (Anexo XII Tabla 2).

Estos resultados sugieren que, en el subtipo 1b del VHC, las variantes encontradas en las posiciones 55, 87 y 117 de la proteasa NS3 presentan una barrera genética baja, mientras que la posición 170 tiene una barrera genética mayor.

En las posiciones asociadas a resistencia a los IAN (Anexo XII Tabla 3), se observaron pocos cambios. En la posición 159 el cambio fue de uno [**CTT (L)** → **TTT (F)**] ó de dos nucleótidos [**TTC (F)**] y en la posición 239 el cambio en el codón fue siempre de dos nucleótidos [**ATC (I)** → **CTT (L)**]. En la principal posición de mutación de resistencia a IAN 282 no se encontró cambio

de aminoácido, si bien se encontró cambio de nucleótido en el codón no fue suficiente para el cambio del aminoácido.

Sin embargo, para las posiciones asociadas a resistencia a los INN (Anexo XII Tabla 3), pudimos observar distintos cambios. En la posición 338 el cambio fue de sólo un nucleótido [GCC (A) → GTC (V)], como así también las posiciones 368 [TCC (S) → GCC (A)] 389 [ACC (T) → GCC (A)] 414 [ATG (M) → CTG (L)] 419 [TTG (L) → GTG (V)] 442 [GCC (A) → ACC (T)] 452 [TAC (Y) → CAC (H)] 496 [CCC (P) → TCC (S)] 499 [GTC (V) → GCC (A)] y 556 [AGC (S) → GGC (G) y AAC (N)]. En la posición 19 el cambio en el codón fue de uno [ACC (T) → AGC (S)] ó de dos nucleótidos [ACC (T) → AGT (S)] observado también en las posiciones 300 [GCT (A) → ACT (T), ACC (T) y ACA (T)] 421 [GCA (A) → GTA (V) y GTG (V)] 424 [ATC (I) → GTC (V) y GTT (V)] y 531 [AGG (R) → AAG (K) y AAA (K)]. Sin embargo en la posición C445F el cambio en el codón fue de dos nucleótidos [TGT (C) → TTC (F)] y en la posición 316 el cambio en el codón fue de dos ó hasta 3 nucleótidos [TGC (C) → AAC (N) y AAT (N)].

En las demás posiciones de interés no hubo cambio de aminoácido que se asociara a mutaciones de resistencia a los IAN e INN, si bien se encontraron distintos cambios de nucleótidos no suficientes para el cambio de aminoácido (Anexo XII Tabla 3).

Estos resultados sugieren que, en el subtipo 1b del VHC, las variantes de resistencia a IAN presentan, en general, una barrera genética mayor que las variantes de resistencia a INN, y que, entre éstas últimas, se distinguen posiciones con barrera genética baja -una sustitución de nt- (aa 338, 368, 389, 419, 442, 452, 496, 499 y 556), intermedia -una o dos sustituciones- (aa 19, 300 y 424) y alta -dos ó más sustituciones- (aa 316 y 445).

4.7 Determinación de mutaciones minoritarias en la “cuasiespecie” del VHC. Análisis Intraindividuos

La secuenciación *Sanger* estándar de amplicones de PCR tiene un límite de sensibilidad para detectar mutaciones presentes mínimo en un 20% de la población viral. Para estudiar si la población de “cuasiespecies” virales dentro de cada individuo infectado contiene algún genoma con mutaciones de resistencia a fármacos inhibidores de la proteasa NS3 y la polimerasa NS5B en proporciones inferiores a las detectables mediante secuenciación *Sanger* estándar (mutaciones minoritarias), se seleccionaron 10 muestras (5 de pacientes inmunocompetentes y 5 pacientes trasplantados hepáticos). Con esta selección, también se pretendía inferir posibles características diferenciales de variabilidad genética en la proteasa NS3 y polimerasa NS5B de los aislados de pacientes trasplantados inmunodeprimidos, en comparación con los inmunocompetentes no trasplantados.

4.7.1 Clonación de productos de PCR

Los productos de PCR purificados de la región NS3 y NS5B de los 10 pacientes seleccionados fueron clonados en un vector fagémido de *E.coli* tal y como se detalló en el apartado 3.10.1. La inserción de nuestro fragmento clonado provoca la interrupción de la expresión del gen de la β -galactosidasa lacZ, y la falta de color de las colonias en las placas con el sustrato de lacZ (X-gal+IPTG). En la figura 47, podemos observar el crecimiento de las colonias de *E.coli* transformadas (ampicilina resistentes), que han incorporado plásmidos recircularizados sin inserto (colonias azules) y que han incorporado el plásmido recombinante que contiene el inserto (colonias blancas), resultantes en este caso de la clonación del fragmento del gen NS5B de (1836 pb). Del plaqueo de transformantes para las porciones NS3 (proteasa) y NS5B de los 10 aislados seleccionados, se escogieron las colonias blancas para llevar a cabo la amplificación de los plásmidos recombinantes mediante PCR de colonia.

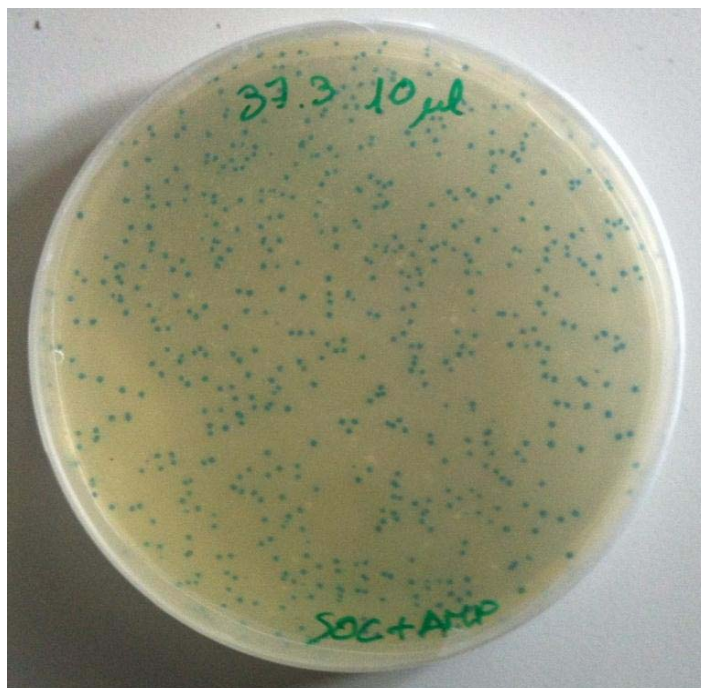


Figura 47. *Placa de cultivo de clones*. Se observa el crecimiento de colonias blancas y azules (LB+Amp+X-gal+IPTG), resultantes de la clonación del fragmento del gen NS5B de 1836 pb.

4.7.2 PCR de colonia

Se logró amplificar la región NS3 y NS5B a partir de colonias recombinantes, mediante el protocolo de PCR de colonia detallado anteriormente en el apartado 3.10.2.

Tras cada PCR de colonia, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, comprobando la correcta amplificación del fragmento de la región NS3 ó NS5B clonado mediante la comprobación de la presencia de una banda de 1.509 pb para la región de la proteasa NS3 ó de 1.907 pb para la región NS5B, respectivamente (figura 48).

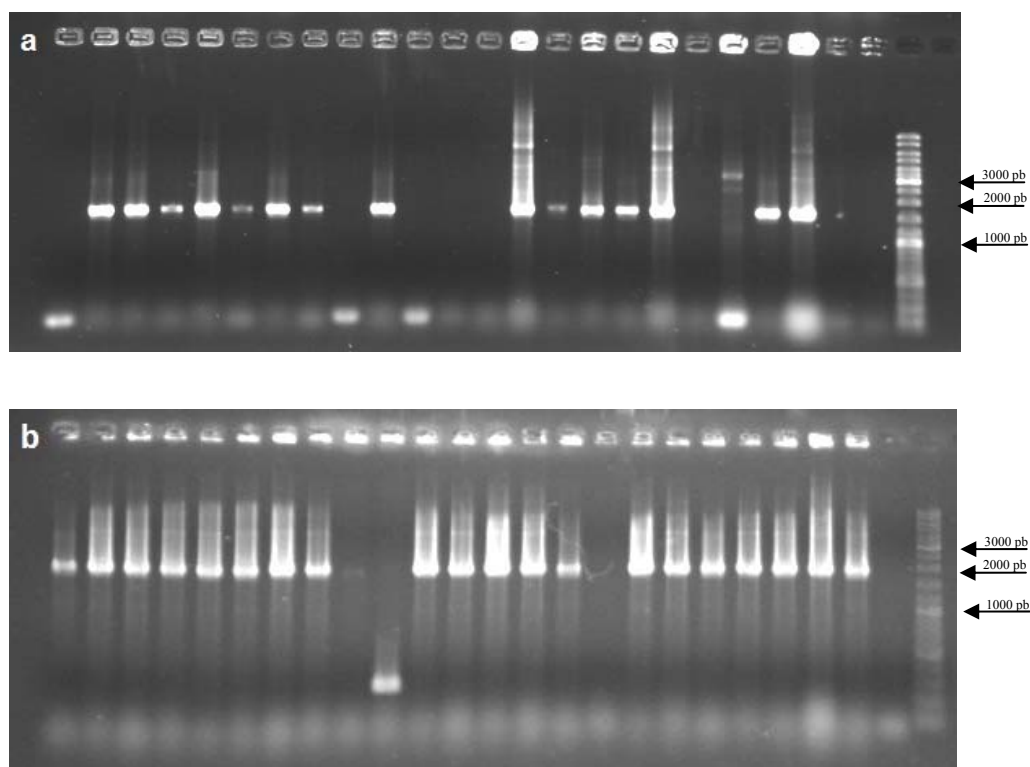


Figura 48. *Gel de electroforesis* (agarosa 0,8% y tinción con gel red 0,3%). Las bandas corresponden al inserto clonado del gen de la (a) proteasa NS3 de 1.509 pb ó (b) de la polimerasa NS5B 1.907 pb. En el extremo derecho el marcador de peso molecular (ADN LadderMix Fermentas). Marcado con flechas tenemos los fragmentos del marcador de peso molecular que nos sirven de referencia para distinguir el tamaño de nuestro gen amplificado.

4.7.3 Secuenciación de los productos de PCR

Para la región NS3 (proteasa) se secuenciaron un total de 355 clones correspondientes a las 10 muestras de los pacientes seleccionados (promedio de 35,5 clones por paciente), mientras que para la región NS5B se secuenciaron un total de 319 clones correspondientes a las 10 muestras de los pacientes seleccionados, con un promedio de 31,9 clones por paciente.

4.7.4 *Mutaciones minoritarias de resistencia a inhibidores de la proteasa NS3*

En Anexo XIV se muestran los alineamientos de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuenciación de clones de la región proteasa NS3, mostrando únicamente las posiciones relacionadas con mutaciones de resistencia. Observamos que las mutaciones detectadas por secuenciación directa están presentes en todos los clones moleculares analizados para cada uno de los 10 aislados (Anexo XIII Tabla 4). Además, para varios aislados encontramos algunas nuevas variaciones minoritarias en algunos clones, no detectadas por la secuenciación estándar (detalladas en la tabla 22).

Se encontraron resistencias a IP en variantes minoritarias en ocho aislados: **V36L** en dos aislados (3/32 y 1/44 clones, resistencia a TPV, BOC y VPV), **V55A** en un aislado (1/41 clones, S122G resistencia a SMV), **Q80H** en un aislado (1/36 clones, resistencia a TPV, BOC, SMV, ASV, DNV, VPV y SOV), **A87T** en un aislado (1/41 clones, resistencia a TPV, BOC, y SOV), **R109K** en un aislado (1/32 clones, resistencia a TPV y BOC), **S122G/N/T** en tres aislados (1/30, 1/32 y 1/42 clones, S122G resistencia a SMV), y **V158M** en un aislado (1/32 clones, resistencia a BOC).

Además, se encontraron otras variantes minoritarias como polimorfismos con efecto desconocido en posiciones asociadas a resistencia a IP en cinco aislados: **D79N** (1/32 clones), **A87V** (1/30 clones), y **Y105F** (2/30 clones) en un aislado cada una, y **V170I** en dos aislados (1/30 y 1/44 clones, respectivamente).

No se apreciaron diferencias evidentes entre los aislados del VHC de pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos.

Estos resultados sugieren que, en algunos pacientes nunca tratados con AAD infectados por el subtipo 1b del VHC (tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos) existen poblaciones minoritarias del virus con mutaciones de resistencia a IP, así como con polimorfismos con efecto desconocido.

Aislamientos	429_66 (IC)		304_206 (IC)		859_207 (IC)		575_210 (IC)		865_211 (IC)	
	SANGER	Clones (n=30)	SANGER	Clones (n=30)	SANGER	Clones (n=35)	SANGER	Clones (n=32)	SANGER	Clones (n=44)
V36A/M/L/G/I/C	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (90,63) L (9,38)	V	V (97,73) L (2,27)
A39V	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
V55A/F/I/K/T	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
D79E	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)
Q80K/L/N/R/H/G	Q	Q (97,23) H (2,77)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)
A87T	A	A (100)	A	A (96,67) V (3,33)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
Y105C	Y	Y (100)	Y	Y (93,33) F (6,67)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
R109K	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
R117H	H	H (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
S122G/A/R/N/T	S	S (100)	S	S (96,67) G (3,33)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
V158I/M	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
V170A/T/G/L/M	V	V (97,23) I (2,77)	I	I (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (97,73) I (2,27)

Aislamientos	146_178 (ID)		482_194 (ID)		186_197 (ID)		373_200 (ID)		610_220 (ID)	
	SANGER	Clones (n=32)	SANGER	Clones (n=31)	SANGER	Clones (n=41)	SANGER	Clones (n=42)	SANGER	Clones (n=32)
V36A/M/L/G/I/C	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
A39V	A	A (100)	S	S (96,77) A (3,23)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
V55A/F/I/K/T	V	V (100)	V	V (100)	V	V (97,56) A (2,44)	V	V (100)	V	V (100)
D79E	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (96,88) N (3,13)
Q80K/L/N/R/H/G	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)
A87T	A	A (100)	A	A (100)	A	A (97,56) T (2,44)	A	A (100)	A	A (100)
Y105C	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
R109K	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (96,88) K (3,13)
R117H	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
S122G/A/R/N/T	S	S (96,88) N (3,13)	N	N (96,77) S (3,23)	T	T (100)	S	S (97,62) T (2,38)	S	S (100)
V158I/M	V	V (96,88) M (3,13)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
V170A/T/G/L/M	I	I (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	I	I (71,88) V (28,13)

Tabla 22. *Variaciones en las posiciones de la secuencia NS3 del VHC relacionadas con resistencias a diferentes inhibidores de la Proteasa (IP) en clones moleculares de 10 aislados del VHC seleccionados de pacientes inmunocompetente (IC, (n=5) ó trasplantados inmuodeprimidos (ID, n=5). En rojo están marcadas las sustituciones que causan resistencia a algún inhibidor. En negrita se indican variaciones (polimorfismos) cuyo efecto en la resistencia a los inhibidores se desconoce. Se incluye una columna la secuencia directa Sanger de cada aislado.*

4.7.5 *Mutaciones minoritarias de resistencia a inhibidores de la polimerasa NS5B*

Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuenciación de clones moleculares de la región NS5B se muestran en Anexo XIII, mostrando únicamente las posiciones relacionadas con resistencias. Como en el caso de la proteasa NS3, observamos que, mientras las mutaciones detectadas por secuenciación directa están presentes en todos los clones analizados (Anexo XIII Tabla 5), encontramos variantes minoritarias con resistencia a IAN ó INN en clones de varios aislados (detalladas en la tabla 23).

Sólo se encontró, en un único aislado una variante minoritaria de resistencia a IAN (**S282R**) y un polimorfismo con efecto desconocido (A15V), pero en clones distintos y en ambos casos con un frecuencia de 1/34.

Sin embargo, se encontraron variantes minoritarias de resistencia a INN en seis aislados: **M71V** en un aislado (1/32 clones), **A300T** en un aislado (1/30 clones), **A442T** en dos aislados (6/31 y 1/34 clones, respectivamente), **I462T** en un aislado (1/32 clones), **R531K** en tres aislados (1/30, 11/31 y 12/31 clones, respectivamente), y **S556G** en dos aislados (1/33 y 3/34 clones, respectivamente).

Además, en cinco aislados se encontraron variantes minoritarias con polimorfismos de efecto desconocido: **T19R** ó **M426L** (5/30 y 1/30 clones, respectivamente); **L314P**, **C451Y** ó **A486S** (1/31, 1/31 y 4/31 clones respectivamente); **T19N**, **D55Y** ó **A300V** (2/30, 1/30 y 1/30 clones, respectivamente); **K50Q** (1/32 clones); y **H95L** ó **C451S** (1/33 clones en ambas).

Aunque se detectaron aproximadamente el mismo número de variantes minoritarias en pacientes inmunocompetentes que en pacientes trasplantados inmunodeprimidos, la mayoría de las asociadas a resistencia a IAN e INN se concentraron en los aislados de pacientes inmunodeprimidos.

Estos resultados sugieren que, en pacientes no tratados infectados por el subtipo 1b del VHC (tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos), las variantes minoritarias del virus con mutaciones de resistencia a IAN son escasas, mientras aquellas con mutaciones de resistencia INN, así como con polimorfismos con efecto desconocido, son relativamente frecuentes.

Aislamientos		429_66 (IC)		304_206 (IC)		859_207 (IC)		575_210 (IC)		865_211 (IC)	
NS5b	Posiciones aa	SANGER	Clones (n=30)	SANGER	Clones (n=36)	SANGER	Clones (n=31)	SANGER	Clones (n=31)	SANGER	Clones (n=30)
IAN	A15G	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
IAN	L159F	L	L (100)	F	F (100)	F	F (100)	L	L (100)	L	L (100)
IAN	S282T/R	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
INN	T19S/P	S	S (96,67) R (3,33)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (93,33) N (6,67)
INN	K50R	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)
INN	D55E	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (96,67) Y (3,33)
INN	M71V	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	H95Q/R	H	H (100)	H	H (100)	H	H (100)	H	H (100)	H	H (100)
INN	I38I	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	V	V (100)	I	I (100)
INN	A300T	T	T (86,67) A (13,33)	S	S (100)	S	S (100)	T	T (100)	A	A (93,33) V (3,33) T (3,33)
INN	L314F	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (96,77) P (3,23)	L	L (100)
INN	C316Y/F/N/S	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	C	C (100)	N	N (100)
INN	A338V	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	L392I	L	L (100)	L	L (100)	F	F (100)	L	L (100)	L	L (100)
INN	I424V	I	I (100)	I	I (100)	V	V (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	M426T/V/I	M	M (83,33) L (16,67)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	A442T	A	A (100)	T	T (86,11) A (13,89)	A	A (100)	A	A (80,65) T (19,35)	T	T (96,67) A (3,33)
INN	C451R	C	C (100)	C	C (100)	Y	Y (100)	C	C (96,77) Y (3,23)	C	C (100)
INN	I462T	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	A486V/I/T/M	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (87,1) S (12,9)	A	A (100)
INN	V499A	V	V (100)	V	V (100)	A	A (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	R531K	K	K (83,33) R (16,67)	R	R (100)	K	K (100)	R	R (64,52) K (35,48)	R	R (96,67) K (3,33)
INN	S556G/N/C	G	G (86,67) S (13,33)	G	G (97,22) S (2,78)	G	G (100)	S	S (100)	S	S (100)

	Aislamientos NS5b Posiciones aa	146_178 (ID)		482_194 (ID)		186_197 (ID)		373_200 (ID)		610_220 (ID)	
		SANGER	Clones (n=31)	SANGER	Clones (n=32)	SANGER	Clones (n=31)	SANGER	Clones (n=33)	SANGER	Clones (n=34)
IAN	A15G	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (97,06) V (2,94)
IAN	L159F	L	L (100)	F	F (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
IAN	S282T/R	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (97,06) R (2,94)
INN	T19S/P	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
INN	K50R	K	K (100)	K	K (96,88) Q (3,13)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)
INN	D55E	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)
INN	M71V	M	M (100)	M	M (96,88) V (3,13)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	H95Q/R	H	H (100)	H	H (100)	H	H (100)	H	H (96,97) L (3,03)	H	H (100)
INN	138I	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	A300T	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	A	A (100)	T	T (100)
INN	L314F	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
INN	C316Y/F/N/S	C	C (100)	N	N (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)
INN	A338V	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	L392I	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
INN	I424V	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	M426T/V/I	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	A442T	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (97,06) T (2,94)
INN	C451R	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (96,97) S (3,03)	H	H (100)
INN	I462T	I	I (100)	I	I (96,88) T (3,13)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	A486V/I/T/M	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
INN	V499A	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	R531K	R	R (100)	K	K (100)	R	R (61,29) K (38,71)	R	R (100)	R	R (100)
INN	S556G/N/C	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (96,67) G (3,03)	S	S (91,18) G (8,82)

Tabla 23. *Variaciones en las posiciones de la secuencia NS5B del VHC, relacionadas con resistencias a análogos de nucleótidos (IAN) e inhibidores no nucleosídicos (NNI) en clones moleculares de 10 aislados del VHC seleccionados de pacientes inmunocompetentes (IC, n=5) ó trasplantados inmunodeprimidos (ID, n=5). En rojo están marcadas las sustituciones que causan resistencia a algún inhibidor. En negrita se indican variaciones (polimorfismos) cuyo efecto en la resistencia a los inhibidores se desconoce. Se incluye una columna la secuencia directa Sanger de cada aislado.*

4.7.6 Análisis de codones y barrera genética en la “cuasiespecie” de las regiones NS3 y NS5B

Con el análisis de codones en las posiciones asociadas a mutaciones del VHC descritas en la bibliografía como causantes de resistencia a IP, IAN e INN en las secuencias obtenidas por clonación, pudimos determinar que sustituciones de nucleótido ocurren en los codones con resistencias minoritarias en cada aislado. El análisis se muestra con detalle en el Anexo XV, tablas 6 y 7.

Todas las variantes minoritarias con resistencia a IP encontradas mostraban un sólo cambio de nucleótido en el codón: **V36L** GTC (V) → **CTC** (L) (aislados 575_210 y 865_211), **V55A** GTC (V) → **GCC** (A) (aislado 186_197), **Q80H** CAG (Q) → **CAC** (H) y **A87T** GCG (A) → **ACG** (T) (aislado 186_197), **R109K** AGG (R) → **AAG** (K) (aislado 610_220), **S122T** AGC (S) → **ACC** (T) (aislado 373_200) ó AGC (S) → **AAC** (N) (aislado 146_178) ó AGC (S) → **GGC** (G) (aislado 304_206), y **V158M** GTG (V) → **ATG** (M) (aislado 146_178).

Estos resultados sugieren que la presencia de variantes minoritarias de resistencia a IP encontradas son debidas a una baja barrera genética, ya que se observó sólo una sustitución de nucleótido para el cambio de aminoácido que genera resistencia.

Con respecto al análisis de codones efectuado en la región NS5B, la única variante minoritaria de resistencia a IAN, mostró un sólo cambio de nucleótido: **S282R** AGC (S) → **AGA** (R) (aislado 610_220).

Todas las variantes minoritarias con resistencia a INN también mostraron un sólo cambio de un nucleótido: **M71V** ATG (M) → **GTG** (V) (aislado 482_194), **A300T** GCT (A) → **ACT** (T) (aislado 865_211), **A442T** GCC (A) → **ACC** (T) (aislados 575_210 y 610_220), **462T** ATC (I) → **ACC** (T) (aislado 482_194), **R531K** AGG (R) → **AAG** (K) (aislados 186_197, 575_210, y 865_211), y **S556G** AGC (S) → **GGC** (G) en el aislado 610_220.

Estos resultados sugieren que las variantes minoritarias de resistencia a IAN ó INN encontradas son debidas a una baja barrera genética para el desarrollo de resistencia a IAN e INN, ya que se observó que sólo una sustitución de nucleótido da como resultado el cambio de aminoácido que genera resistencia.

4.8 Análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismo

Los virus, como otros microorganismos muestran en poblaciones naturales polimorfismos naturales en sus secuencias genómicas. Tales polimorfismos son mantenidos por distintas fuerzas evolutivas como la recombinación, selección natural, la mutación ó la deriva genética. Para conocer el nivel de polimorfismo de los aislados del VHC analizados se midió la heterogeneidad genética de las regiones NS3 proteasa y NS5B mediante el cálculo de diferentes parámetros (descritos en el apartado 3.11), a dos niveles: entre aislados de distintos pacientes infectados y entre distintas variantes del mismo aislado dentro de cada uno de los 10 pacientes seleccionados para el subestudio de “cuasiespecies”.

4.8.1 Análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismo (entre aislados de distintos individuos)

Se calcularon las estimas principales de variabilidad genética en los 60 aislados analizados se obtuvieron utilizando el *software* DnaSPv5 (Librado y Rozas 2009), para cada grupo y subgrupo de pacientes, y para cada una de las regiones NS3 (proteasa) y NS5B por separado, adaptando análisis anteriores realizados en otras regiones del virus (Jiménez-Hernández 2005). Los resultados se resumen en la tabla 24, donde se muestran los valores de los parámetros S (número de sitios segregantes) θ (variación genética por nucleótido) k (diferencia nucleotídica) \mathbf{Eta} (número de mutaciones) π (diversidad nucleotídica) \mathbf{nHap} (número de haplotipos) \mathbf{Hd} (diversidad haplotípica) $\mathbf{G+C}$ (contenido en Guanina-Citosina) \mathbf{d} (distancia genética) frecuencia de transiciones, transversiones y sustituciones. También se calculó la razón entre la tasa de sustitución no sinónima/tasa de sustitución sinónima: dN/dS . Esta relación determina el grado de selección natural. En general, $dN/dS > 1$ indica selección positiva mientras que valores menores a 1 indican presión de selección negativa ó purificadora.

	Hospital La Fe			HUGTIP		Total pacientes N=60
	ICV	IDV	ICV+IDV	ICB	Todos IC	
	N=13	N=21	N=34	N=26	N=39	
NS3						
S	154	190	213	188	209	234
Θ	0,091	0,097	0,095	0,090	0,090	0,092
k	46,436	49,562	48,332	49,209	48,694	49,013
Eta	175	222	267	239	279	323
Pi (π)	0,085	0,091	0,088	0,090	0,089	0,089
nHap	13	20	33	26	39	59
Hd	1	1	1	1	1	1
G+C	0,625	0,626	0,626	0,624	0,625	0,625
d	0,115	0,128	0,123	0,124	0,123	0,124
d N	0,017	0,022	0,020	0,019	0,019	0,02
d S	0,268	0,281	0,276	0,2685	0,281	0,281
dN/dS	0,063	0,078	0,072	0,071	0,067	0,071
transiciones	138	176	197	182	200	221
transversiones	37	46	70	57	79	102
sustituciones	175	222	267	239	279	323
NS5B						
n	13	21	34	26	39	60
S	350	463	527	488	548	618
Θ	0,064	0,072	0,073	0,072	0,073	0,075
k	101,141	108,786	106,462	105,837	105,414	107,088
Eta	380	515	605	569	661	776
Pi (π)	0,057	0,061	0,060	0,059	0,059	0,060
nHap	13	21	34	26	39	60
Hd	1	1	1	1	1	1
G+C	0,553	0,554	0,554	0,555	0,554	0,554
d	0,068	0,075	0,073	0,072	0,071	0,073
d N	0,017	0,017	0,017	0,018	0,018	0,018
d S	0,156	0,172	0,166	0,162	0,163	0,167
dN/dS	0,109	0,099	0,102	0,111	0,110	0,108
transiciones	315	420	478	437	498	577
transversiones	65	95	127	132	163	199
sustituciones	380	515	605	569	661	776

Tabla 24. *Parámetros de diversidad nucleotídica del VHC correspondientes a la región NS3 (proteasa) y NS5B, en los distintos grupos de pacientes de los 60 aislados.*

Pudimos observar que, en general, los parámetros de heterogeneidad nucleotídica del VHC en la región de la NS3 proteasa son similares entre los distintos grupos de pacientes, y la relación dN/dS fue < 1 , del orden de $< 0,1$ en todos los grupos de pacientes, resultado que sugiere selección negativa ó purificadora a lo largo de la proteasa en todo los grupos de pacientes, probablemente debido a limitaciones funcionales para la fijación de mutaciones.

En el caso de la región NS5B, la situación fue muy similar a la de la proteasa NS3, todos los valores de los parámetros de heterogeneidad genética son similares para cada grupo y subgrupo de pacientes. La relación dN/dS también fue < 1 a lo largo de la polimerasa en todos los grupos de pacientes, en el orden de 0,1, lo que también sugiere selección negativa ó purificadora.

Finalmente observamos que los valores de la diversidad nucleotídica (Pi (π)), la cual expresa la probabilidad de encontrar sitios nucleotídicos diferentes entre secuencias de la misma población, es algo mayor para la región de la proteasa NS3 (0,09) que para la polimerasa NS5B (0,06), y los valores de la diversidad haplotípica, expresada como la probabilidad de encontrar dos haplotipos diferentes en la muestra, son iguales a 1 tanto para la proteasa NS3 como para la región NS5B. Así pues, estos resultados sugieren que hay una variabilidad/heterogeneidad genética nucleotídica notable (todos los haplotipos son distintos), y similar entre los aislados correspondientes a cada grupo y subgrupo de pacientes.

Para determinar si las regiones de la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B siguen un modelo neutral de selección (acumulación al azar de mutaciones debido al proceso de replicación del virus), así como la posible influencia de la inmunosupresión, se infirieron estimas de la acción de la selección natural sobre la variación genética en cada región, utilizando las pruebas de Tajima, Fu y Li, y de Fu, para determinar los estadísticos D , D^* y F^* , y F_s , respectivamente.

Entre las desviaciones del modelo neutral, podemos distinguir la selección estabilizadora (mantiene varios alelos a frecuencias intermedias junto a mutaciones neutras ligadas a ellas) y la direccional, bien por arrastre selectivo (cuando surge una mutación ventajosa se selecciona positivamente, junta a alguna mutación neutra preexistente, favoreciendo el exceso de polimorfismos únicos); ó bien por selección de fondo (produce un efecto similar a la anterior, pero se eliminan tanto mutaciones deletéreas como las neutras asociadas) (Jiménez-Hernández 2005). Para la selección estabilizadora los valores de los estadísticos D , D^* y F^* , y F_s , serían positivos, significativamente mayores de 0; mientras que para la selección direccional los valores serían negativos,

significativamente menores de 0. Los resultados de las pruebas de neutralidad en los distintos grupos de pacientes se muestran en la Tabla 25.

			$D^{(1)}$	$D^{* (1)}$	$F^{* (1)}$	$F_S^{(1)}$
NS3	Hospital La Fe	ICV	-0,809	-0,608	-0,759	-1,307
		IDV	-0,810	-0,655	-0,822	-1,963
		ICV+IDV	-0,990	-0,985	-1,173	-7,053
	HUGTIP	ICB	-0,850	-0,494	-0,719	-5,687
	Total IC		-0,981	-0,966	-1,158	-12,3
	Total pacientes		-1,039	-1,175	-1,345	-23,13
NS5B	Hospital La Fe	ICV	-0,802	-0,738	-0,866	-0,094
		IDV	-0,994	-0,757	-0,972	-1,643
		ICV+IDV	-1,075	-1,056	-1,263	-4,782
	HUGTIP	ICB	-1,158	-1,131	-1,344	-2,791
	Total IC	IC	-1,226	-1,329	-1,54	-6,3
	Total pacientes		-1,275	-1,494	-1,688	-14,11

(1) $P > 0,10$

Tabla 25. *Análisis de neutralidad para las regiones NS3 (proteasa) y NS5B de los 60 aislados.* ICV: Inmunocompetentes Valencia, IDV: Inmunodeprimidos Valencia, ICB: Inmunocompetentes Badalona, IC: Inmunocompetentes D: estadístico de la prueba de Tajima, D^* y F^* : estadísticos de la prueba de Fu y Li, F_S : estadístico de la prueba de Fu.

Todos los valores fueron no significativos: $0.10 > P > 0.05$

Tanto en la región de la proteasa NS3 como en la región NS5B encontramos que, independientemente del grupo ó subgrupo de pacientes, los valores de los estadísticos D , D^* , F^* y F_S de Fu fueron menores que 0, pero no estadísticamente significativos ($p > 0,10$). Por tanto, no podemos afirmar con certeza que los valores negativos en los estadísticos de pruebas de neutralidad reflejen la presencia de selección direccional.

Para analizar si existían posibles diferencias en la estructura genética interpoblacional entre los aislados de pacientes de las dos zonas geográficas (Valencia y Badalona), así como entre los de pacientes inmunocompetentes y pacientes inmunodeprimidos (trasplantados hepáticos), se estudiaron las variancias génicas de las distintas poblaciones mediante análisis molecular de la varianza (AMOVA). Este análisis realiza estimas de los componentes de la varianza génica y el estadístico F (F_{ST} : diferenciación entre poblaciones y subpoblaciones), llevando a cabo una evaluación de su significación estadística (Excoffier 1992). Los resultados del AMOVA se muestran en la tabla 26.

Para la proteasa NS3, se encontraron diferencias significativas en la variación génica solamente al comparar el conjunto de los aislados de Valencia (ICV+IDV) con los de Badalona (ICB), y al comparar los aislados de pacientes inmunocompetentes de ambas ciudades (ICB vs. ICV). Sin embargo, para la polimerasa NS5B se encontraron diferencias significativas entre los aislados del conjunto de pacientes inmunocompetentes (ICV+ICB) y los de inmunodeprimidos (IDV), entre el conjunto de los aislados de Valencia (ICV+IDV) y los de Badalona (ICB), y entre los aislados de pacientes inmunocompetentes de ambas ciudades (ICB vs. ICV). No se encontraron diferencias significativas entre los aislados de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos de Valencia (ICV vs. IDV).

Parece plausible que las diferencias significativas observadas para NS5B pero no para NS3 se deban a los aislados de los pacientes de Badalona, en los que se detecta una estructura poblacional diferencial en NS5B en cualquiera de las comparaciones en las que intervienen, pero para NS3 sólo al compararlos con los aislados de Valencia del mismo tipo de pacientes inmunocompetentes.

Estos resultados sugieren: i) que existe una varianza génica diferencial a nivel geográfico entre los aislados del VHC de Valencia y Badalona, tanto para la proteasa NS3 como para NS5B; ii) esta varianza génica diferencial es más evidente al analizar NS5B; y iii) en la misma área geográfica (Valencia) no existe una varianza génica diferencial entre aislados de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos (trasplantados hepáticos).

	Fuente de variación	Grados Libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	F
NS3	Entre grupos de pacientes (IC-ID)	1	25.085	0.02155 Va	0.09	0.0008 ^{ns}
	Dentro de grupos	58	1420.799	24.49653 Vb	99.91	
	Total	59	1445.883	24.518070		
	Entre grupos de pacientes (V-B)	1	33.297	0.30348 Va	1.23	0.0123*
	Dentro de grupos	58	1412.586	24.35493 Vb	98.77	
	Total	59	1445.883	24.658410		
	Entre grupos de pacientes (ICB-IDV)	1	29.266	0.19724 Va	0.79	0.0079 ^{ns}
	Dentro de grupos	45	1110.734	24.68299 Vb	99.21	
	Total	46	1140.000	24.880220		
	Entre grupos de pacientes (ICB_ICV)	1	31.449	0.42080 Va	1.71	0.0171*
	Dentro de grupos	37	893.731	24.15489 Vb	98.29	
	Total	38	925.179	24.575680		
	Entre grupos de pacientes (ICV_IDV)	1	23.236	-0.05970 Va	-0.25	-0.0025 ^{ns}
	Dentro de grupos	32	774.234	24.19483 Vb	100.25	
	Total	33	797.471	24.135130		
NS5B	Entre grupos de pacientes (IC-ID)	1	68.388	0.55309 Va	1.03	0.0103*
	Dentro de grupos	58	3090.729	53.28843 Vb	98.97	
	Total	59	3159.117	5.384152		
	Entre grupos de pacientes (V-B)	1	79.537	0.89733 Va	1.66	0.0166***
	Dentro de grupos	58	3079.579	53.09619 Vb	98.34	
	Total	59	3159.117	5.399352		
	Entre grupos de pacientes (ICB-IDV)	1	75.160	0.92908 Va	1.70	0.0170***
	Dentro de grupos	45	2410.819	53.57375 Vb	98.30	
	Total	46	2485.979	5.450283		
	Entre grupos de pacientes (ICB_ICV)	1	73.064	1.20618 Va	2.26	0.0226**
	Dentro de grupos	37	1929.808	52.15696 Vb	97.74	
	Total	38	2002.872	5.336315		
	Entre grupos de pacientes (ICV_IDV)	1	61.914	0.55763 Va	1.04	0.0104 ^{ns}
	Dentro de grupos	32	1694.703	52.95948 Vb	98.96	
	Total	33	1756.618	5.351711		

F: Estadístico F, * P < 0,05, **: P < 0,01, ***: P < 0,001, ns: No significativo

Tabla 26. *AMOVA para las regiones NS3 (proteasa) y NS5B. Comparación de aislados de Inmunocompetentes vs Inmunodeprimidos (IC-ID), Valencia vs Badalona (V-B). Inmunocompetentes Badalona vs Inmunodeprimidos Valencia (ICB-IDV), Inmunocompetentes Badalona vs Inmunocompetentes Valencia (ICB-ICV), Inmunocompetentes Valencia vs Inmunodeprimidos Valencia (ICV-IDV). Estadístico F (F_{ST}: diferenciación entre poblaciones o subpoblaciones).*

4.8.2 Análisis de la heterogeneidad genética y polimorfismo de la “cuasiespecie” (intra individuos)

Se realizó un análisis de clones moleculares de los aislados de 10 pacientes seleccionados (5 pacientes inmunocompetentes y 5 pacientes inmunodeprimidos por trasplante hepático), con el objetivo de determinar la heterogeneidad genética y nivel de polimorfismos a nivel de las variantes genéticas del virus presentes en cada paciente individual (“cuasiespecie”), así como el potencial efecto de la inmunosupresión.

Los parámetros de heterogeneidad genética para todos los clones moleculares correspondientes de cada aislado, se calcularon para cada una de las regiones NS3 (proteasa) y NS5B, por separado. El resumen de los resultados se muestra en la tabla 27, donde se muestran los valores de: **S** (número de sitios segregantes) **θ** (variación genética por nucleótido) **k** (diferencia nucleotídica) **Eta** (número de mutaciones) **π** (diversidad nucleotídica) **nHap** (número de haplotipos) **Hd** (diversidad haplotípica) **G+C** (contenido en Guanina-Citosina) **d** distancia genética, la frecuencia de transiciones, transversiones, sustituciones y la relación **dN/dS** (grado de selección natural).

También se evaluó la complejidad de la “cuasiespecie” mediante el parámetro de Entropía normalizada de Shannon (**Sn**) a nivel nucleotídico (Wolinsky *et al.* 1996). Este parámetro estima la cantidad de variantes virales identificadas en una misma muestra y toma valores en un rango entre 0 (cuando todos los genomas de la muestra son iguales) y 1 (cuando los genomas de la muestra son diferentes entre sí).

Tanto para la proteasa NS3 como para la polimerasa NS5B, la relación **dN/dS** fue < 1 y ésta pareció inferior en pacientes inmunocompetentes para la proteasa NS3. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($P=0.111$). Los valores de **Sn** para la proteasa NS3 parecieron inferior en pacientes inmunocompetentes tanto para la proteasa NS3 como para la polimerasa NS5B, sin embargo estas diferencias tampoco fueron significativas ($P=0,095$ y $P=0,039$, respectivamente). El resto de variables de heterogeneidad

	ICV		IDV	p
	N=5		N=5	
NS3	n	35,4 ± 5,37	35,6 ± 5,41	>0,999
	S	48,2 ± 14,65	53,8 ± 16,54	0,690
	θ	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,690
	k	7,69 ± 5,25	5,03 ± 2,44	0,547
	Eta	49,2 ± 14,5	54,8 ± 16,44	0,690
	nHap	19,4 ± 7,5	24,4 ± 3,65	0,333
	Hd	0,84 ± 0,17	0,92 ± 0,05	0,436
	Pi (π)	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,004	0,547
	G+C	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,690
	d	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,627
	d N	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,001	0,516
	d S	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,413
	dN/dS	0,05 ± 0,04	0,13 ± 0,08	0,111
	Sn	0,59 ± 0,21	0,8 ± 0,1	0,095
	transiciones	43 ± 13,32	49,8 ± 14,48	0,547
	transversiones	6,2 ± 2,28	5 ± 2,35	0,222
	sustituciones	49,2 ± 14,5	54,8 ± 16,44	0,690
	NS5B	n	31,6 ± 2,51	32,2 ± 1,3
S		96,2 ± 57,55	110,6 ± 62,95	0,690
θ		0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,841
k		23,93 ± 17,26	17,27 ± 10,39	0,690
Eta		98,4 ± 59,54	111,2 ± 63,55	0,841
nHap		30,8 ± 2,39	29,6 ± 6,07	0,500
Hd		1 ± 0,002	0,99 ± 0,03	0,921
Pi (π)		0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,690
G+C		0,55 ± 0,002	0,56 ± 0,004	0,151
d		0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,595
d N		0,003 ± 0,002	0,002 ± 0,001	0,992
d S		0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,690
dN/dS		0,09 ± 0,04	0,12 ± 0,07	0,841
Sn		0,98 ± 0,01	0,96 ± 0,09	0,309
transiciones		81,6 ± 51,89	99 ± 58,56	0,690
transversiones		14,8 ± 7,4	12,2 ± 7,92	0,508
sustituciones		96,4 ± 59,14	111,2 ± 63,55	0,841

Tabla 27. *Parámetros de complejidad y diversidad genética del VHC correspondientes a la región NS3 (proteasa) y NS5B, de las poblaciones virales de pacientes Inmunocompetentes (IC) e Inmunodeprimidos (ID). Los valores se describen como Media ± DE, p: U-Mann-Whitney En negrita se destacan las diferencias observadas, aunque no significativas.*

genética de las “cuasiespecies” del VHC fueron similares entre los aislados de pacientes inmunocompetentes y los de pacientes inmunodeprimidos para ambas regiones estudiadas (proteasa NS3 y NS5B) ($p > 0,05$).

Aunque los resultados podrían sugerir, para la región NS3 proteasa, un mayor grado de selección purificadora, una mayor presión selectiva y menor complejidad genética de la “cuasiespecie” en los aislados de pacientes inmunocompetentes, las diferencias no fueron significativas, seguramente debido al pequeño tamaño muestral.

Para obtener otras estimas de selección y contrastar la neutralidad (hipótesis neutra), también se realizaron las pruebas de Tajima (1989), la prueba Fu y Li (1993), y la prueba de Fu (1997) a partir del conjunto de secuencias de los clones moleculares aislados de cada paciente (Tabla 28). Para la región de la proteasa NS3 encontramos todos los valores de D de Tajima, D^* , F^* , y F_s de Fu negativos (menores de 0) en los aislados todos los pacientes analizados excepto uno (575_210, inmunocompetente) en el que, aunque la D de Tajima fue negativa, la D^* , F^* , y F_s de Fu fueron positivas. Se alcanzó significación estadística para D , D^* y F^* en los aislados de solamente 2/5 pacientes inmunocompetentes (304_206 y 865_211), en comparación con 4/5 de los aislados de pacientes inmunodeprimidos.

En cuanto a la región NS5B, la situación difiere con respecto a la proteasa NS3. Encontramos que todos los valores de D de Tajima, D^* , F^* , y F_s de Fu eran negativos (menores de 0) sólo para los aislados de 2/5 de pacientes inmunocompetentes, mientras que para los de otros dos (304_206 y 575_210) sólo fueron negativos los valores de D^* . En cambio, todos los valores de D de Tajima, D^* , F^* , y F_s de Fu eran negativos (menores de 0) para todos los aislados de pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, solamente se alcanzó significación estadística para D , D^* y F^* en los aislados de un paciente inmunocompetente (865_211) y de un paciente inmunodeprimido (482_194).

	<i>Aislado</i>	<i>D</i>	<i>D*</i>	<i>F*</i>	<i>F_s</i>	
NS3	IC	429_066	-1,276	-0,178	-0,648	-0,967
		304_206	-2,019 *	-3,240 **	-3,351 **	-18,377
		859_207	-1,109	-0,617	-0,929	-18,550
		575_210	-0,195	0,628	0,415	3,236
		865_211	-2,489 **	-3,601 **	-3,816 **	-5,462
		ID	146_178	-2,448 **	-3,871 **	-4,017 **
			482_194	-2,437 **	-3,181 *	-3,468 **
			186_197	-2,658 ***	-5,068 **	-5,022 **
			373_200	-2,219 **	-2,691 *	-3,004 *
			610_220	-1,756	-1,124	-1,581
NS5B	IC	429_066	0,639	0,542	0,679	-10,416
		304_206	0,979	-0,086	0,331	-20,484
		859_207	-0,141	-1,588	-1,319	-26,682
		575_210	0,448	-0,095	0,105	-5,561
		865_211	-2,054 *	-2,875 *	-3,077 *	-19,398
		ID	146_178	-0,027	-0,261	-0,218
			482_194	-2,194 **	-3,554 **	-3,666 **
			186_197	-1,476	-2,009	-2,167
			373_200	-0,983	-1,582	-1,633
			610_220	-1,561	-2,383	-2,493

Tabla 28. *Análisis de neutralidad para las regiones NS3 (proteasa) y NS5B de los clones moleculares*. IC: Inmunocompetentes, ID: Inmunodeprimidos. *D*: estadístico de la prueba de Tajima, *D** y *F**: estadísticos de la prueba de Fu y Li, *F_s*: estadístico de la prueba de Fu. Se destacan las diferencias significativas observadas. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.02$; (***) $P < 0.001$. Los demás valores no son significativos: $0.10 > P > 0.05$.

Estos resultados sugieren una desviación del modelo neutral para la proteasa NS3, que se hace más significativa en presencia de inmunosupresión, mientras que, en condiciones normales, el gen NS5B parece más cercano al modelo neutral (pocos aislados de pacientes inmunocompetentes con valores negativos de *D*, *D**, *F**, y *F_s*). Aunque el efecto de la inmunosupresión podría llevar a NS5B hacia una desviación de la neutralidad (todos los aislados de pacientes inmunodeprimidos con valores negativos de *D*, *D**, *F**, y *F_s*), sólo se alcanzó significación estadística para un aislado de un paciente inmunocompetente y otro de un paciente inmunodeprimido.

En nuestro caso, posiblemente la selección direccional sea la responsable de la variación encontrada, ya que sabemos que la selección direccional, favorece la fijación de mutaciones ventajosas ó eliminación de las deletéreas, produciendo un exceso de mutaciones únicas y variantes con frecuencias muy bajas que conduce a valores significativamente menores de cero para D , D^* y F^* . Podríamos asumir esta hipótesis para los aislados con valores significativos (la mayoría en aislados de pacientes inmunodeprimidos, y sólo para la proteasa NS3), aunque no lo podemos asegurar en los casos en que los valores fueron negativos, pero no fueron significativos.

Para analizar en mayor profundidad las posibles diferencias en la composición genética de la “cuasiespecie” del VHC entre pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos, se estudiaron las variancias génicas para los clones moleculares de cada aislado mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA) en ambas regiones NS3 (proteasa) y NS5B. Este análisis realiza estimas de los componentes de la varianza génica y los estadísticos F (F_{SC} , F_{ST} , F_{CT}), y lleva a cabo una evaluación de su significación estadística (Excoffier 1992). Se realizaron AMOVAs por separado para las regiones NS3 (proteasa) y NS5B, con objeto de determinar posibles diferencias en la estructura genética de la “cuasiespecie” del virus entre grupos de pacientes (inmunocompetentes vs. inmunodeprimidos) (estadístico F_{CT}), diferencias entre los aislados de cada grupo de pacientes (estadístico F_{SC}), y diferencias dentro de cada aislado individual (estadístico F_{ST}). Los resultados se muestran en la tabla 29.

Grupo 1 (Inmunocompetentes) vs Grupo 2 (Inmunodeprimidos)						
	Fuente de variación	Grados Libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	F
NS3	Entre grupos de pacientes	1	665,425	-0,84094 Va	-3,41	-0.034 ^{ns}
	Entre aislados de cada grupo de pacientes	8	6370,622	22,44825 Vb	90,9	0.879*
	Entre clones de cada aislado	345	1065,641	3,08881 Vc	12,51	0.875*
	Total	354	9966,871	24,696120		
NS5B	Entre grupos de pacientes	1	1550,862	0,65302 Va	1,17	0.012 ^{ns}
	Entre aislados de cada grupo de pacientes	8	11529,257	44,89117 Vb	80,44	0.814*
	Entre clones de cada aislado	309	3170,642	10,26098 Vc	18,39	0.816*
	Total	318	16250,762	55,805160		

F: Estadístico F
 * P < 0.001
 ns: No significativo

Tabla 29. *AMOVA para las regiones NS3 (proteasa) y NS5B de los clones moleculares.*

En primer lugar, observamos que no hay diferenciación significativa entre aislados en función de si provienen de pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos. En segundo lugar, se observa que el mayor porcentaje de la variación génica se debe a la diferenciación entre los distintos aislados de cada grupo de pacientes (90,9% y 80,44% para proteasa NS3 y NS5B, respectivamente) y, en menor medida a la diferenciación entre clones moleculares de cada aislado (12,51% y 18,39% para proteasa NS3 y NS5B, respectivamente).

Estos resultados sugieren que, para ambas regiones proteasa NS3 y NS5B, no hay una diferenciación génica diferencial del virus entre pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos, y que la diferenciación génica más significativa ocurre entre aislados dentro de cada grupo de pacientes, y, en menor medida, entre los clones moleculares de cada aislado.

4.9 *Análisis de selección positiva.*

La selección positiva ocurre cuando un cambio aminoacídico puede conferir una ventaja adaptativa mientras que la selección negativa ó purificadora implica que los cambios en esa posición pueden conferir una desventaja. Los resultados del cociente dN/dS y el análisis de selección realizado con las pruebas de Tajima y Fu y Li nos sugirieron la desviación de la neutralidad en algunos casos. Sin embargo, con estas pruebas no se obtiene una resolución a nivel de posiciones aminoacídicas individuales. Se realizó un análisis de selección para identificar posiciones aminoacídicas concretas en las regiones NS3 proteasa y NS5B, y su posible localización en residuos relacionados con resistencias a AAD, tanto a nivel global (entre aislados de distintos individuos) como a nivel de las cuasiespecies del virus en cada individuo (en los diez pacientes seleccionados para el análisis de clones moleculares).

4.9.1 *Entre individuos*

Se empleó el análisis de la aproximación FEL (*Fixed Effects Likelihood*) implementada en el servidor *Datamonkey* (Delpont *et al.* 2010a; 2010b, Kosakovsky-Pond 2005). Con este método los codones bajo selección positiva ó negativa se analizan a lo largo de las ramas de la filogenia, y se estima la relación dN/dS (también conocida como Ka/Ks ó ω) en cada codón en el alineamiento donde $\omega = 1$, indica evolución neutral, <1 selección negativa y >1 selección positiva. Se utilizó el modelo de sustitución *General Time Reversible Model* (REV) con un nivel de significación ($p = 0,1$), basado en un árbol *Neighbor Joining*, considerando que un codón se encontraba bajo selección significativa si $p \leq 0,1$.

En la tabla 30 se detallan los codones bajo selección positiva. En el caso de la región NS3 (proteasa) no se encontraron codones bajo selección positiva, mientras que en la región NS5B se encontraron 12 codones bajo selección positiva.

<i>Codon</i>	<i>dS</i>	<i>dN</i>	<i>dN/dS</i>	<i>dN-dS</i> (normalizada)	<i>p</i>
57	0	0.797	Infinito	0.444	0.0161
110	0	1.079	Infinito	0.602	0.0131
117	0	1.203	Infinito	0.671	0.0113
120	0	4.378	Infinito	2.441	0.0244
124	0	0.784	Infinito	0.437	0.0587
NS5B 213	0.299	1.485	4.963	0.661	0.0612
300	0.405	1.665	4.109	0.702	0.0131
309	0	0.829	Infinito	0.462	0.0602
401	0	0.515	Infinito	0.287	0.0520
556	0	0.716	Infinito	0.399	0.0403
564	0.152	0.819	5.386	0.372	0.0784
566	0.139	0.842	6.045	0.392	0.0421

Tabla 30. *Análisis FEL para la región NS5B. Codones bajo selección positiva. En negrita se destacan los implicados en resistencia a AAD.*

De los 12 codones bajo selección positiva identificados en NS5B, dos posiciones (A300 y S556) están implicadas en resistencia a INN. En el ANEXO XX, tabla 8 y 9 se detallan los codones bajo selección negativa ó purificadora para la proteasa NS3 (160 codones) y NS5B (324 codones).

Los resultados para la proteasa NS3 sugieren en resumen ausencia de selección positiva, y que 22 posiciones asociadas a resistencia se encuentran bajo selección negativa. En cambio, para NS5B hay dos posiciones relacionadas con resistencia a INN bajo selección positiva, mientras que 9 posiciones asociadas a resistencia a IAN y 12 a INN se encuentran bajo selección negativa.

Estos resultados sugieren, tanto para la proteasa NS3 como para la polimerasa NS5B, unas restricciones funcionales relevantes para las mutaciones en diversas posiciones asociadas a resistencias a AAD. Por otro lado, las mutaciones en las dos posiciones relacionadas con resistencia a INN podrían ser seleccionadas por el tratamiento con esta clase de AAD.

4.9.2 *Intra individuos*

Para evaluar evidencias de diversificación de selección episódica a nivel de codón entre las variantes del virus circulantes dentro de cada paciente (“cuasiespecie”), se empleó el modelo de efectos mixtos de diversificación de la selección episódica “MEME” (*Mixed Effects Model of Evolution*) implementado en el servidor *Datamonkey* (Delport *et al.* 2010a; 2010b, Kosakovsky y Frost 2005). Con este método se analizaron los sitios bajo selección a lo largo de las ramas de la filogenia de las secuencias de clones moleculares de 10 aislados del subestudio de “cuasiespecies”, para identificar los casos de selección positiva tanto episódica como generalizada a nivel de un sitio individual (Murrell *et al.* 2012).

En la tabla 31 se resumen los resultados de las tasas de distribución sinónimas (α) y no sinónimas (β) de sitios de sustitución inferida por el modelo MEME, para la región NS3 (proteasa) y NS5B mostrando los codones de los clones moleculares que se encuentran bajo selección episódica. Para ambos análisis de las regiones NS3 (proteasa) y NS5B, se utilizó el modelo de sustitución *General Reversible Model* (REV) para sitios bajo diversificación de selección episódica con nivel de significación ($p = 0,1$), basado en un árbol inicial *Neighbor Joining*, y se consideró que un codón ó sitio se encontraba bajo selección episódica significativa, cuando $p \leq 0,1$.

En la región de la proteasa NS3 se identificaron dos codones bajo selección episódica, en los clones moleculares de los aislados 146_178 (inmunodeprimido) y 865_211 (inmunocompetente), en las posiciones 116 y 171, respectivamente. Estos codones no están implicados en resistencia a IP.

En la región NS5B se identificaron 23 codones bajo selección episódica, de los cuales dos se encuentran implicados en resistencia a INN: el codón M426 en los clones del aislado 429_66 (inmunocompetente), y el codón R531 en los clones del aislado 186_197 (inmunodeprimido).

Estos resultados sugieren que, en las “cuasiespecies” del virus que circulan dentro de cada paciente algunas posiciones relacionadas con resistencias a INN, pueden estar bajo selección episódica, los que las haría más fácilmente seleccionables durante el tratamiento con estos fármacos.

	IC/ID	aislados	Codon	α	β^-	$Pr[\beta=\beta^-]$	β^+	$Pr[\beta=\beta^+]$	p
NS3	IC	429_66	ninguno						
NS5B			21	0	0	0.973	182.918	0.027	0.0290
			23	0	0	0.981	1917.64	0.019	0.0040
			251	0	0	0.000	6.900	1	0.0650
			426	0	0	0.940	439.854	0.060	0.0442
NS3	IC	304_206	ninguno						
NS5B			5	0	0	0.843	98.612	0.157	0.0665
			235	0	0	0.972	251.694	0.027	0.0038
			266	0	0	0.000	13.970	1	0.0927
			353	0	0	0.000	10.799	1	0.0475
NS3	IC	859_207	ninguno						
NS5B			49	0,53	0,05	0.878	817.722	0.122	0.0548
NS3	IC	575_210	ninguno						
NS5B			124	0	0	0.959	485.656	0.040	0.0601
			218	0	0	0.894	81.164	0.105	0.0293
			255	0	0	0.939	370.176	0.061	0.0124
			377	0	0	0.252	3.648	0.748	0.0496
NS3	IC	865_211	171	0	0	0.940	1550.53	0.060	0.0497
NS5B			337	0,53	0,48	0.975	1728.18	0.025	0.0405
NS3	ID	146_178	116	0	0	0.931	78.009	0.068	0.0295
NS5B			65	0	0	0.124	49.619	0.876	0.0739
NS3	ID	482_194	ninguno						
NS5B			364	0	0	0.974	5632.27	0.026	0.0615
NS3	ID	186_197	ninguno						
NS5B			120	0	0	0.981	10000	0.019	0.0093
			531	0	0	0.000	9.769	1	0.0415
NS3	ID	373_200	ninguno						
NS5B			77	0	0	0,000	5.491	1	0.0441
			110	0	0	0.341	11.221	0.659	0.0624
			116	2,91	0	0.979	1866.3	0.021	0.0912
NS3	ID	610_220	ninguno						
NS5B			218	0	0	0.949	685.128	0.051	0.0054
			514	0	0	0.115	17.350	0.885	0.0039

Tabla 31. *MEME. Diversificación de selección episódica, para las regiones N3 (proteasa) y NS5B en la "cuasiespecie" de 10 aislados del VHC de pacientes Inmunocompetentes (IC) e Inmunodeprimidos (ID). En negrita se destacan los implicados en resistencia a AAD.*

4.10 Análisis filogenético

4.10.1 Filogenia inter individuo

Se utilizó la filogenia para determinar si la heterogeneidad genética del virus y/o el perfil de variaciones en sitios asociados a resistencia a AAD se correspondía ó no con algún grupo de secuencias relacionadas entre sí. Este aspecto es especialmente relevante, ya que la identificación de algún grupo filogenético relacionado con un patrón concreto de mutaciones de resistencia a AAD podría tener implicaciones diagnósticas.

Se utilizaron los alineamientos respectivos de las secuencias obtenidas de las regiones NS3 y NS5B de los aislados del VHC de los 60 pacientes junto a secuencias de referencia (representativas de todos los subtipos/genotipos confirmados hasta el momento). La filogenia se realizó bajo el criterio de máxima verosimilitud con el *software* RAxMLv7.2.6 utilizando el modelo GTR (*General Time-Reversible*) de sustitución de nucleótidos, una aproximación de la tasa de heterogeneidad de la distribución gamma y un soporte de *bootstrap* por rama de 1.000 réplicas. En la figura 49 se muestra el árbol filogenético de la región NS3, y en la figura 50 el de la región NS5B de los 60 aislados, junto a las secuencias de referencia. En ambas filogenias observamos que los aislados se agrupan junto con las 11 secuencias de referencia representativas del subtipo 1b del VHC con un elevado nivel de fiabilidad para la región NS3 (*bootstrap* 96%), y para la región NS5B (*bootstrap* 100%), resultados que confirman inequívocamente el subtipo viral.

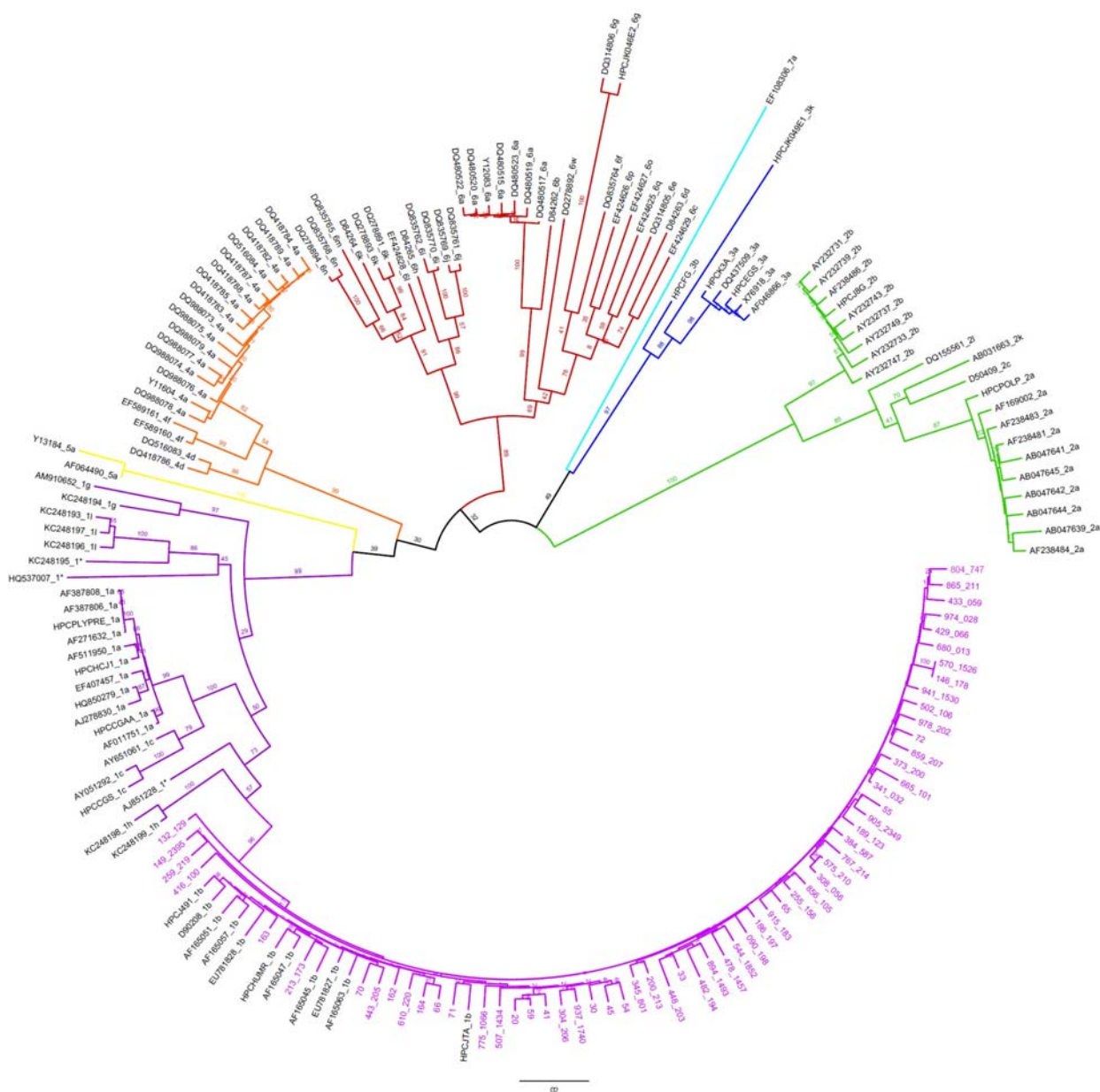


Figura 49. *Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la región NS3 (dominio proteasa) de los 60 aislados analizados junto a secuencias de referencias del VHC. Las secuencias de los aislados del VHC se identifican en color rosa y con el número de muestra. Las secuencias de los genotipos 1-7 en diferentes colores (1a: lila; 1b: rosa, 2: verde; 3: azul; 4: naranja; 5: amarillo; 6: rojo y 7: turquesa). Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,39). Se indican los con un valor de bootstrap >70% (1000 replicados). La escala representa 0,2 sustituciones por posición nucleotídica.*

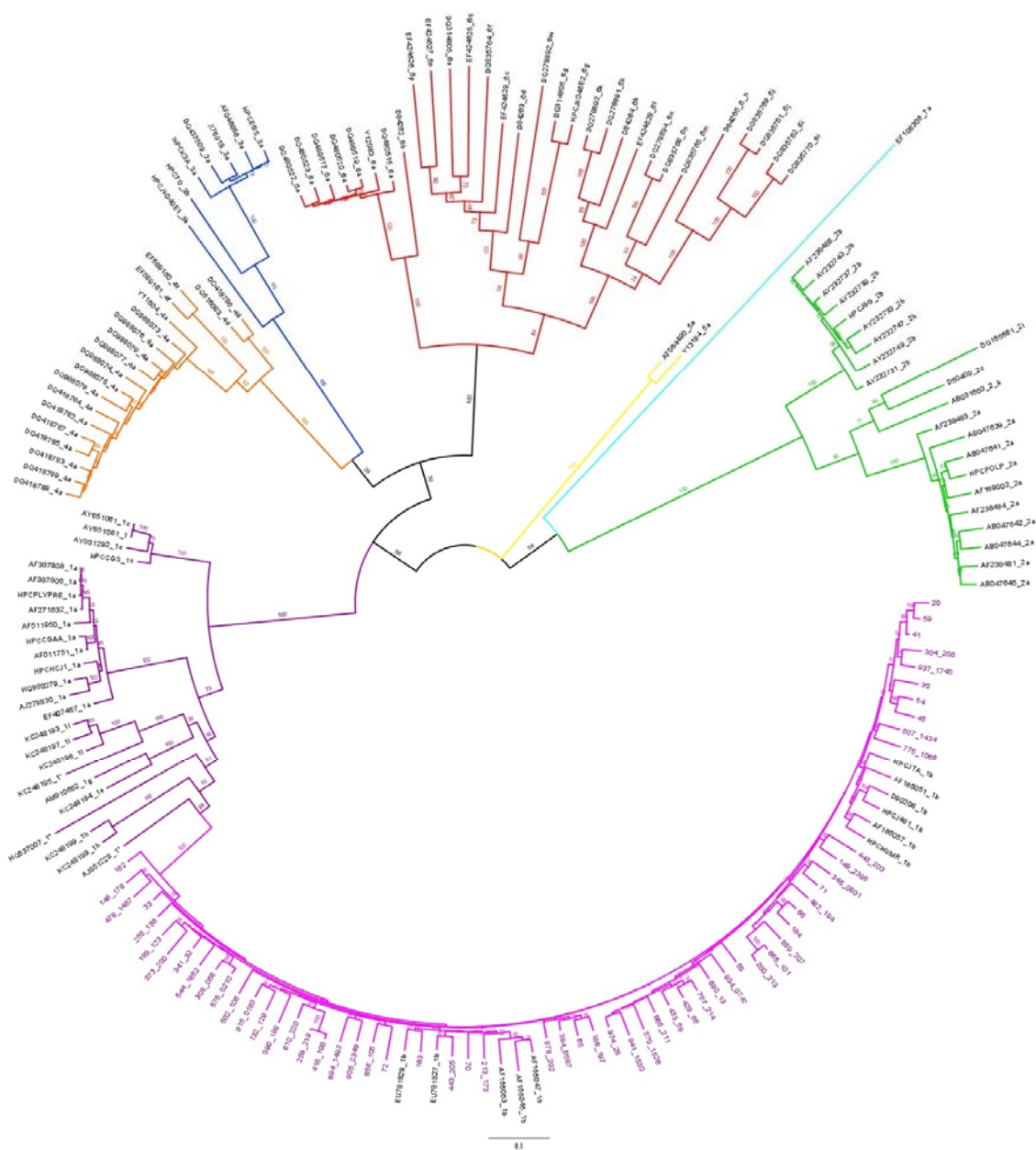


Figura 50. *Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la región NS5B de los 60 aislados analizados junto a secuencias de referencias del VHC. Las secuencias de los aislados del VHC se identifican en color rosa y con el número de muestra. Las secuencias de los genotipos 1-7 en diferentes colores (1a: lila; 1b: rosa, 2: verde; 3: azul; 4: naranja; 5: amarillo; 6: rojo y 7: turquesa). Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,445). Se indican los con un valor de bootstrap >70% (1000 replicados). La escala representa 0,1 sustituciones por posición nucleotídica.*

Para mejor comprensión, en las figuras 51 y 52 se muestran los árboles filogenéticos únicamente con las secuencias de los 60 aislados junto a las 11 secuencias de referencia del subtipo 1b, y también se detallan las mutaciones y los polimorfismos encontrados para cada aislado en la proteasa NS3 y polimerasa NS5B en posiciones asociadas a resistencias a IP ó a IAN e INN, respectivamente. En el árbol filogenético de la región NS3, pudimos observar que las mutaciones (color rojo) y polimorfismos (color azul) en posiciones asociadas a resistencia a IP se distribuyeron a lo largo del árbol sin localizarse en un grupo filogenético concreto (clado) que diferencie significativamente una mutación ó mutaciones determinadas. No se encontró ningún agrupamiento que diferenciase los aislados de pacientes inmunocompetentes de los de pacientes inmunodeprimidos. Únicamente dos pares de aislados con el cambio V170I, y otro aislado con el cambio V55A se diferenciaron significativamente del resto (100% y 96% de *bootstrap*, respectivamente).

En el árbol filogenético de la región NS5B, pudimos observar que las mutaciones de resistencia a IAN (color fucsia) y algunas de las mutaciones de resistencia a INN (color lila) se distribuyeron a lo largo del árbol, sin distinguir grupos filogenéticos concretos. Podemos diferenciar dos grandes grupos de aislados con unas mutaciones de resistencia a INN determinadas. En la parte superior del árbol se diferencian clados cercanos a la secuencia de referencia **HPCJTA**, con las mutaciones **T19S**, **C316N** y **A338V**. En la parte inferior del árbol se diferencian clados cercano a las secuencias de referencia **EU781827** y **EU781828**, con las mutaciones **T19S**, **A300T** y **A338V**. Sin embargo, este agrupamiento es arbitrario, ya que la mayoría de los aislados no son distinguibles filogenéticamente. Tampoco se encontró ningún agrupamiento que diferenciase los aislados de pacientes inmunocompetentes de los pacientes inmunodeprimidos.

Estos resultados sugieren que, en nuestros aislados del VHC subtipo 1b, no se distinguen grupos filogenéticos relacionados con un perfil de resistencias concreto a IP (sólo dos pares de aislados en relación al polimorfismo V170I) ni a IAN, pero sí se distinguen dos grupos relacionados con un determinado perfil de mutaciones de resistencia a INN. No obstante, la filogenia no indica soporte para relacionar todos los aislados con un perfil de mutaciones de resistencia determinado.

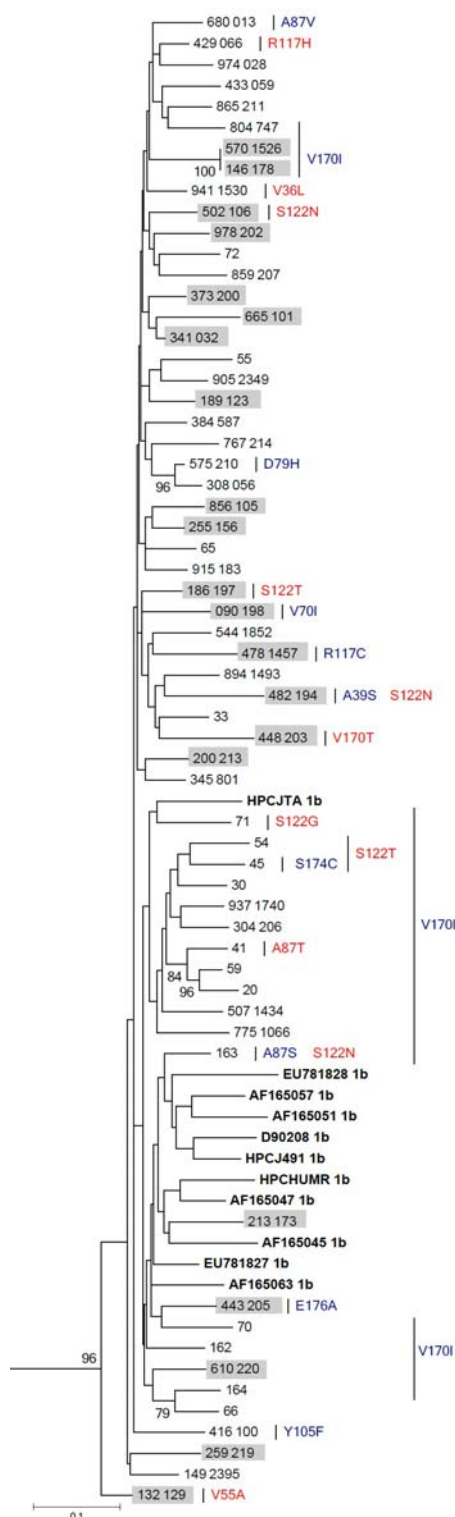


Figura 51. *Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la región NS3 de los 60 aislados analizados junto a secuencias de referencia genotipo 1b del VHC. Las secuencias de cada aislado del VHC se identifican en color negro de pacientes inmunocompetentes, sombreadas de inmunodeprimidos, y las secuencias de referencia genotipo 1b del VHC en negrita. Se destaca en color rojo las mutaciones de resistencia a IP, y en color azul los polimorfismos en posiciones implicadas en resistencia a IP encontrados. Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,39). Se indican valores de bootstrap >70% (1000 replicados). La escala representa 0,1 sustituciones por posición nucleotídica. El aislado Con1 del VHC genotipo 1b (AJ238799) con el cual se utilizó como secuencia de referencia para analizar las variaciones en sitios asociados a resistencia a AAD se asocia a la secuencia de referencia EU781828.*

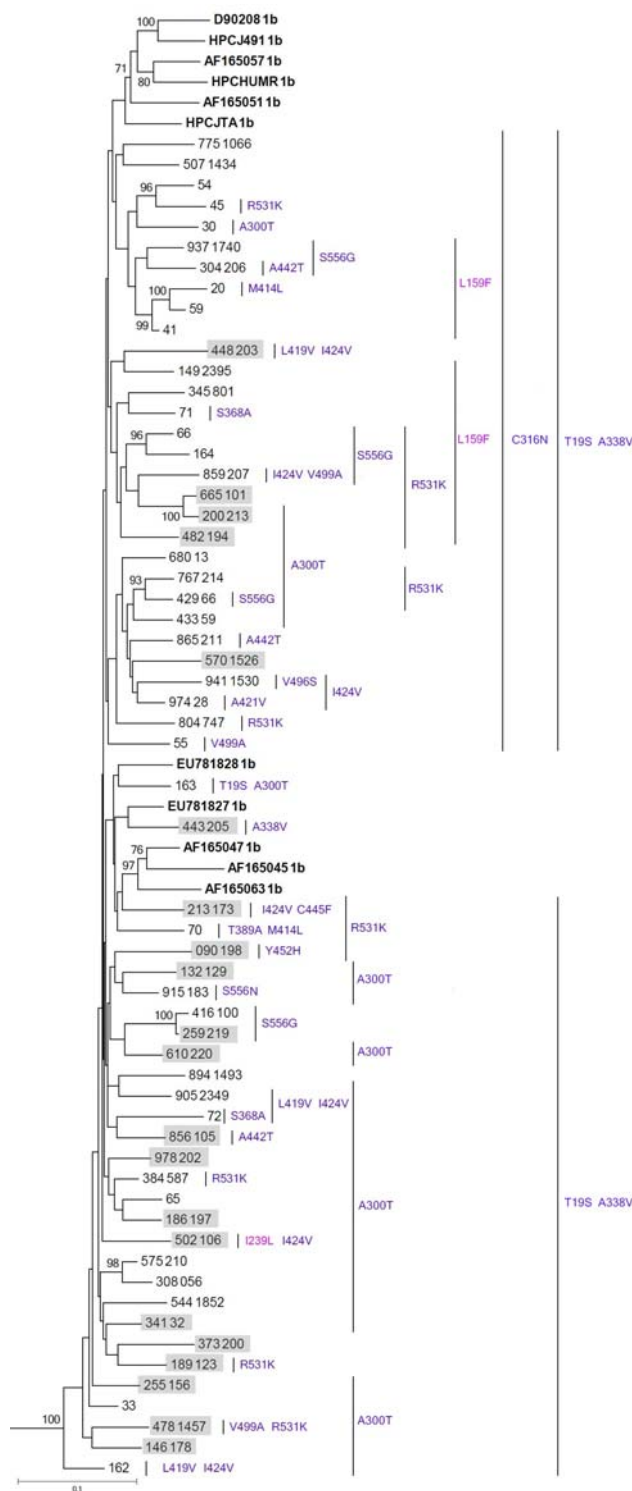


Figura 52. *Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la región NS5B de los 60 aislados analizados junto a secuencias de referencias genotipo 1b del VHC. Las secuencias de cada aislado del VHC se identifican con el número de seroteca, en color negro de pacientes inmunocompetentes, sombreadas de inmunodeprimidos, y las secuencias de referencia genotipo 1b del VHC en negrita. Se destaca en color fucsia las mutaciones de resistencia a IAN, y en color lila las mutaciones de resistencia a INN encontrados. Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,445). Se indican los con un valor de bootstrap $>70\%$ (1000 replicados). La escala representa 0,1 sustituciones por posición nucleotídica. El aislado Con1 del VHC genotipo 1b (AJ238799) con el cual se utilizó como secuencia de referencia para analizar las variaciones en sitios asociados a resistencia a AAD se asocia a las secuencias de referencia EU781827 y EU781828.*

Con el objetivo de intentar mejorar las filogenias agrupando toda la información nucleotídica disponible, se realizó un árbol filogenético con las secuencias de la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B de cada aislado concatenadas. En la figura 53 se muestra el resultado, que confirmó nuevamente el agrupamiento de los 60 aislados junto a las 11 secuencias de referencia del genotipo 1b (*bootstrap* 100%).

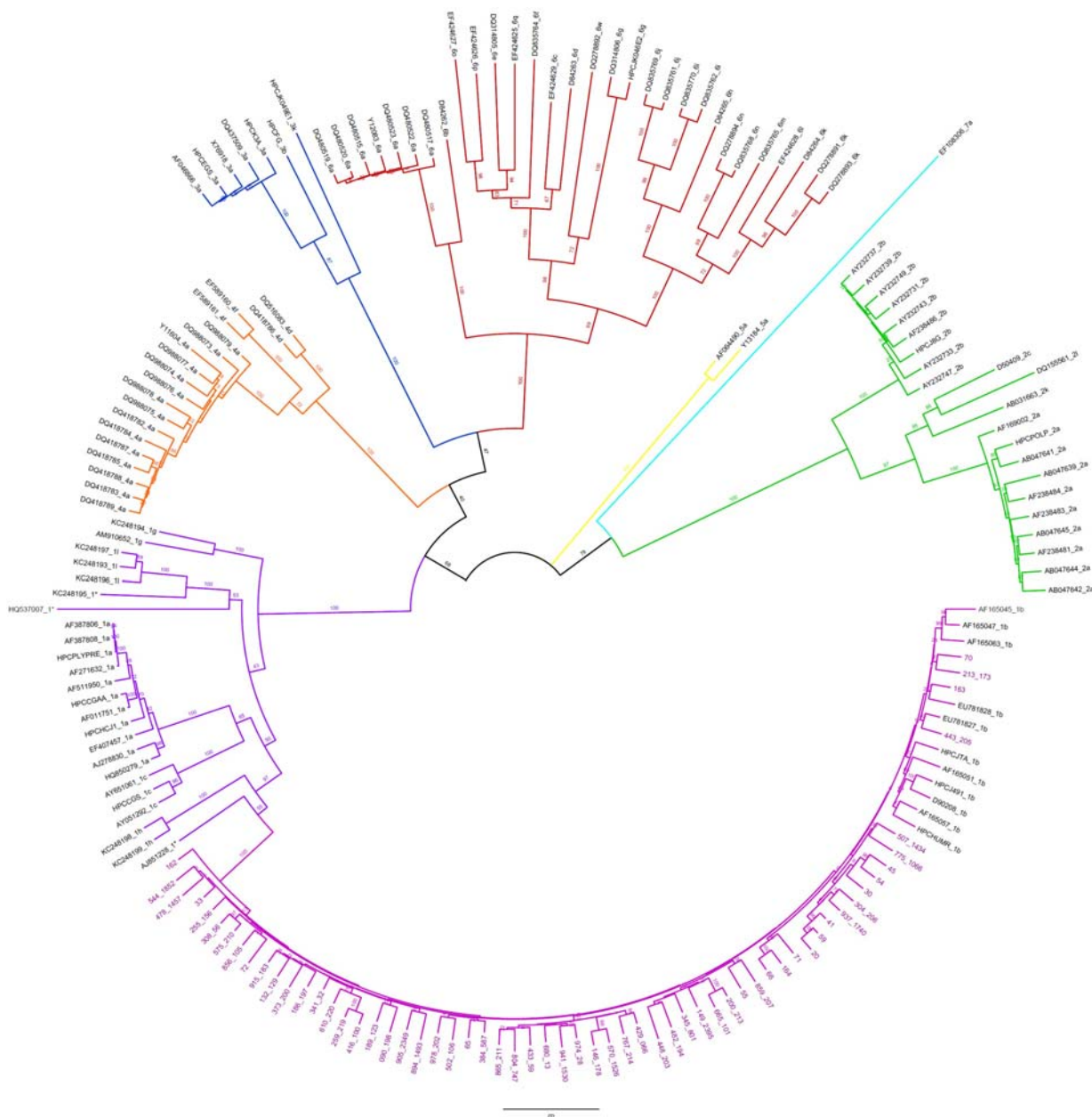
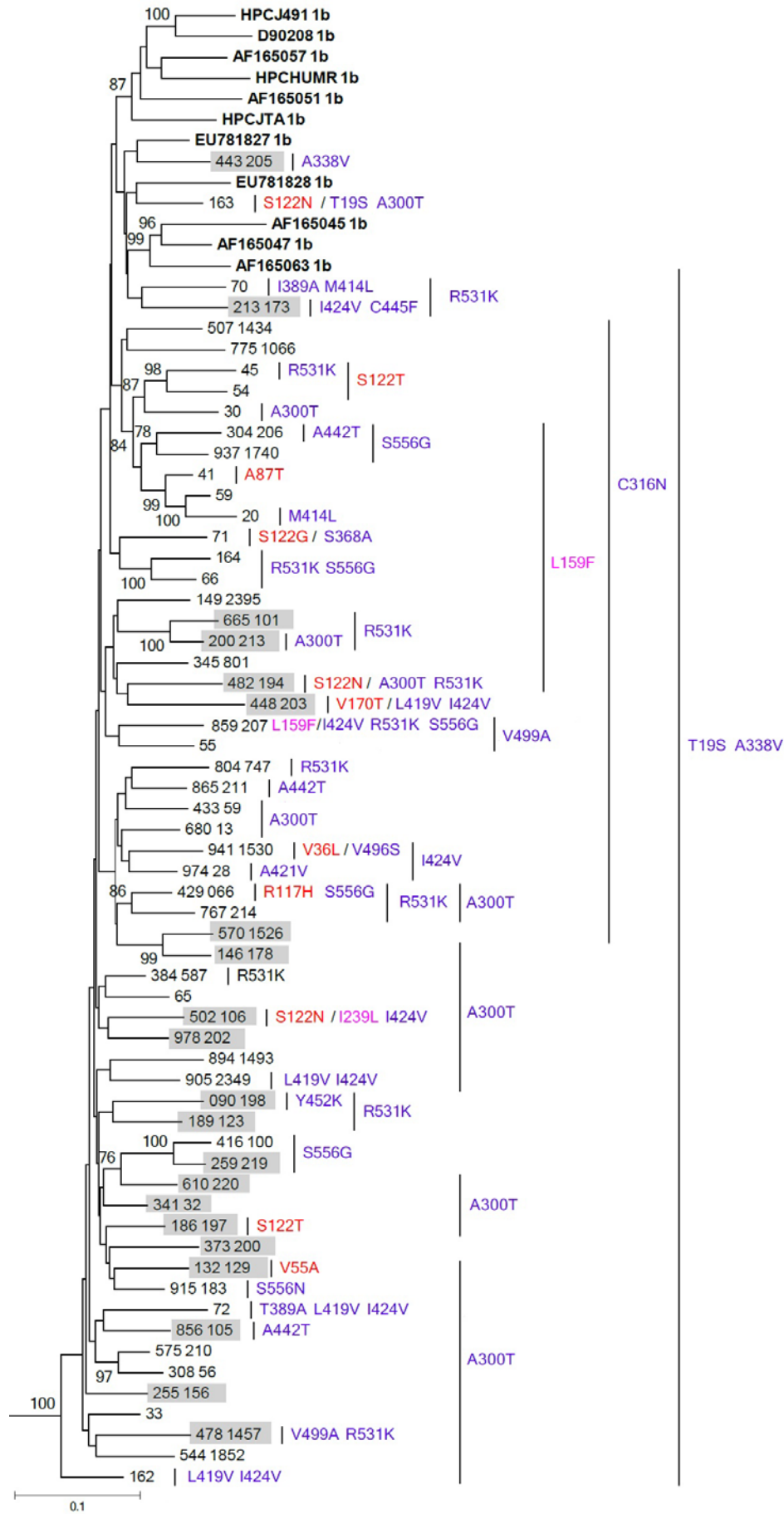


Figura 53. *Árbol filogenético por máxima verosimilitud de las regiones NS3 y NS5B concatenadas de los 60 aislados del VHC analizados junto a secuencias de referencia del VHC. Las secuencias de los aislados del VHC se identifican en color rosa y con el número de seroteca. Las secuencias de los genotipos 1-7 en diferentes colores (1a: lila; 1b: rosa, 2: verde; 3: azul; 4: naranja; 5: amarillo; 6: rojo y 7: turquesa). Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,442). Se indican los con un valor de bootstrap >70% (1000 replicados). La escala representa 0,2 sustituciones por posición nucleotídica.*

A modo de resumen en la figura 54 se muestran únicamente las secuencias de los 60 aislados junto con las 11 secuencias de referencia de subtipo 1b, junto con las mutaciones de resistencia a IP, IAN e INN encontradas. El árbol realizado utilizando únicamente 11 secuencias de referencia del genotipo 1b del VHC se muestra en el Anexo XVI. Podemos observar que los 60 aislados se distribuyeron cercanos a las secuencias de referencia **EU781827 1b** y **EU781828 1b** (*bootstrap* 87%) relacionadas con el replicón Con1 (Lohmann *et al.* 1999). Además, queda claro que las mutaciones de resistencias que tiene cada aislado, ya sea a IP, IAN y/o INN, no los agrupan en clados filogenéticos distintos, ya que se observa que las mutaciones se distribuyen a lo largo del árbol. Únicamente un aislado se diferenció de todos los demás (*bootstrap* 100%). Al igual que se observó en el análisis individual de NS5B, todos los aislados menos dos poseen las mutaciones de NS5B T19S y A338V, y se pueden distinguir dos grupos de aislados que se diferencian por poseer además las mutaciones de resistencia a INN **C316N** por un lado (clados en parte superior del árbol) ó **A300T** (clados en parte inferior del árbol). Dentro del primer grupo, observamos 13 aislados con NS5B **L159F** (resistencia a IAN). Sin embargo, y a pesar del considerable número de nucleótidos utilizado para la filogenia concatenada (2.526 nt), no se observó soporte que indicase diferenciación filogenética significativa de ningún patrón de mutaciones. Tampoco se encontró ningún agrupamiento que diferenciase los aislados de pacientes inmunocompetentes de los pacientes inmunodeprimidos, ni a los aislados de Valencia de los de Badalona.

Figura 54 (página derecha). *Árbol filogenético por máxima verosimilitud de las regiones NS3 y NS5B concatenadas de los 60 aislados del VHC analizados junto a secuencias de referencia genotipo 1b del VHC. Las secuencias de cada aislado del VHC se identifican con el número de seroteca, en color negro los inmunocompetentes y con sombra los inmunodeprimidos, las secuencias de referencias genotipo 1b del VHC en negrita. En el árbol se destaca en color rojo las mutaciones de resistencia a IP, en color fucsia las mutaciones de resistencia a IAN, y en color lila las mutaciones de resistencia a INN encontrados en cada paciente. Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,442). Se indican los con un valor de *bootstrap* >70% (1000 replicados). La escala representa 0,1 sustituciones por posición nucleotídica. El aislado Con1 del VHC genotipo 1b (AJ238799) con el cual se utilizó como secuencia de referencia para analizar las variaciones en sitios asociados a resistencia a AAD se parece a la secuencia de referencia EU781827 y EU781828.*



Estos resultados sugieren que, en aislados del VHC subtipo 1b de pacientes nunca tratados con AAD, la presencia de mutaciones y/o polimorfismos en aminoácidos relacionados con resistencias no se corresponde con algún clado filogenético concreto, sino más bien con una distribución aleatoria de estas variaciones entre los distintos aislados, que tampoco muestran algún patrón de mutaciones diferencial entre pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos, ni entre los pacientes de Valencia ó los de Badalona. Los únicos dos grupos de aislados que se pueden diferenciar son en función de sus mutaciones de resistencia a INN (T19S+A338V+C316N vs. T19S+A338V+A300T), pero estos grupos no se pueden distinguir filogenéticamente de forma significativa.

4.10.2 *Filogenia intra individuo*

Para intentar identificar distintas variantes virales en las poblaciones virales de cada paciente (“cuasiespecies”), se realizó un análisis filogenético con todas las secuencias de los clones moleculares para las regiones NS3 y NS5B correspondientes a los 10 aislados seleccionados para este análisis.

En las figuras 55 y 56 se muestra el resultado obtenido del árbol filogenético de los clones moleculares de los 10 aislados analizados en este subestudio para las regiones NS3 (proteasa) y NS5B, respectivamente. La filogenia se realizó utilizando el *software* RAxMLv7.2.6 bajo el criterio de máxima verosimilitud con el modelo GTR (*General Time-Reversible*) de sustitución de nucleótidos, una aproximación de la tasa de heterogeneidad de la distribución gamma y soporte de *bootstrap* por rama de 1000 réplicas. Las secuencias de los clones de cada aislado se agrupan junto a su secuencia directa o consenso correspondiente, y todos los clones se agrupan junto a las 11 secuencias de referencia del genotipo 1b del VHC con un elevado valor de *bootstrap* (88% y 100%, respectivamente). El árbol filogenético de las secuencias de los clones moleculares junto con 11 secuencias de referencia del genotipo 1b del VHC se detallan en Anexo XVII (a) NS3 y (b) NS5B.

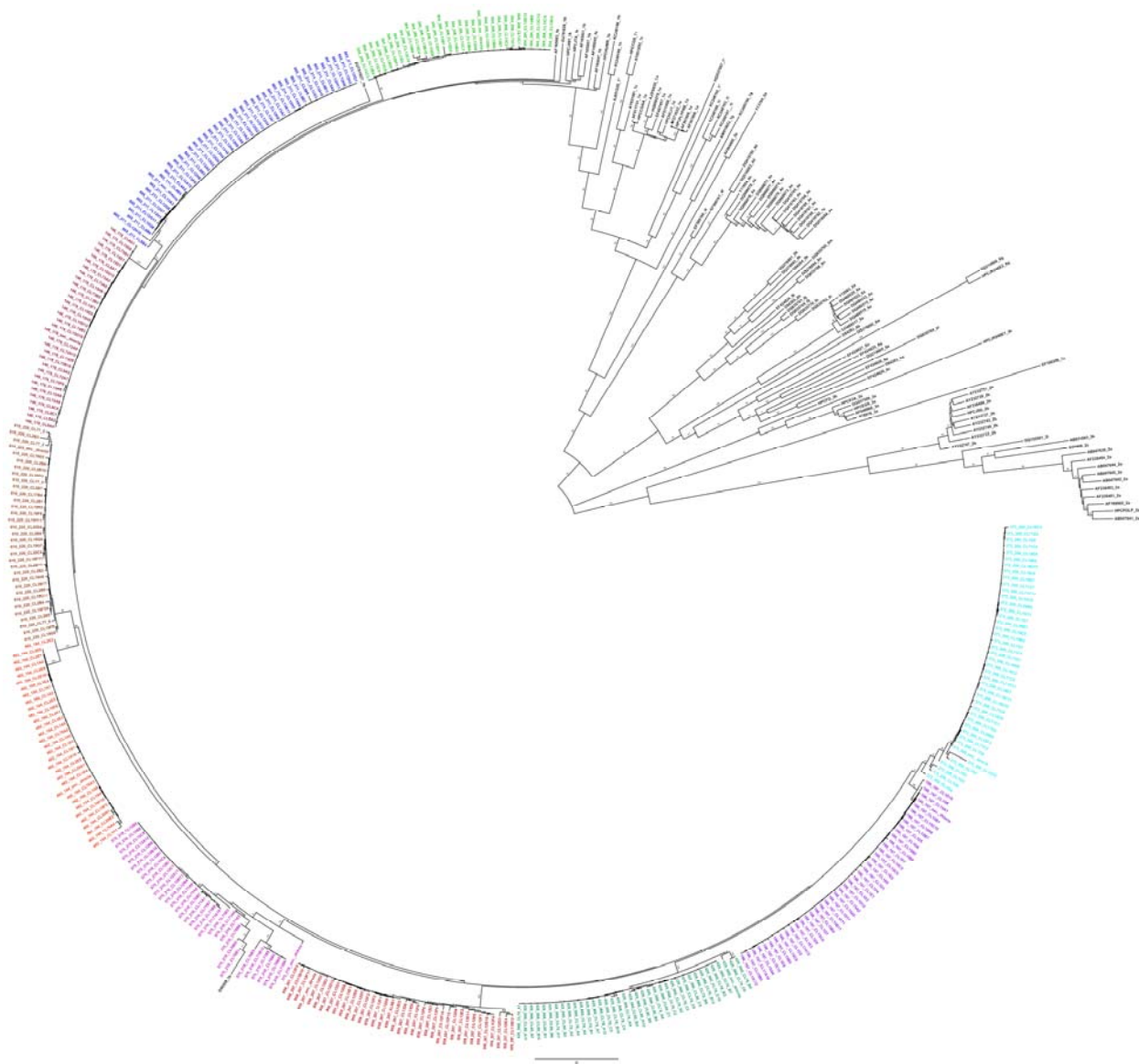


Figura 55. *Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la región NS3 de los clones moleculares de los 10 aislados analizados junto a secuencias de referencias del VHC. Las secuencias de los clones de cada aislado del VHC se identifican en distintos colores (turquesa, lila, rojo, rosa, marrón, naranja, granate, azul, verde claro y verde oscuro) y con el número de seroteca. Las secuencias de referencia se muestran en color negro. Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,382). Se indican los con un valor de bootstrap >70% (1000 replicados). La escala representa 0,2 sustituciones por posición nucleotídica.*

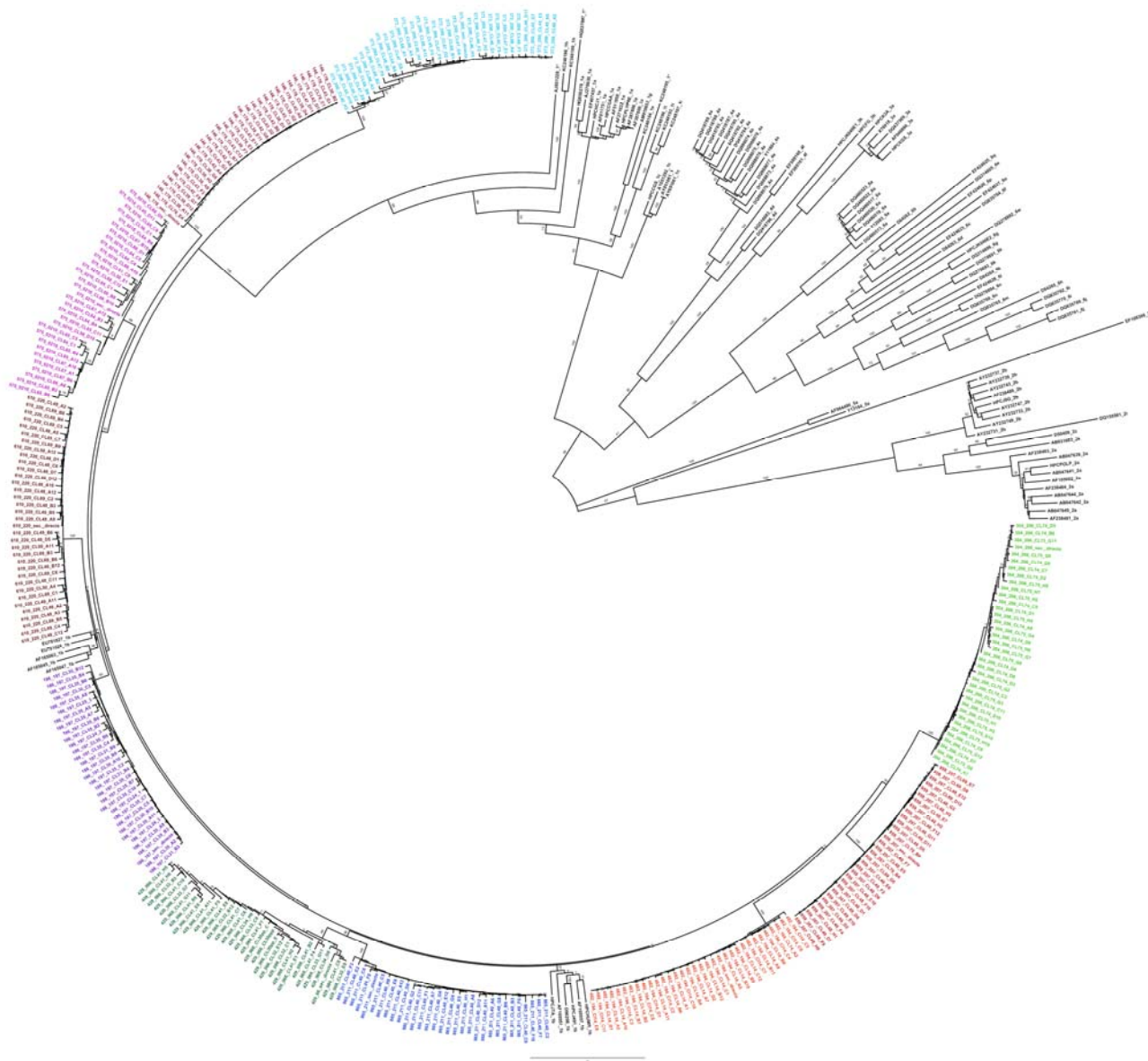


Figura 56. *Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la región NS5B de los clones moleculares de los 10 aislados analizados junto a secuencias de referencias del VHC. Las secuencias de los clones de cada aislado del VHC se identifican en distintos colores (turquesa, lila, rojo, rosa, marrón, naranja, granate, azul, verde claro y verde oscuro) y con el número de seroteca. Las secuencias de referencia se muestran en color negro. Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,483). Se indican los con un valor de bootstrap >70% (1000 replicados). La escala representa 0,2 sustituciones por posición nucleotídica.*

El agrupamiento de las secuencias de los clones moleculares coincide con lo observado con las secuencias directas ó consenso. Para la región NS3, los clones moleculares de los 10 aislados se agrupan cercanos a las secuencias de referencia **EU781827 1b** y **D90208 1b** (Anexo XVII (a)). Para la región NS5B, los clones moleculares de los 10 aislados se agrupan cercanos a las secuencias de referencia **EU781827 1b**, **EU781828 1b** y **HPCJTA 1b** (Anexo XVII (b)). Los árboles filogenéticos de los clones moleculares detallados para cada aislado con las mutaciones de resistencia a IP, IAN e INN encontradas en las regiones NS3 y NS5B se detallan en Anexo XVIII y XIX, respectivamente.

Para los clones moleculares de cada aislado de la región NS3 no se observó ningún agrupamiento ó grupo filogenético concreto ó diferencial (clado) que agrupase las variantes minoritarias con mutaciones asociadas a resistencia a IP ó polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia encontradas en algunos clones moleculares (Anexo XVIII). Así mismo en los árboles filogenéticos de los clones moleculares de cada aislado de la región NS5B tampoco se observó que las variantes minoritarias con mutaciones de resistencia a IAN y/o INN encontradas en algunos clones moleculares formaran un grupo filogenético concreto (clado) (Anexo XIX). En ninguna de las dos regiones se observó ningún clado filogenético ó patrón de mutaciones minoritarias diferencial entre los clones moleculares de aislados de pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos, ni de pacientes de Valencia ó de Badalona.

Estos resultados sugieren que, a nivel intrapaciente, la aparición de mutaciones y/o polimorfismos en aminoácidos relacionados con resistencias no se corresponde con la evolución de algún clado filogenético concreto dentro de cada paciente, sino más bien con una distribución aleatoria de estas variaciones entre las distintas variantes dentro de cada paciente, que tampoco muestran algún patrón de mutaciones diferencial en la “cuasiespecie” entre pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos, ni entre los pacientes de Valencia ó los de Badalona.

4.11 *Análisis de coevolución intramolecular e intermolecular*

Una mutación de resistencia tiene un impacto en la capacidad biológica del virus mutante (*fitness*), normalmente reduciendo el *fitness*, y disminuyendo su eficiencia replicativa. Con frecuencia una mutación compensatoria asociada con la mutación de resistencia puede favorecer ó restaurar el *fitness* (aumento del *fitness*), provocando que la mutación de resistencia perdure en la población viral ó potencialmente facilitando de este modo la aparición más rápida de virus resistentes. Para detectar posibles mutaciones compensatorias relacionadas con las variaciones detectadas en nuestros aislados del VHC subtipo 1b se realizó un análisis de coevolución intramolecular utilizando el *software* CAPS, versión 1 (Farés y Travers 2006). CAPS compara la variación correlacionada de las tasas de evolución en dos sitios corregidas por el tiempo transcurrido desde la divergencia de la secuencia de la proteína a la que pertenece.

Los aminoácidos de la proteasa NS3 en coevolución formaron 5 grupos: G1: 7/56/86; G2: 7/56/89; G3: 7/86/147; G4: 56/117 y G5: 86/87 (en el ANEXO XXI tabla 10 se detallan los resultados). La visualización gráfica se representa en la figura 57, donde podemos observar los aminoácidos que pertenecen a un mismo grupo de coevolución enlazados, y si están próximos entre sí. Cuando un aminoácido pertenece a varios grupos de coevolución, existen varias conexiones que parten de ese aminoácido a cada uno de los grupos a los que pertenece, enlazando con cada uno de los aminoácidos de dichos grupos. En el grupo 1 y 3, el aminoácido en la posición 86 ha sido asociado previamente a mutaciones compensatorias para resistencias a IP (Yi *et al.* 2006). En el grupo 5, la posición 86 coevoluciona junto a la posición 87, implicada en resistencia a IP (Susser *et al.* 2009). En el grupo 2, el aminoácido en la posición 89 está asociado a una mayor replicación del virus (Hraber *et al.* 2007). Finalmente, en el grupo 4 el aminoácido en la posición 117, también está implicado en resistencia a IP (Susser *et al.* 2009). En la figura 58 se representan los aminoácidos en coevolución como esferas de colores en la estructura tridimensional de la proteína NS3/4A proveniente del aislado BK del VHC genotipo 1b (código PDB 1CU1) mediante el programa PyMol v1.1. Como se puede observar, los grupos de coevolución detectados incluyen aminoácidos tanto próximos como distantes entre sí.

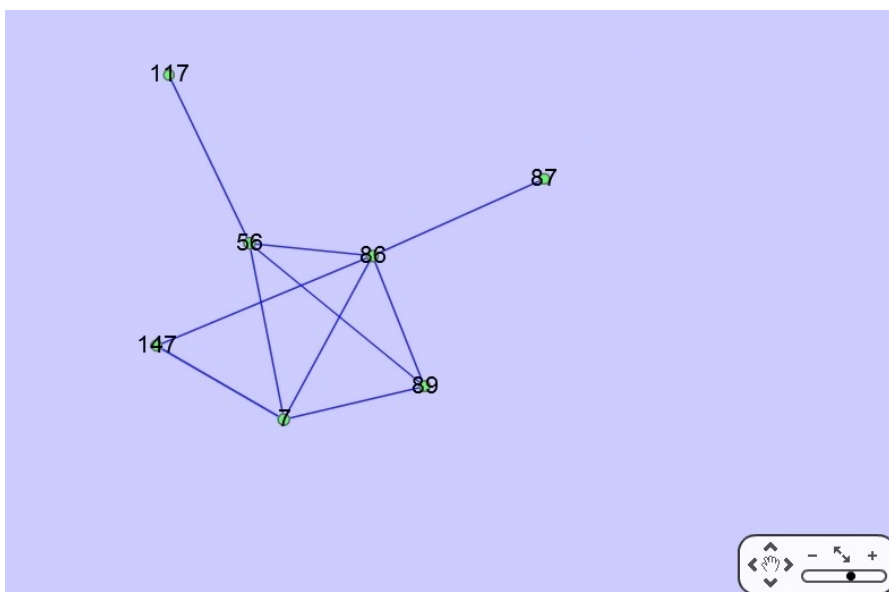


Figura 57. **Aminoácidos de la proteasa NS3 en coevolución.** Las esferas en color verde representan los residuos de aminoácidos que están en coevolución, mostrando aquellas que pertenecen al mismo grupo de coevolución enlazados entre sí, y las interdependencias entre los diferentes grupos.

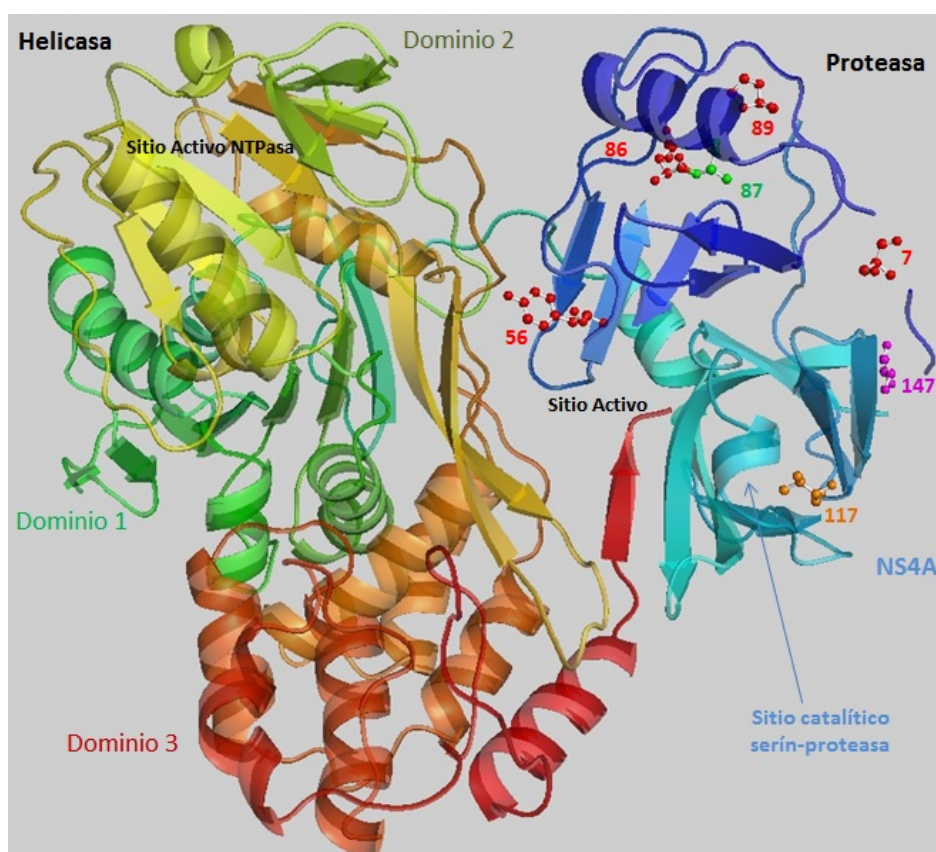


Figura 58. **Posición de los aminoácidos de la proteasa NS3 en coevolución.** Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos que están en coevolución. Los aminoácidos que pertenecen al mismo grupo de coevolución tienen el mismo color.

Estos resultados sugieren que algunas mutaciones de resistencia a IP encontradas en los aislados virales, están acompañadas de mutaciones compensatorias, ó de polimorfismos asociados a una mayor replicación del virus. Estas compensaciones intramoleculares restaurarían el bajo *fitness* viral que se produce tras la emergencia de una mutación de resistencia.

Los aminoácidos en coevolución de la proteína NS5B en los 60 aislados analizados formaron 32 grupos (en el ANEXO XXI tabla 11 se muestran los resultados detallados). En la visualización gráfica (Figura 59), se representan los aminoácidos que pertenecen a un mismo grupo de coevolución enlazados adecuadamente. Cuando un aminoácido pertenece a varios grupos de coevolución, aquel está unido a cada uno de los grupos a los que pertenece. En la figura 60 se representan los aminoácidos en coevolución como esferas de colores en la estructura tridimensional de la proteína NS5B del aislado Con1 del VHC genotipo 1b (código PDB 3FQL) mediante el programa PyMol v1.1. Como se puede observar, los grupos de coevolución detectados en la proteína NS5B incluyen aminoácidos distantes y cercanos entre sí. Aquellos que pertenecen al mismo grupo de coevolución se muestran con el mismo color. Observamos que de los 32 grupos de aminoácidos que coevolucionan, la posición 300, relacionada con resistencia a INN (Ali *et al.* 2008), está presente en varios grupos de aminoácidos en coevolución (grupo 3, 7, 14, 19, y 29) que incluyen otras posiciones implicadas en resistencia a INN, como la posición 451 (Tomei *et al.* 2004) (grupos 25 y 31). Además, 300 y 451 coevolucionan juntas en el grupo 22.

Estos resultados apuntan a que algunas mutaciones de resistencia a un INN encontradas en los aislados virales, pueden ir acompañadas de otras mutaciones resistencia a otros INN, lo que podría contribuir a la resistencia a varios AAD de esta clase.

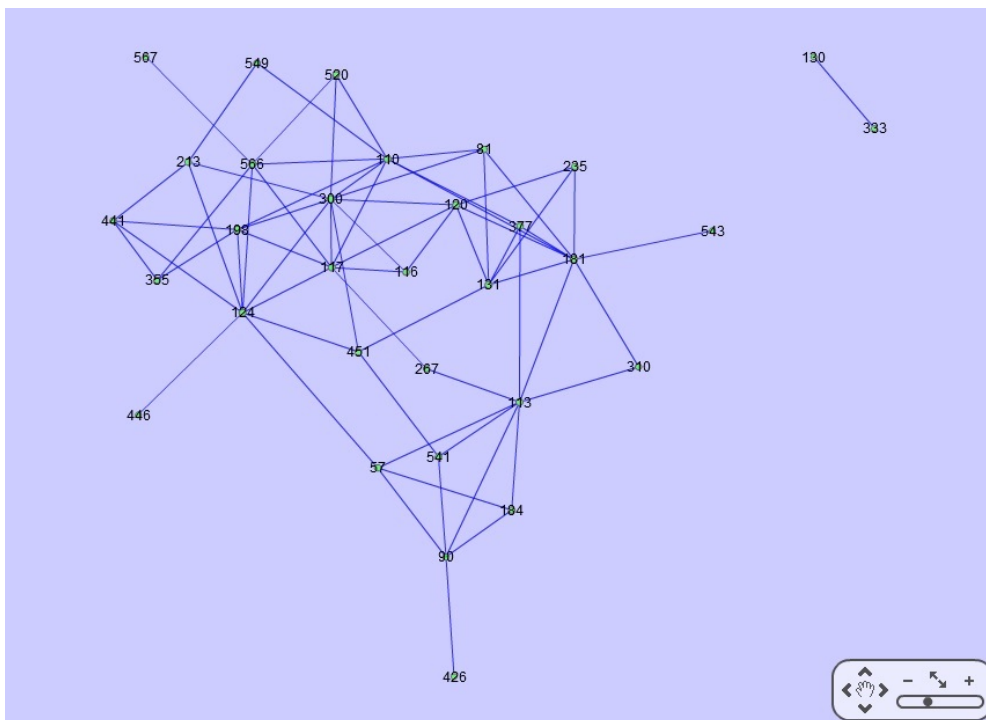


Figura 59. *Aminoácidos de la proteína NS5b en coevolución.*

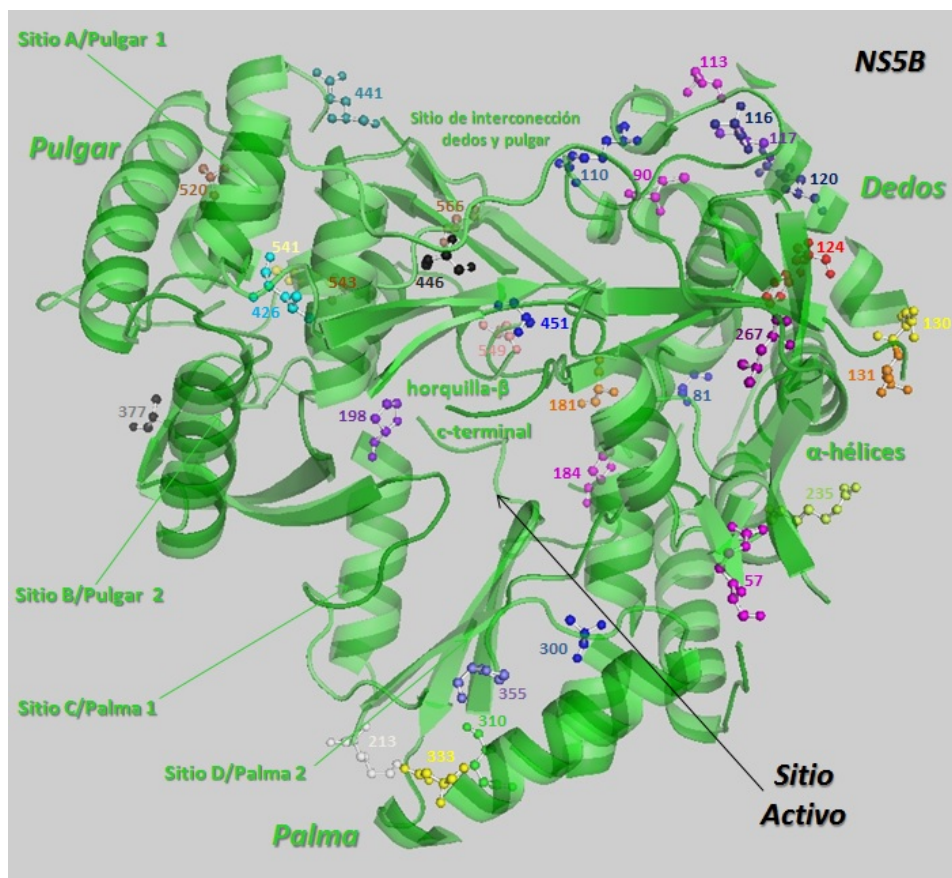


Figura 60. *Posición de los aminoácidos de la proteína NS5b en coevolución. Las esferas en colores representan los residuos de aminoácidos que están en coevolución. Los aminoácidos que pertenecen al mismo grupo de coevolución tienen el mismo color.*

Por otro lado, las mutaciones de resistencia que se detectan en la proteasa NS3 podrían ir acompañadas de otras mutaciones y/o polimorfismos en la otra polimerasa NS5B, ó viceversa. Por tal motivo se evaluó la posible existencia de correlación entre mutaciones en la proteasa NS3 y la polimerasa NS5B en una secuencia determinada, es decir, si una mutación en una proteína siempre va acompañada de otra mutación en la otra proteína. El análisis de coevolución intermolecular entre las proteínas NS3 y NS5B también se realizó con el *software* CAPS v1, y se distinguieron 5 grupos de aminoácidos en coevolución (Tabla 31 y ANEXO XXI, Tabla 12).

Grupo	NS3 (aa)	NS5B (aa)
G1	89	110/ 543/ 310
G2	4	181/ 117
G3	87	130/ 16/ 113
G4	89/117	300
G5	117	451/ 426/ 520

Tabla 31. *Grupos de aminoácidos en coevolución intermolecular NS3-NS5B*

De los 5 grupos de aminoácidos que coevolucionan entre las proteínas NS3 y NS5B, llamó la atención en el grupo 1 la posición NS3-89 implicada en mayor eficiencia replicativa (Hraber *et al.* 2007). En el grupo 4 esa misma posición NS3-89 está junto a NS3-117, relacionada con resistencia a IP (Susser *et al.* 2009), y NS5B-300, relacionada con resistencia a INN (Ali *et al.* 2008). Finalmente, en el grupo 5 se observó que la posición NS3-117, relacionada con resistencia a IP (Susser *et al.* 2009), coevoluciona junto a las posiciones NS5B-451 y NS5B-426, relacionadas con resistencia a INN (Tomei *et al.* 2004, Shi *et al.* 2008).

Estos resultados sugieren que algunas mutaciones de resistencia encontradas en la proteasa NS3 pueden ir acompañadas de mutaciones de resistencia concretas en la polimerasa NS5B. Estas asociaciones intermoleculares podrían estar relacionadas para mantener la eficacia replicativa (*fitness*) de los dobles mutantes, ó por otros motivos, todavía desconocidos.

5. DISCUSIÓN

Esta Tesis Doctoral representa uno de los primeros estudios en España sobre los polimorfismos naturales del VHC en las proteínas diana de los AAD inhibidores de la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B, tanto en pacientes inmunocompetentes como en pacientes trasplantados hepáticos inmunodeprimidos. Se puso a punto una técnica de RT-PCR y secuenciación para analizar la variabilidad del VHC en el gen de la proteasa NS3 y polimerasa NS5B en 60 aislados de pacientes *naïve* con infección crónica. Se evaluó tanto la presencia de variaciones en la secuencia promedio ó mayoritaria (secuenciación directa en todos los aislados), como la presencia de mutaciones minoritarias a nivel de la “cuasiespecie” del VHC (clonación y secuenciación en aislados de 10 pacientes seleccionados), partiendo de la hipótesis que algunas mutaciones relacionadas con resistencias a AAD ya se encuentran circulando en los virus que infectan a la población antes del comienzo del tratamiento. El estudio se centró en la infección por el VHC subtipo 1b, por dos motivos. En primer lugar, el subtipo 1b es el de mayor prevalencia en pacientes con enfermedad hepática avanzada en España (López-Labrador *et al.* 1997), que representa la población con más urgencia de tratamiento (Joshi *et al.* 2013). En segundo lugar, la mayoría de los estudios publicados han evaluado la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia a IP, y a los IAN e INN, en aislados de pacientes infectados con VHC genotipo 1, sobre todo del subtipo 1b, debido a que la mayoría de los inhibidores han sido desarrollados con modelos de cultivo celular para este subtipo y se conoce muy bien el perfil de resistencias *in vitro*. Además, se incluyeron en el estudio aislados del virus de dos poblaciones (Valencia y Badalona) y de dos tipos de pacientes (inmunocompetentes y trasplantados hepáticos), para evaluar posibles efectos de diferencias locales ó de la inmunosupresión en la distribución de polimorfismos relacionados con resistencias a AAD.

En la primera parte de esta Tesis Doctoral, se puso a punto una técnica de RT-PCR para amplificar y secuenciar las regiones de la proteasa NS3 y de la polimerasa NS5B del VHC. Debido a la longitud de los fragmentos a

amplificar, se necesitó aplicar un protocolo de PCR anidada, y dividiendo en dos fragmentos la amplificación de cada gen. También se presentaron dificultades para amplificar algunas muestras, sobre todo aquellas con baja carga viral (p.ej. <500.000 UI/mL). Finalmente, se evaluó la prevalencia de polimorfismos naturales en las secuencias obtenidas de 60 aislados de pacientes con infección crónica, 34 de ellos seguidos en el Hospital La Fe de Valencia (21 eran trasplantados hepáticos inmunodeprimidos) y 26 seguidos en el HGUTiP de Badalona. Los datos obtenidos indican, en conjunto, que los polimorfismos basales en residuos relacionados con resistencia a AAD son comunes en las dos regiones NS3 y NS5B, pero mucho más frecuentes en posiciones de NS5B implicadas en resistencia a INN. La prevalencia de polimorfismos relacionados con resistencia a AAD no es dependiente ni de la localización geográfica de la cohorte de estudio, ni de la presencia de inmunosupresión (trasplante hepático).

En la región de la proteasa NS3, 32/60 aislados (53,33%) poseían polimorfismos en alguna posición asociada a resistencia a IP, en los que en 12 aislados el cambio implica resistencia a IP y en el resto es desconocido. No obstante, las mutaciones observadas fueron variantes de bajo nivel de resistencia a IP, y no se observaron en ninguno de los aislados cambios en las posiciones 36, 155, 156, 168 y 170 que tienen un mayor impacto en la resistencia a los IP *in vivo*, tales como V36M T54S, R155K/T, A156S/V/T D168A/V y V170A (Sarrazin *et al.* 2007a; 2007b, Mederacke *et al.* 2009, Halfon y Locarnini 2011). Si bien otros autores detectaron estas mutaciones de alto nivel de resistencia a IP en el 0,2 - 2,2% de aislados de pacientes infectados por VHC genotipo 1 (Bartels *et al.* 2008, Colson *et al.* 2008, Kuntzen *et al.* 2008, Gaudieri *et al.* 2009, Kim *et al.* 2009) cabe destacar que, a diferencia de nuestro trabajo, incluyeron un número significativo de pacientes infectados con VHC subtipo 1a, que presenta más polimorfismos relacionados con resistencias. Además, el tamaño muestral de nuestro trabajo es menor.

A pesar de todo, hay que destacar la detección de otros polimorfismos asociados a resistencia, aunque en una frecuencia muy baja. Los cambios V36L (resistencia a TPV, BOC y VPV), V55A (resistencia a TPV, BOC, SOV), y V170T (resistencia a TPV, BOC, NLV, FDV, SMV y DNV), se encontraron

cada uno en 1/60 aislados (1,67%), en concordancia con lo descrito en pacientes naïve (Cento *et al.* 2012), y en tratamiento con IP (Susser *et al.* 2009, Barnard *et al.* 2013). Los polimorfismos A87T y R117H (resistencia *in vitro* a TPV y BOC) se encontraron en un 1/60 (1,67%) de los aislados analizados. Besse y colaboradores (2012) también detectaron R117H *in vivo*, en 3/28 aislados de pacientes naïve infectados con subtipo 1b. Por último, también se encontraron los polimorfismos S122G/T/N (potencialmente asociados a resistencia a SMV) en 7/60 (11,6%) de las secuencias analizadas. Los polimorfismos en S122 también se han encontrado en otras cohortes de pacientes (Paolucci *et al.* 2012, McPhee *et al.* 2012a; 2012b), aunque esos estudios también incluyeron pacientes infectados por VHC subtipo 1a.

En este trabajo también se encontraron varios polimorfismos en la proteasa NS3 no relacionados a resistencias a IP en la literatura: A39S, D79H, A87S/V, Y105F, R117C, S174C y E176A con una frecuencia de 1/60 aislados (1,67%) cada una, y V170I de 21/60 aislados (35%). En particular, el polimorfismo V170I ya ha sido asociado a resistencia a Danoprevir (Lim *et al.* 2012). El efecto potencial de estos polimorfismos en la resistencia a IP es desconocida. Al posicionar estos polimorfismos en la estructura tridimensional de la proteasa se observó que D79H, Y105F, R117C, S174C y E176A se encuentran cercanos al sitio activo, por lo que se puede especular que estos polimorfismos podrían también afectar la unión de los IP. En la triple terapia BOC+pegIFN+RBV, los pacientes infectados por aislados del VHC con polimorfismos basales en la proteasa respondían peor que aquellos que no presentaban mutaciones basales (RESPOND-2, De Meyer *et al.* 2012). Por tanto, no se puede descartar que estos polimorfismos encontrados tengan algún efecto en la eficacia de la triple terapia con IP.

Con respecto la polimerasa NS5B, cabe destacar la ausencia de polimorfismos en posiciones asociadas con alto nivel de resistencia a IAN (S282), y sólo 1/60 aislados (1,67%) tenía algún otro polimorfismo (N142S), siendo éste de efecto desconocido. En nuestra población de estudio no encontramos la principal mutación de resistencia a IAN (S282T) en ninguno de los aislados secuenciados. Esta mutación es extremadamente infrecuente *in vivo*, aunque recientemente Tong *et al.* (2014) y Gane *et al.* (2014b)

identificaron S282T en unos pocos aislados de pacientes infectados con el subtipo 1a. Ninguno de los aislados analizados muestra las variaciones A15G, K72M, S96T, N142T, R222Q, C223H/Y, S282R, L320I/F, ó A396G, asociadas con resistencia a IAN. Sin embargo, llama la atención la prevalencia de variantes L159F y I239L (26,67%), asociadas recientemente con resistencia moderada (Tong *et al.* 2014a; 2014b, Gane *et al.* 2014b). En particular, 15/60 aislados (25%) tenían el polimorfismo L159F, relacionado con resistencia (moderada) a Mericitabina y Sofosbuvir *in vitro* e *in vivo* (Tong *et al.* 2014a; 2014b) en presencia de una mutación adicional (L320F), la cual no se observó en ninguno de nuestros aislados. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Paolucci *et al.* (2013) en Italia, donde observaron una prevalencia del 23,3% del polimorfismo L159F en aislados del VHC subtipo 1b. Queda por elucidar si la presencia de esta variación puede facilitar la selección del doble mutante L159F+L320F en caso de su emergencia durante el tratamiento con IAN. Por último, encontramos el cambio I239L (resistencia moderada a Mericitabina) en 1/60 (1,67%) de los aislados, aunque previamente esta variación sólo había sido identificada *in vitro*, en el modelo del replicón (Ali *et al.* 2008).

En cuanto a polimorfismos con implicación desconocida en la resistencia a IAN, encontramos N142S en una 1/60 (1,67%) de las secuencias. El cambio que induce resistencia a Balipravir es N142T. Nuestros resultados concuerdan con los de Kuntzen *et al.* (2008) y Legrand-Abravanel *et al.* (2009), que tampoco encontraron la sustitución N142T *in vivo*, y con los de Chinnaswamy *et al.* (2010) que, aunque identificaron N142S y NS142T en secuencias de bases de datos, su frecuencia fue muy baja. Por tanto, parece que la variación en esta posición es, en efecto, bastante infrecuente.

En su conjunto, los resultados obtenidos en cuanto a polimorfismos implicados en resistencia a IAN refuerzan el concepto de baja frecuencia de resistencias a esta clase de inhibidores.

Al contrario que para los IAN, encontramos una alta prevalencia de polimorfismos en posiciones de NS5B asociadas con resistencia a INN, dirigidos a cualquiera de los sitios alostéricos de la polimerasa viral. Todos los aislados tenían como mínimo algún polimorfismo relacionado con resistencia

a INN. En 4/60 aislados (6,67%) había al menos un cambio que implica resistencia a INN, mientras que 24/60 (40%) mostraron al menos un cambio con efecto desconocido. Además, 40/60 aislados (66,67%) tenían entre 2 y 3 mutaciones de resistencia a INN y 16 aislados (26,67%) tenían más de 3 mutaciones de resistencia a INN. Asimismo, 9/60 aislados (15%) tenían entre 2 y 3 polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia, cuyo efecto es desconocido.

Con respecto a las mutaciones con resistencia a INN encontradas en nuestro estudio que afectan el pulgar I sitio (A), ninguna de ellas se encontró con prevalencia superior al 7%. La mayoría también han sido identificadas *in vivo* en aislados de otros pacientes *naïve* por otros autores: A421V (resistencia a BMS-791325) por *McPhee et al.* (2012) y *Bartels et al.* (2013); P496S y V499A (resistencia a Tegobuvir, BI207127, MK-3281; JTK-109 y BILB1941) por *Gaudieri et al.* (2009), *Treviño et al.* (2011), *Bartels et al.* (2013) y *Paolucci et al.* (2013). El cambio T389A (resistencia a JT-16 *vitro*, identificado en 2/60 -3,33%- de las secuencias) es la primera vez que se detecta *in vivo* (*Delang et al.* 2012a; 2012b).

Detectamos un total de cinco mutaciones de resistencia a INN que afectan al pulgar II, sitio alostérico (B) de la polimerasa NS5B. Sorprendentemente, T19P (resistencia a Filibuvir y VCH-759), se encontraba en casi todas de las secuencias analizadas (58/60), sin embargo, esta resistencia se ha caracterizado únicamente *in vitro* (*Howe et al.* 2006), y su relevancia clínica se desconoce. Por otra parte, aunque la prevalencia de R531K (*Villano et al.* 2006) fue también alta (16/60, 26,67%), el fármaco para el que confiere resistencia (Nesbuvir) se ha retirado de desarrollo. Las otras tres mutaciones I424V (resistencia a Filibuvir y BILB 1491), A442T (resistencia a Filibuvir, Lomibuvir, VCH-759, VCH-916, y VCH-371) y L419V (resistencia a VX-222), mostraron una prevalencia baja (15%, 5%, y <2%, respectivamente). De ellas, es importante destacar que, mientras L419 se ha descrito con anterioridad en aislados de pacientes *naïve* (*Bartels et al.* 2010, *Zhang et al.* 2012), A442T únicamente ha sido descrita *in vitro* con anterioridad a nuestro trabajo (*Howe et al.* 2006) y I424V en secuencias de bases de datos (*Alves et al.* 2013). Por tanto, nuestros resultados indican que algunos de los aislados de subtipo 1b

analizados podrían presentar una susceptibilidad reducida a esta subfamilia de INN.

Para los INN dirigidos a la palma I, sitio alostérico (C) y la horquilla- β de la polimerasa, sólo se encontraron tres cambios implicados en resistencia en nuestros aislados, y fueron poco frecuentes. Los más relevantes son S556G/N (5/60 aislados -8,33%-) y M414L, (2/60 aislados -3,33%-). Estos cambios se ha detectado también *in vivo* por otros autores como polimorfismos naturales, en relación con la emergencia de resistencia a INN en ensayos clínicos y, para S566G, con la resistencia a análogos de ciclosporina A (Middleton *et al.* 2010, Sun *et al.* 2011, Bartels *et al.* 2013, Arai *et al.* 2014). Para el cambio S368A detectado en sólo 1/60 aislados, no se conoce relación con resistencia *in vivo*, solamente *in vitro* (Lu *et al.* 2007). Por último, la baja frecuencia (<10%) de polimorfismos para esta subclase de INN (C451Y/H/N y Y448S) concuerda con el escrutinio más exhaustivo de bases de datos de secuencias (Chinnaswamy *et al.* 2010), aunque su posible efecto es difícil de preveer.

Para la subfamilia de INN dirigidos a la palma II, sitio alostérico (D) de la polimerasa viral, se encontraron cinco cambios relacionados con resistencias en la literatura: uno en casi todas las secuencias (A338V en 59/60 aislados -98,33%-), dos con una prevalencia muy alta (C316N en 30/60 -50%- y A300T en 28/60 -46,67%- aislados) y los otros dos con una prevalencia muy baja (C445F y Y452H en 2/60 -3,33%- y 1/60 -1,67%- aislados, respectivamente). También se encontró un polimorfismo (A300S en 25/60 -41,67%- aislados) cuya relación con resistencia a INN es desconocido. Los cambios A300T (resistencia a Nesbuvir) y A338V (resistencia a A837093) han sido sólo descritos previamente *in vitro* (Howe *et al.* 2006, Ali *et al.* 2008) y no se dispone de datos *in vivo*. Por el contrario, los cambios C316N (resistencia a ABT-333, BI207127, Setrobuvir, Tegobuvir, A782759, A837093, Nesbuvir, y ABT-072), C445F y Y452H (resistencia a Tegobuvir) se ha detectado en varios estudios en pacientes naïve, con frecuencias muy variables (Le Pogam *et al.* 2008, Hebner *et al.* 2011, Mo *et al.* 2011, Treviño *et al.* 2011, Zeuzem *et al.* 2011, Bartels *et al.* 2013, Paolucci *et al.* 2013). En particular, el polimorfismo C316N es un ejemplo de la variabilidad a nivel de subtipos en los genotipos 1 ya que otros autores también lo han identificado con alta frecuencia en los subtipos 1b mientras que en los subtipos la con una proporción inferior al 1%

(Di Maio *et al.* 2014). La proximidad de C316 al sitio activo (diana de los IAN) y la elevada prevalencia de la sustitución C316N encontrada en nuestro trabajo podría implicar una menor efectividad de los IAN en algunos pacientes infectados por VHC subtipo 1b, según lo descrito en estudios muy recientes (Donaldson *et al.* 2014).

En resumen, nuestros resultados concuerdan con la literatura sobre otras cohortes y evidencian el alto nivel de polimorfismo de la polimerasa viral en los sitios diana de INN. En nuestro caso, se detectaron más cambios relacionados con resistencias a INN dirigidos al pulgar II, sitio alostérico (B) y a la palma II, sitio alostérico (D) de la polimerasa NS5B, y con mayor prevalencia. La presencia de este alto nivel de polimorfismo en las posiciones implicadas en la resistencia a INN podría afectar la eficacia de esta clase de AAD, por lo que (i) es recomendable el uso concomitante con otros AAD, y (ii) la secuenciación de NS5B previa a su uso podría ayudar a la elección de la subfamilia de INN más adecuada. No obstante, el impacto de cada uno de estos polimorfismos en la pérdida de susceptibilidad a los INN no es equivalente, y varios de ellos confieren un nivel de resistencia bajo ó intermedio. Por tanto, no se conoce todavía el beneficio real que tendría la secuenciación de NS5B previa al tratamiento.

Aunque hemos encontrado varias variaciones asociadas con resistencia a IP, IAN ó INN, éstas deben haber tenido lugar por mutación espontánea, ó por otro tipo de presión selectiva, ya que no hubo presión selectiva del antiviral. Conocer el número y tipo de sustituciones nucleotídicas necesarias para que cambie un aminoácido y se genere una mutación de resistencia es relevante, ya que estos parámetros definen la barrera genética para la generación de mutantes de resistencia para cada fármaco (Götte *et al.* 2012).

Observamos que las sustituciones de aminoácidos observadas en posiciones relacionadas con resistencia a IP requerían en casi todas el cambio de sólo un nucleótido: una transición para V55A, A87T, R117H, S122N, y S122G; y una transversión en V36L y S122T. Sólo uno de ellos (V170T) requería cambio de dos nucleótidos (dos transiciones). En el caso de las pocas sustituciones implicadas en resistencia a IAN, en 159, se vió cambio de uno ó de dos nucleótidos (una ó dos transiciones), y para I239L el cambio de dos

nucleótidos, una transversión y transición. Finalmente, en el caso de las sustituciones relacionadas con resistencia a INN, la mayoría de las sustituciones necesitaban del cambio de un sólo nucleótido: en los codones 338, 389, 452, 499, 556 (una transición), 368, 414 y 419 (una transversión). En los codones 19 y 300 la sustitución podía implicar una ó dos trasversiones, ó una transversión más una transición. Finalmente en los codones 421, 424 y 531 se encontraron una ó dos transiciones.

En resumen, la mayoría de las sustituciones observadas habrían necesitado sólo un cambio de nucleótido (baja barrera genética), en especial para la posiciones relacionadas con desarrollo de resistencia a IP e INN. En el caso de los IP, las sustituciones encontradas no están relacionadas con un alto nivel de resistencia, pero para los INN, varias sustituciones sí lo están. Globalmente, nuestras observaciones concuerdan con las realizadas en cohortes de otros países (Bartels *et al.* 2013, Cento *et al.* 2012, Castilho *et al.* 2011, Di Maio *et al.* 2014, Götte *et al.* 2012, Kukulj *et al.* 2005, McCown *et al.* 2008, Sarrazin y Zeuzem 2010). Para los IAN, las sustituciones encontradas en los codones I239 y L159, recientemente asociados con resistencia, requieren dos cambios de nucleótidos, pero en algún caso para el codón L159 sólo uno. En estos pocos casos, estas sustituciones podrían favorecer la aparición de resistencia a sofosbuvir o mericitabina.

En la segunda parte de esta Tesis Doctoral evaluamos la presencia de mutantes minoritarias en la “cuasiespecie” del VHC relacionadas con resistencia a AAD. La secuenciación directa Sanger de productos de PCR tiene una limitación de sensibilidad para la detección de genomas minoritarios con mutaciones de resistencia presentes en la población de la “cuasiespecie” viral, sólo detectables mediante el análisis de clones moleculares ó técnicas de secuenciación masiva de nueva generación. Este aspecto es importante, porque estas variantes minoritarias detectables sólo mediante técnicas de alta sensibilidad podrían pasar en algún momento a ser población mayoritaria, por ejemplo cuando exista la presión de selección por el tratamiento con AAD (Sarrazin y Zeuzem 2010, Thompson y McHutchison 2009, Kieffer *et al.* 2010). Además de encontrar todas las variantes detectadas por secuenciación directa, en el análisis de clones moleculares encontramos variantes minoritarias

relacionadas con resistencia a IP, IAN e INN y algunos polimorfismos cuyo efecto es desconocido, que habían pasado inadvertidas en la secuenciación estándar.

En posiciones relacionadas con resistencia a IP encontramos diversas variantes a una frecuencia entre el 2,7 y el 9,5% en la “cuasiespecie”: V36L (resistencia a TPV, BOC y VPV) V55A y A87T (resistencia a TPV, BOC, y SOV), Q80H (resistencia a TPV, BOC, SMV, ASV, DNV, VPV y SOV), R109K (resistencia a TPV y BOC), S122G/T/N (resistencia a SMV), y V158M. Algunas de estas mutaciones minoritarias (p.ej. V55A) ha sido identificada en pacientes tratados con BOC pero nosotros la hemos detectado en ausencia de exposición al antiviral.

En cuanto a posiciones asociadas con la resistencia a inhibidores de la polimerasa, sólo un aislado de un paciente presentó una variante minoritaria resistente a IAN, mientras que todas las demás variantes minoritarias detectadas por secuenciación clonal fueron variantes resistentes a INN. Se detectaron las mutaciones A300T, M71V, I462T, A442T y S556G con una frecuencia entre el 3-19%, pero llama la atención que la mutación R531K ocurrió en un paciente en hasta un 38% de los clones moleculares.

Las mutaciones minoritarias implicadas en resistencia a IP sólo necesitaron de una transversión para V36L, Q80H y S122T ó una transición para V55A, A87T, R109K, V158M y S122N/G. Mientras que los tipos de cambio de nucleótidos en las variantes minoritarias V36L, Q80H había sido ya descritos previamente por *Bartels et al.* (2013), los demás no han sido descritos con anterioridad.

En el caso de mutaciones minoritarias de resistencia a inhibidores de la polimerasa, la única encontrada relacionada con IAN (S282R) se debió a la transversión de un nucleótido y no ha sido descrita hasta el momento. El resto de mutaciones minoritarias, relacionadas con resistencia a INN, se debió a la transición de un nucleótido M71V, A300T, A442T, 462T, R531K, y S556G. De todos ellos, sólo el cambio en el codón 556 ha sido descrito previamente por *Bartels et al.* (2013) en un estudio realizado en aislados de pacientes, y por *Di Maio et al.* (2014) en el análisis de secuencias de bases de datos.

De acuerdo al número y tipo de sustituciones nucleotídicas encontradas en las variantes minoritarias asociadas a resistencia a AAD, éstas se asocian

frecuentemente a una barrera genética baja en el caso de IP, e INN, ya que en la mayoría sólo una sustitución de nucleótido dió como resultado el cambio de aminoácido. En el caso de IAN, sólo se detectó la variante minoritaria S282R, y en un sólo paciente, y aunque ésta también parecía originada por un sólo cambio de nucleótido, se desconoce con exactitud su efecto en la resistencia a IAN (Gaudieri *et al.* 2009).

En definitiva, en este trabajo hemos detectado variantes minoritarias relacionadas con resistencia a AAD en aislados de pacientes nunca tratados, que afectan sobretodo a la sensibilidad a INN. Nuestros resultados son similares a los de otros autores que han utilizado la secuenciación de clones moleculares (Le Pogam *et al.* 2008, Franco 2011, Le Pogam *et al.* 2012). Aunque en el caso del VIH la presencia de variantes minoritarias con resistencia se asocia al fracaso de algunos regímenes antiretrovirales (Li *et al.* 2013), se desconoce si las variantes minoritarias resistentes identificadas en este trabajo podrán ser seleccionadas, provocar fallo terapéutico y persistir a largo plazo en mayor ó menor proporción tras el tratamiento con AAD (Susser *et al.* 2011). Sin embargo, queda todavía por determinar si el análisis de la secuencia genotípica con métodos de alta sensibilidad como el análisis de clones moleculares u otros menos tediosos basados en ultrasecuenciación serán útiles para evaluar la respuesta a AAD, aunque posiblemente esto dependerá de la potencia y eficacia del régimen de AAD aplicado (Schneider y Sarrazin 2014).

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al número y porcentaje de cambios de aminoácido en posiciones asociadas a resistencia a IP, IAN, ó INN entre los aislados de los pacientes inmunocompetentes del Hospital La Fe y del HUGTIP, ó los aislados de los pacientes inmunodeprimidos del Hospital La Fe, lo que indica que no hay una prevalencia distinta de estas mutaciones ó polimorfismos entre pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos, ni entre pacientes de Valencia ó Badalona. Tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto al número y porcentaje de variantes minoritarias entre aislados de pacientes inmunocompetentes y ó inmunodeprimidos, lo que sugiere que no hay una

mayor ó menor generación de variantes minoritarias en la “cuasiespecie” del VHC en función de la inmunosupresión, aunque el número de pacientes que hemos podido analizar es bastante limitado. En resumen, ni la localización geográfica (Valencia ó Badalona), ni el uso de inmunosupresión en pacientes trasplantados hepáticos, tuvo impacto en la prevalencia ó emergencia de mutaciones de resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 polimerasa NS5B como polimorfismos naturales en pacientes infectados por el VHC subtipo 1b.

En la tercera parte de esta Tesis Doctoral, se evaluaron medidas cuantitativas de la heterogeneidad genética y polimorfismos de la proteasa NS3 y polimerasa NS5B del VHC-1b. Aunque se ha generado en la literatura bastante información sobre los polimorfismos naturales del VHC implicados en resistencia a AAD, existen pocos análisis sobre el origen de dicha variación y qué fuerzas evolutivas están detrás de estos polimorfismos.

Los valores de heterogeneidad genética y polimorfismo del VHC fueron similares entre los pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes, y entre los pacientes del Hospital la Fe y HUGTIP, tanto para la región de la proteasa NS3 como para la región de la polimerasa NS5B. No parece, que la heterogeneidad genética global del VHC-1b en estas regiones esté influenciada con la inmunosupresión (disminución en la respuesta inmune celular), ni que difiera globalmente entre los aislados de Valencia ó Badalona.

En las 60 secuencias del VHC-1b analizadas pudimos determinar que, a lo largo tanto de la proteasa NS3 como de la polimerasa NS5B, la relación entre las tasas de sustitución no sinónimas y sinónimas (dN/dS) menores de uno sugieren una selección negativa ó purificadora, de acuerdo con la teoría de que, en general, la mayoría de proteínas parecen estar bajo selección purificadora la mayor parte del tiempo (Li *et al.* 1997).

Para determinar de forma más exhaustiva el tipo de selección también realizamos pruebas más sensibles, determinando la desviación de nuestras secuencias de la teoría neutral (Kimura 1983). En ambas regiones, los estadísticos D de Tajima, D^* y F^* , y la F_s de Fu con valores negativo mayores que 0, nos indicaron una posible desviación del modelo neutral hacia la selección direccional, pero la falta de significación estadística podría suponer también que nos encontramos bajo la presencia de selección purificadora ó

selección de fondo, pero tampoco lo podemos asegurar puesto que los valores no son significativos. De acuerdo a los resultados, parece en estas regiones se acumulan cuantos menos cambios mejor, y se eliminan aquellas mutaciones que pudieran suponer alguna desventaja. Esta idea concuerda con la función primordial que tienen la proteasa NS3 (corte de la poliproteína viral en sus unidades funcionales), como la polimerasa NS5B (replicación del genoma ARN viral) para el VHC. Seguramente cuando surgen mutaciones deletéreas, actúa la selección purificadora disminuyendo la variación de la secuencia.

Utilizando las medidas más comunes de heterogeneidad genética y polimorfismo no pudimos encontrar diferencias entre los aislados del VHC de Valencia ó Barcelona ó entre los aislados de pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos de Valencia, lo que no resulta inesperado, ya que todos los aislados eran del subtipo 1b. No obstante, existen otras metodologías más sensibles para revelar posibles diferencias en la composición genética de grupos poblacionales de organismos, tales como el análisis de la varianza molecular (AMOVA). El análisis AMOVA nos reveló una variación significativa en la composición genética entre los aislados del VHC-1b de Valencia y de Badalona, lo que podría indicar diferencias epidemiológicas locales, y que las cepas del VHC-1b circulantes en ambas ciudades son distintas. Además, el AMOVA reveló una diferencia significativa en la composición genética de los aislados de pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes, pero sólo para la polimerasa NS5B, lo que nos hace pensar en que una situación inmunológica distinta (menor presión inmune dado por la depresión farmacológica de la respuesta inmune celular) podría modificar las características genéticas del virus. Una explicación alternativa sería que estos pacientes trasplantados de mayor edad estén en realidad infectados por cepas del VHC-1b genéticamente diferenciadas a las de los pacientes inmunocompetentes, más jóvenes.

La determinación de la composición genética intrapoblacional del VHC dentro de cada paciente infectado y según sea inmunocompetente ó inmunodeprimido por trasplante hepático tiene interés para dilucidar si la inmunosupresión varía la composición genética del virus intrapaciente y si, presumiblemente, podría favorecer ó no la probabilidad de selección de

mutaciones de resistencia. En cuanto a la heterogeneidad genética y el nivel de polimorfismos, no encontramos diferencias significativas entre clones moleculares de los aislados de individuos inmunodeprimidos e inmunocompetentes, ni para la proteasa NS3 ni para la polimerasa NS5B. Aunque los valores inferiores de los pacientes inmunocompetentes en la complejidad nucleotídica de la “cuasiespecie” (*Entropía de Shannon, S_n*), tanto para la proteasa NS3 como para NS5B, hacen pensar en una mayor complejidad genética de la “cuasiespecie” bajo la inmunosupresión, no pudimos obtener significación estadística por el pequeño tamaño muestral. A lo largo de ambas proteínas, se detectó selección negativa ó purificadora ($dN/dS < 1$) para ambas regiones del virus, y la relación dN/dS parecía inferior en pacientes inmunocompetentes para la proteasa NS3, aunque tampoco obtuvimos significación estadística, por lo que no podemos concluir con certeza que la proteasa esté bajo un menor grado de selección en pacientes inmunodeprimidos.

Con respecto a los valores de los estadísticos de las diferentes pruebas de neutralidad en clones moleculares, se nos presentaron varias situaciones en la región de la proteasa NS3: 1) Individuos en los que los estadísticos son significativamente mayores a 0 y con valores negativos (dos casos para pacientes inmunocompetentes y cuatro casos para pacientes inmunodeprimidos), 2) Individuos en que los estadísticos no son significativamente mayores a 0 y presentan valores negativos (dos casos para pacientes inmunocompetentes, y un paciente inmunodeprimido), y 3) por último, en un individuo inmunocompetente los estadísticos son valores positivos mayor que 0 y no significativos.

La selección direccional parece responsable de la variabilidad intrapaciente encontrada para la proteasa NS3 en todos los pacientes menos en uno, ya que encontramos valores de D , D^* y F^* negativos, y con significación estadística en la mayoría de pacientes (cuatro pacientes inmunodeprimidos y dos pacientes inmunocompetentes). Esta selección direccional podría deberse a la presencia de mutaciones ventajosas (arrastre selectivo) ó de mutaciones deletéreas (selección de fondo). La D de Tajima y la F_s de Fu son más sensibles a la presencia de arrastre selectivo, mientras que la D^* y F^* de Fu y L_i lo son para selección de fondo (Simonsen *et al.* 1995, Fu 1997, Ramos-

Onsins y Rozas 2002). Así, cuando sólo D y F_s sean significativos estamos ante un caso de arrastre selectivo, mientras que si sólo lo son D^* y F^* estaremos ante selección de fondo ó purificadora (Jiménez-Hernández 2005). La falta de significación en la prueba de F_u nos hace pensar en una selección de fondo.

Con respecto a la región NS5B, al menos un individuo de cada grupo (inmunocompetente e inmunodeprimido), presentó los tres estadísticos (D , D^* y F^*) con valores significativamente mayor que 0 y con valor negativo, pero la prueba de F_u no fue significativa. Por tanto volvemos a encontrarnos ante el fenómeno de la selección direccional por la presencia de mutaciones deletéreas (selección de fondo o purificadora).

Si tenemos en cuenta nuestros resultados y las observaciones anteriores, todo parece apuntar a que lo más probable es que en la mayoría de los individuos tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos, se estén dando fenómenos de selección purificadora ó selección de fondo de las poblaciones virales, aunque más marcada en la proteasa NS3 y en pacientes inmunodeprimidos, lo que es bastante plausible, conociendo el papel fundamental de esta proteína para el ciclo de vida del virus. Alternativamente, esta situación se podría haber producido en los pacientes inmunodeprimidos por un aumento del tamaño poblacional de la “cuasiespecie” del virus debido a dos factores: i) el cuello de botella que representa la infección del nuevo hígado trasplantado y ii) el aumento de la replicación del virus gracias a la inmunosupresión.

Los resultados obtenidos con el análisis de la varianza molecular (AMOVA) nos permiten intuir que existe una variación genética intrapoblacional del VHC (ó diversidad de “cuasiespecies” intrapaciente) diferente entre individuos inmunocompetentes y trasplantados inmunodeprimidos, tanto para la proteasa NS3 como para polimerasa NS5B. Desconocemos el posible impacto de esta evolución diferencial del virus en la potencial selección y/o fijación en el tiempo de mutaciones de resistencia en caso de fallo terapéutico a AAD.

Aunque los valores de dN/dS (ω) a lo largo de las regiones de la proteasa NS3 y polimerasa NS5B nos indicaban globalmente una selección negativa a lo largo de la proteína, es posible que algunos aminoácidos en particular estén seleccionados positivamente, favoreciéndose la fijación de cambios de aminoácido, y que éstos se correspondan con posiciones relacionadas con algún tipo de resistencia a AAD. En el análisis de selección codón por codón de los 60 aislados analizados, los resultados de la aproximación FEL indican que ningún codón de la proteasa NS3 está bajo selección positiva y 160 están bajo selección negativa, y que en la región NS5B 12 codones se encuentran bajo selección positiva y 324 bajo selección negativa. La presencia de selección negativa ó purificadora en la mayoría de los codones parece ser por tanto la principal influencia sobre la evolución de NS3 y NS5B, como ya hemos comentado, de acuerdo a su función imprescindible en el ciclo de vida del virus. Los dos codones de NS5B que evolucionan bajo el efecto de la selección positiva (300 y 556) se encuentran implicados en resistencia a INN, por lo que la fijación de mutaciones en estas dos posiciones podría verse favorecida en presencia de estos fármacos.

El análisis de diversificación de selección episódica a nivel de codón entre las distintas variantes del virus presentes dentro de cada paciente (intrapaciente) con el método MEME nos permitió identificar selección episódica en los codones NS3-116 y NS3-171 de dos de los diez pacientes seleccionados para el análisis de “cuasiespecie”, pero estos codones no están implicados en posiciones con resistencia a IP. En cambio, identificamos un total de 23 codones bajo selección episódica en NS5B de los cuales dos de ellos están implicados con resistencia a INN: M426 y R531, cada uno presente en los clones moleculares de un aislado de un paciente inmunocompetente e inmunodeprimido, respectivamente. Estas posiciones podrían conferir una ventaja adaptativa y verse favorecidas la fijación de mutaciones en presencia de INN.

En la cuarta parte de esta Tesis Doctoral se realizó un estudio filogenético con el fin de determinar el aislado de referencia más parecido a nuestras secuencias, y si algún perfil particular de polimorfismos en sitios asociados a resistencia a AAD estaba relacionado con algún agrupamiento filogenético, lo que indicaría alguna relación original de esas secuencias, ó la circulación de algún clado del VHC-1b con un perfil de resistencia a AAD concreto. También se buscaron patrones de coevolución molecular entre aminoácidos de las dos dianas de AAD estudiadas, a nivel intra e intermolecular.

En el árbol filogenético de la región NS3 se observó que las mutaciones de resistencias a IP y polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia a IP encontradas en algunos de los 60 aislados de pacientes se distribuyeron a lo largo del árbol sin formar clados diferenciables por poseer una determinada mutación. La mayoría de los aislados se distribuyen junto a la secuencia de referencia HPCJTA 1b.

En el árbol filogenético de la región NS5B se observó que las mutaciones de resistencia a IAN encontradas en algunos aislados y las mutaciones de resistencia a INN se distribuyeron a lo largo del árbol formándose dos perfiles, aunque no filogenéticamente distintos. Por un lado algunos aislados se distribuyeron formando un grupo cerca de la secuencia de referencia HPCJTA, estos aislados tenían las mutaciones de resistencia a INN: T19S, C316N y A338V, y algunos aislados la mutación L159F con resistencia a IAN. Mientras que los demás aislados formaron otro grupo con las mutaciones: T19S, A300T y A338V con resistencia a INN, y se distribuyeron cerca de las secuencias de referencia EU781827 y EU781828.

Cabe destacar que al realizar el análisis filogenético con las regiones NS3 y NS5B concatenadas obtuvimos una mejor señal filogenética relacionando todos nuestros aislados menos uno como cercanos a las secuencias de referencia EU781827 1b y EU781828 1b (relacionada con el replicon Con1), independientemente de si correspondían a pacientes de Valencia ó Badalona ó de pacientes inmunocompetentes ó inmunodeprimidos. En esta filogenia con las secuencias concatenadas, al examinar simultáneamente los polimorfismos en todas las posiciones relacionadas con resistencias (ya fuese a IP, IAN ó INN), se observaron también secuencias que se diferencian por el

polimorfismo NS5B C316N por un lado y por otro el A300T (parte inferior del árbol), ambos relacionados con resistencia a INN. Sin embargo, no pudimos distinguir ningún grupo filogenético (clado) que diferenciase los aislados con estos dos polimorfismos de NS5B. Tampoco encontramos ningún clado que diferenciase las pocas mutaciones de resistencia a IP e IAN encontradas en nuestros aislados por lo que los polimorfismos naturales en posiciones asociadas con resistencia a AAD no parecen asociadas a ningún clado concreto ó diferencial.

Por otra parte, el análisis filogenético con las secuencias de los clones moleculares nos permitió evaluar si las variantes minoritarias en las “cuasiespecies” de cada paciente (poblaciones virales intrapaciente) con polimorfismos relacionados con resistencias tenían un origen común dentro de la cuasiespecie. Los resultados de este análisis intrapoblacional sugieren que las variantes minoritarias con mutaciones de resistencias a IP (filogenia de NS3), ó para IAN e INN (filogenia de NS5B) son generadas continuamente de forma aleatoria y no generan, en general, clados diferenciales en la “cuasiespecie” intrapaciente, ni en aislados de pacientes inmunocompetentes, ni de inmunodeprimidos.

En el último análisis de esta Tesis Doctoral, nos preguntamos si los polimorfismos naturales en nuestras secuencias la proteasa NS3 y polimerasa NS5B del VHC pueden estar relacionados con mutaciones compensatorias que coevolucionan, manteniendo ó favoreciendo la eficacia biológica del virus (*fitness*). Ante la aparición de una mutación que reduce el *fitness*, es probable que se necesite de alguna otra compensatoria (secundaria) para que el mutante pueda propagarse satisfactoriamente en la población viral. El éxito de un antiviral está muy influenciado por su habilidad para inhibir todas las variantes virales minimizando la emergencia de mutantes y de mutaciones compensatorias (Halfon y Locarnini 2011, Kieffer *et al.* 2010).

En el análisis de coevolución de la proteína NS3 se encontraron siete aminoácidos en coevolución, de los cuales las posiciones 87 y 117 están relacionados con resistencia a IP (TPV y BOC), y se detectó el aminoácido en la posición 86, asociado a mutaciones compensatorias para resistencias a IP coevoluciona junto al aminoácido en la posición 87. Este resultado obtenido

podría tener un impacto en el *fitness* viral. En la proteína NS5B las posiciones 300 y 451 (implicados en resistencia a INN) están presentes en varios grupos de aminoácidos en coevolución, y a su vez coevolucionan juntos. Estas posiciones en particular presentaron cambios de aminoácidos en las 60 secuencias analizadas (A300T/S y C451Y/H/N). Nuestros resultados en su conjunto indican que las posiciones NS3-87 y NS3-117 relacionadas con resistencia a IP coevolucionan y que NS5B-A300T relacionada con resistencia a INN va acompañada indefectiblemente de NS5B-C451Y/H/N para mantener el *fitness*.

Además pudimos identificar que la posición NS3-89 (implicada en una mayor eficiencia replicativa) y la posición NS3-117 (relacionada con resistencia a IP) coevolucionan con la posición NS5B-300 relacionada con resistencia a INN. Además NS3-117 también coevoluciona junto a otras posiciones implicadas en resistencia a INN: NS5B-451 y 426. De esta manera, podemos especular que ciertas mutaciones de resistencia a IP en NS3 podrían favorecer la selección de mutaciones de resistencia a INN en NS5B, ó viceversa. Otros autores también han detectado coevolución de varias posiciones a lo largo de la poliproteína del virus (incluida NS3 y NS5B), en relación a la respuesta al tratamiento con peg-IFN+RBV (Lara *et al.* 2011). La identificación de coevolución de posiciones aminoacídicas implicadas en resistencia a diferentes clases de AAD, podría tener alguna implicación clínica en el futuro.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral nos permiten concluir que, para los aislados del VHC subtipo 1b de pacientes con infección crónica en nuestra área geográfica:

1. Existe una prevalencia significativa de polimorfismos naturales en posiciones relacionadas con resistencia a AAD, en especial a los inhibidores de la polimerasa no nucleosídicos (INN).

2. La prevalencia de polimorfismos del VHC-1b en posiciones relacionadas con resistencia a los AAD es similar en aislados de pacientes inmunodeprimidos ó inmunocompetentes, como también entre aislados de dos localidades distintas del Área Mediterránea (Valencia y Badalona).

3. En la región de la proteasa NS3, no se identificaron las principales mutaciones de resistencia a boceprevir o telaprevir (R155K/T, A156V/T y V170A). Sin embargo, se identificaron las variaciones de resistencia moderada a IP V36L, V55A, A87T, R117H, S122T/G/N, V170T con prevalencias <6%.

4. En la región de la polimerasa NS5B, no se identificaron las principales mutaciones de resistencia a IAN (S96T, N142T, S282T y L320F). Sin embargo, se identificaron las variaciones con resistencia moderada L159F y I239L en el 25% y 1,67% de los aislados, respectivamente. Aunque L159F por sí sola no confiere resistencia a IAN, su presencia podría favorecer la aparición del doble mutante L159F+L320F en un porcentaje considerable de aislados.

5. La prevalencia de polimorfismos asociados con resistencia a INN es elevada, y todos los aislados analizados tenían al menos un polimorfismo en alguna posición relacionada con resistencia. Estas variaciones fueron más frecuentes y con mayor prevalencia en el pulgar II, sitio alostérico (B) y en la palma II, sitio alostérico (D). En particular, la mutación C316N (asociada con resistencia a los INN dirigidos a los sitios alostéricos C y D de la polimerasa), fue elevada (50%), y su localización más cercana al sitio activo sugiere que podría también afectar a la efectividad de IAN como el sofosbuvir.

6. El análisis intrapaciente de clones moleculares de la proteasa NS3 y polimerasa NS5B detecta variantes minoritarias en la “cuasiespecie” del virus, no detectables mediante secuenciación directa estándar, y algunas asociadas con resistencia a IP, IAN e INN. El uso de técnicas alternativas a la clonación, como la secuenciación masiva, puede ser útil en el seguimiento de estas mutaciones minoritarias.

7. De acuerdo al número y tipo de sustituciones nucleotídicas encontradas en codones de NS3 y NS5B del VHC-1b asociados a resistencia a AAD, la mayoría de ellas presentan una barrera genética baja, ya que sólo con un cambio de nucleótido se ha podido generar el cambio de aminoácido.

8. A lo largo de ambas proteínas estudiadas, se encuentra selección natural negativa ó purificadora. Lo mismo parece ocurrir a nivel intrapoblacional en la “cuasiespecie”, donde las pruebas de neutralidad confirman una desviación del modelo neutral, sobre todo para la proteasa NS3 y en condiciones de inmunosupresión, que sugieren la presencia de fenómenos de selección direccional (selección de fondo), ó alternativamente un aumento del tamaño poblacional.

9. Las variancias génicas del VHC-1b en NS3 y NS5B es similar entre pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos de la misma área geográfica, pero distinta entre pacientes de áreas geográficas distintas, lo que sugiere alguna diferencia en la composición genética de ambas poblaciones. La implicación práctica de este fenómeno se desconoce.

10. Todos los codones de la proteasa NS3 y la mayoría de los de la polimerasa NS5B parecen sometidos a selección negativa ó purificadora, de acuerdo a su función imprescindible en el ciclo de vida del virus. De los 12 codones de NS5B bajo selección positiva, dos (300 y 556) se encuentran implicados en resistencia a INN, por lo que la fijación de mutaciones en estas dos posiciones podría verse favorecida en presencia de estos fármacos. A nivel intrapoblacional, dos codones de la polimerasa NS5B implicados con resistencia a INN (M426 y R531) presentan evidencia de diversificación episódica, lo que podría indicar que los cambios le confieren una ventaja adaptativa a estas variantes dentro de la “cuasiespecie”.

11. Las mutaciones de resistencia a IP, IAN e INN no forman grupos filogenéticos concretos. Lo mismo ocurre a nivel intrapaciente con las variantes mayoritarias y minoritarias presentes en la “cuasiespecie” (clones moleculares) de la población viral.

12. Algunos aminoácidos relacionados con resistencia a IP (NS3 86, 87, 117) y a INN (NS5B 300, 421, 426, 451) coevolucionan con otros, bien a nivel intraproteína ó a nivel interproteína, posiblemente para mantener el *fitness* viral. Podemos especular que ciertas mutaciones de resistencia a IP en NS3 podrían favorecer la selección de mutaciones de resistencia a INN en NS5B, ó viceversa.

13. Ni la localización geográfica (Valencia ó Badalona), ni el uso de inmunosupresión en pacientes trasplantados hepáticos, parece tener impacto en la prevalencia de polimorfismos asociados con resistencia a AAD inhibidores de la proteasa NS3 ó de la polimerasa NS5B en pacientes infectados por el VHC subtipo 1b, estos resultados hacen preveer eficacia similares de regímenes basados en AAD.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, Johnson RG, Barbosa LH, Nemo GJ. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med.* 1991 Nov; 7;325(19):1325-9.
- AASLD/ISDA (Acceso Junio 2014). <http://www.hcvguidelines.org/>
- Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 2007 Apr;125(1):88-97.
- Agencia Europea del Medicamento (EMA). (Acceso Junio 2014). http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002777/human_med_001766.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
- Aguilera A, Alba JM, Lamas LM, Suárez ML, Galán JC. A review on new commercial methods for HIV-1 and HCV viral load determinations. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 Jan;28 Suppl 1:62-7.
- Ahmed-Belkacem A, Ahnou N, Barbotte L, Wychowski C, Pallier C, Brillet R, Pohl RT, Pawlotsky JM. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology.* 2010 Mar;138(3):1112-22
- Akhavan S, Schnuriger A, Lebray P, Benhamou Y, Poynard T, Thibault V. Natural variability of NS3 protease in patients infected with genotype 4 hepatitis C virus (HCV): implications for antiviral treatment using specifically targeted antiviral therapy for HCV. *J Infect Dis.* 2009 Aug 15;200(4):524-7.
- Ali S, Leveque V, Le Pogam S, Ma H, Philipp F, Inocencio N, Smith M, Alker A, Kang H, Najera I, Klumpp K, Symons J, Cammack N, Jiang WR. Selected replicon variants with low-level in vitro resistance to the hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitor PSI-6130 lack cross-resistance with R1479. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(12):4356-69.
- Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet.* 1975; 1;2(7940):838-841.
- Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet.* 1978 Mar 4;1(8062):459-63.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med.* 1989; 321: 1494-500.
- Alves R, Queiroz AT, Pessoa MG, da Silva EF, Mazo DF, Carrilho FJ, Carvalho-Filho RJ, de Carvalho IM. The presence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in Hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. *J Viral Hepat.* 2013 Jun;20(6):414-21.
- Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol.* 2011 Mar-Apr;8(2):258-69.

- American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011;54(4):1433–44.
- American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) and Infectious Diseases Society of America (IDSA). Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. AASLD, IDSA Alexandria; 2014. (Acceso Marzo 2014) http://www.hcvguidelines.org/sites/default/files/full_report.pdf
- André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Bréchet C, Paranhos-Baccalà G, Lotteau V. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol*. 2002 Jul;76(14):6919-28.
- André P, Perlemuter G, Budkowska A, Bréchet C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis*. 2005 Feb;25(1):93-104.
- Anisimova M, Kosiol C. Investigating protein-coding sequence evolution with probabilistic codon substitution models. *Mol Biol Evol*. 2009 Feb;26(2):255-71.
- Ansaldi F, Bruzzone B, Salmaso S, Rota MC, Durando P, Gasparini R, Icardi G. Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. *J Med Virol*. 2005 Jul;76(3):327-32.
- Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, Engel U, Bartenschlager R. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*. 2008 Mar 28;4(3):e1000035.
- Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in hepatitis C virus nonstructural proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 23;448(1):56-62.
- Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med*. 2006 May 16;144(10):705-14.
- Artini M, Natoli G, Avantaggiati ML, Balsano C, Chirillo P, Costanzo A, Bonavita MS, Levvero M. Detection of replicative intermediates of viral RNA in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C virus carriers. *Arch Virol Suppl*. 1993;8:23-9.
- Asselah T, Benhamou Y, Marcellin P. Protease and polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C. *Liver Int*. 2009 Jan;29 (Suppl 1):57-67.
- Asselah T, Marcellin P. Direct acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis C: one pill a day for tomorrow. *Liver Int*. 2012 Feb;32 Suppl 1:88-102.
- Backus LI, Boothroyd DB, Phillip BR, Belperio P, Halloran J, Mole LA. A sustained virologic response reduces risk of all-cause mortality in patients with hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jun;9(6):509-516.e1.
- Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R; HCV RESPOND-2 Investigators. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011 Mar 31;364(13):1207-17.

- Bader T, Fazili J, Madhoun M, Aston C, Hughes D, Rizvi S, Seres K, Hasan M. Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *Am J Gastroenterol*. 2008 Jun;103(6):1383-9.
- Bae A, Sun SC, Qi X, Chen X, Ku K, Worth A, Wong KA, Harris J, Miller MD, Mo H. Susceptibility of treatment-naive hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec;54(12):5288-97.
- Bain C, Parroche P, Lavergne JP, Duverger B, Vieux C, Dubois V, Komurian-Pradel F, Trépo C, Gebuhrer L, Paranhos-Baccala G, Penin F, Inchauspé G. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2004 Oct;78(19):10460-9.
- Ball JK, Tarr AW, McKeating JA. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. *Antiviral Res*. 2014 May;105:100-11.
- Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*. 1971;35 (3): 235–41.
- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Bréchet C. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1200-5.
- Barbotte L, Ahmed-Belkacem A, Chevaliez S, Soulier A, Hézode C, Wajcman H, Bartels DJ, Zhou Y, Ardzinski A, Mani N, Rao BG, George S, Kwong A, Pawlotsky JM. Characterization of V36C, a novel amino acid substitution conferring hepatitis C virus (HCV) resistance to telaprevir, a potent peptidomimetic inhibitor of HCV protease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jun;54(6):2681-3.
- Barnard RJ, Howe JA, Ogert RA, Zeuzem S, Poordad F, Gordon SC, Ralston R, Tong X, Sniukiene V, Strizki J, Ryan D, Long J, Qiu P, Brass CA, Albrecht J, Burroughs M, Vuocolo S, Hazuda DJ. Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two phase 3 boceprevir clinical studies. *Virology*. 2013 Sep;444(1-2):329-36.
- Barretto N, Sainz B Jr, Hussain S, Uprichard SL. Determining the involvement and therapeutic implications of host cellular factors in hepatitis C virus cell-to-cell spread. *J Virol*. 2014 May;88(9):5050-61.
- Bartels DJ, Zhou Y, Zhang EZ, Marcial M, Byrn RA, Pfeiffer T, Tigges AM, Adiwijaya BS, Lin C, Kwong AD, Kieffer TL. Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3/4A protease inhibitors in treatment-naive subjects. *J Infect Dis*. 2008 Sep 15;198(6):800-7.
- Bartels D, Jiang M, Zhang E, Tigges A, Sullivan J, Dorrian J, Spanks J, Ardzinski A, Nicolas O, Bedard J, Kwong A, Kieffer T. Characterization of HCV variants in genotype 1 patients administered VX-222, a non-nucleoside polymerase inhibitor. 5th International Workshop of Hepatitis C Resistance and New Compounds, Boston, MA. 2010.
- Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges AM, Dorrian JL, De Meyer S, Takemoto D, Dondero E, Kwong AD, Picchio G, Kieffer TL. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naive patients prior to treatment. *J Virol*. 2013 Feb;87(3):1544-53.

- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2000 Jul;81(Pt 7):1631-48. Review
- Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* 2011 Feb;19(2):95-103.
- Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* 2003 Oct 17;278(42):41003-12.
- Barth H, Liang TJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology.* 2006 Sep;44(3):527-35.
- Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA, Navas S, Carreño V. Detection of hepatitis C virus RNA in serum and peripheral blood mononuclear cells. *J Hepatol.* 1993;17 Suppl 3:S90-3.
- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24;278(43):41624-30.
- Beaulieu PL. Recent advances in the development of NS5B polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infection. *Expert Opin Ther Pat.* 2009 Feb;19(2):145-64.
- Beinhardt S, Rasoul-Rockenschaub S, Scherzer TM, Ferenci P. Silibinin monotherapy prevents graft infection after orthotopic liver transplantation in a patient with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2011 Mar;54(3):591-2; author reply 592-3.
- Belda O, Targett-Adams P. Small molecule inhibitors of the hepatitis C virus-encoded NS5A protein. *Virus Res.* 2012; 170: 1–14
- Belshaw R, Gardner A, Rambaut A, Pybus OG. Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends Ecol Evol.* 2008 Apr;23(4):188-93.
- Benedicto I, Molina-Jiménez F, Bartosch B, Cosset FL, Lavillette D, Prieto J, Moreno-Otero R, Valenzuela-Fernández A, Aldabe R, López-Cabrera M, Majano PL. The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol.* 2009 Aug;83(16):8012-20.
- Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, Hildt E, Luo G, McLauchlan J, Baumert TF, Schuster C. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology.* 2010 Jan;51(1):43-53.
- Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V, Lebray P, De Backer K, De Meyer S, Ghys A, Luo D, Picchio GR, Beumont M. J Telaprevir activity in treatment-naive patients infected hepatitis C virus genotype 4: a randomized trial. *Infect Dis.* 2013 Sep;208(6):1000-7.
- Berger KL, Cooper JD, Heaton NS, Yoon R, Oakland TE, Jordan TX, Mateu G, Grakoui A, Randall G. Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 5;106(18):7577-82.

- Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA, Randall G. Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *J Virol*. 2011 Sep;85(17):8870-83.
- Berman M, Alter HJ, Ishak KG, Purcell RH, Jones EA. The chronic sequelae of non-A, non-B hepatitis. *Ann Int Med*. 1979; 91:1-6.
- Besse B, Coste-Burel M, Bourgeois N, Feray C, Imbert-Marcille BM, André-Garnier E. Genotyping and resistance profile of hepatitis C (HCV) genotypes 1-6 by sequencing the NS3 protease region using a single optimized sensitive method. *J Virol Methods*. 2012 Oct;185(1):94-100.
- Bianco A, Reghellin V, Donnici L, Fenu S, Alvarez R, Baruffa C, Peri F, Pagani M, Abrignani S, Neddermann P, De Francesco R. Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase III α -dependent PI4P is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002576.
- Biermer M, Berg T. Rapid suppression of hepatitis C viremia induced by intravenous silibinin plus ribavirin. *Gastroenterology*. 2009 Jul;137(1):390-1.
- Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology*. 2006 Jul;44(1):15-22. Review.
- Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology*. 2008 Jan;47(1):321-31. Review.
- Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. 2006 Jul;80(14):6964-72.
- Blight KJ. Charged residues in hepatitis C virus NS4B are critical for multiple NS4B functions in RNA replication. *J Virol*. 2011 Aug;85(16):8158-71.
- Block T, Mehta A, Fimmel C, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2003; 22:5093-5107.
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnisch SA. 'New' antigen in leukemia sera. *J. Am. Med. Assoc*. 1965; 191: 541-546.
- Blumberg BS, Gerystley BJS, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Int Med*. 1967; 66: 924-931.
- Blumer G. Infectious Jaundice in the United States. *The Journal of the American Association*. 1923; Vol. 81, 5: 353.
- Boesecke C, Vogel M. HIV and hepatitis C co-infection: acute HCV therapy. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011 Nov;6(6):459-64.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990 Mar;28(3):495-503.
- Borawski J, Troke P, Puyang X, Gibaja V, Zhao S, Mickanin C, Leighton-Davies J, Wilson CJ, Myer V, Cornellataracido I, Baryza J, Tallarico J, Joberty G, Bantscheff M, Schirle M,

- Bouwmeester T, Mathy JE, Lin K, Compton T, Labow M, Wiedmann B, Gaither LA. Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol*. 2009 Oct;83(19):10058-74.
- Boson B, Granio O, Bartenschlager R, Cosset FL. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog*. 2011 Jul;7(7):e1002144.
- Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratnier M, Targett-Adams P, Lavergne JP, Penin F, McLauchlan J. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem*. 2006 Aug 4;281(31):22236-47.
- Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol*. 2007 Aug;88(Pt 8):2204-13.
- Bourlière M, Khaloun A, Wartelle-Bladou C, Oules V, Portal I, Benali S, Adhoute X, Castellani P. Chronic hepatitis C: treatments of the future. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011 Dec;35 Suppl 2:S84-95.
- Bradley DW, Cook EH, Maynard JE, McCaustland KA, Ebert JW, Dolana GH, Petzel RA, Kantor RJ, Heilbrunn A, Fields HA, Murphy BL. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol*. 1979;3(4):253-69.
- Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Cook EH, Ebert JW, McCaustland KA, Schable CA, Fields HA. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis*. 1983 Aug;148(2):254-65.
- Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterol*. 1985; 88:773-779.
- Bradley DW, Maynard JE. Etiology and natural history of post-transfusion and enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Semin Liver Dis*. 1986 Feb;6(1):56-66.
- Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis*. 2005 Feb;25(1):105-17. Review.
- Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*. 1980 Jul 31;286(5772):533-5.
- Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, Timpe JM, Krieger SE, Baumert TF, Tellinghuisen TL, Wong-Staal F, Balfe P, McKeating JA. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol*. 2011;85(1):596-605
- Bronowicki JP, Vetter D, Uhl G, Hudziak H, Uhrmacher A, Vetter JM, Doffoel M. Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients. *J Infect Dis*. 1997;176(2):518-22.

- Brown, NA, Vig, P, Ruby, E, Muchnik, A, Pottorff, E, Knox, SJ, Febbraro, S, Wargin, W, Molvadgaard, T, Jones, A, and Colonno, R. Safety and pharmacokinetics of PPI-461, a potent new hepatitis C virus NS5A inhibitor with pan-genotype activity. *Hepatology*. 2010; 52: 879A–880A.
- Bruguera M, Forns X. Hepatitis C in Spain. *Med Clin (Barc)*. 2006 Jun 17;127(3):113-7.
- Bryson PD, Cho NJ, Einav S, Lee C, Tai V, Bechtel J, Sivaraja M, Roberts C, Schmitz U, Glenn JS. A small molecule inhibits HCV replication and alters NS4B's subcellular distribution. *Antiviral Res*. 2010 Jul;87(1):1-8.
- Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis*. 1995 Feb;15(1):41-63.
- Carrère-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol*. 2002;76:3720–3730.
- Carrère-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, Belouzard S, Penin F, Dubuisson J. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem*. 2004;279:41384–41392.
- Castilho MC, Martins AN, Horbach IS, Perez Rde M, Figueiredo FA, Pinto Pde T, Nabuco LC, Lima DB, Tanuri A, Porto LC, Ferreira Júnior Oda C. Association of hepatitis C virus NS5B variants with resistance to new antiviral drugs among untreated patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Dec;106(8):968-75.
- Castillo I, Pardo M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Rodríguez-Iñigo E, de Lucas S, Salas C, Jiménez-Heffernan JA, Pérez-Mota A, Graus J, López-Alcorocho JM, Carreño V. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis*. 2004 Jan 1;189(1):7-14.
- Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, Silvestry M, Kuhn RJ, Rice CM. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 4;110(23):9505-10.
- Center for Disease Control and prevention (CDC). Hepatitis C information for health professionals. (Acceso noviembre 2011). <http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/HCVfaq.htm>
- Cento V, Mirabelli C, Salpini R, Dimonte S, Artese A, Costa G, Mercurio F, Svicher V, Parrotta L, Bertoli A, Ciotti M, Di Paolo D, Sarrecchia C, Andreoni M, Alcaro S, Angelico M, Perno CF, Ceccherini-Silberstein F. HCV genotypes are differently prone to the development of resistance to linear and macrocyclic protease inhibitors. *PLoS One*. 2012;7(7):e39652.
- Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol*. 2008 Aug;82(16):8215-23.
- Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol*. 2007 Dec;81(24):13783-93

- Chang MH, Gordon LA, Fung HB. Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C. *Clin Ther*. 2012 Oct;34(10):2021-38.
- Chang TT, Young KC, Yang YJ, Lei HY, Wu HL. Hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: comparing acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1996 May;23(5):977-81.
- Chatel-Chaix L, Germain MA, Götte M, Lamarre D. Direct-acting and host-targeting HCV inhibitors: current and future directions. *Curr Opin Virol*. 2012 Oct;2(5):588-98.
- Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang H, Sakamoto N, Vuagniaux G, Parkinson T, Gallay P. The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *J Biol Chem*. 2009 Jun 19;284(25):16998-7005.
- Chen L, Sun J, Meng L, Heathcote J, Edwards AM, McGilvray ID. ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment. *J Gen Virol*. 2010 Feb;91(Pt 2):382-8.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM. How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2009a Jan;29 Suppl 1:9-14. Review.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. *Ann Hepatol*. 2009b Jan-Mar;8(1):7-12. Review.
- Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky JM. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology*. 2012a May;142(6):1303-1313.e1.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virology of hepatitis C virus infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012b Aug;26(4):381-9.
- Chinnaswamy S, Murali A, Li P, Fujisaki K, Kao CC. Regulation of de novo-initiated RNA synthesis in hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase by intermolecular interactions. *J Virol*. 2010 Jun;84(12):5923-35.
- Cho NJ, Dvory-Sobol H, Lee C, Cho SJ, Bryson P, Masek M, Elazar M, Frank CW, Glenn JS. Identification of a class of HCV inhibitors directed against the nonstructural protein NS4B. *Sci Transl Med*. 2010 Jan 20;2(15):15ra6.
- Choo QL, Kuo G, Weiner A, Wang KS, Overby L, Bradley D, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244: 359-362.
- Choo QL, Kuo G, Weiner A, Wang KS, Overby L, Bradley D, Houghton M. Identification of the major, parenteral non-A, non-B hepatitis agent (hepatitis C virus) using a recombinant cDNA approach. *Semin Liver Dis*. 1992 Aug;12(3):279-88. Review.
- Cicero DO, Barbato G, Koch U, Ingallinella P, Bianchi E, Nardi MC, Steinkühler C, Cortese R, Matassa V, De Francesco R, Pessi A, Bazzo R. Structural characterization of the interactions of optimized product inhibitors with the N-terminal proteinase domain of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protein by NMR and modelling studies. *J Mol Biol*. 1999 Jun 4;289(2):385-96.

- Ciesek S, Steinmann E, Wedemeyer H, Manns MP, Neyts J, Tautz N, Madan V, Bartenschlager R, von Hahn T, Pietschmann T. Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology*. 2009 Nov;50(5):1638-45.
- Ciesek S, von Hahn T, Colpitts CC, Schang LM, Friesland M, Steinmann J, Manns MP, Ott M, Wedemeyer H, Meuleman P, Pietschmann T, Steinmann E. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology*. 2011 Dec;54(6):1947-55.
- Cochrane A, Searle B, Hardie A, Robertson R, Delahooke T, Cameron S, Tedder RS, Dusheiko GM, De Lamballerie X, Simmonds P. A genetic analysis of hepatitis C virus transmission between injection drug users. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1212-21.
- Cockayne E. Catarrhal jaundice sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q J Med* 1912; 6:1-27.
- Codran A, Royer C, Jaeck D, Bastien-Valle M, Baumert TF, Kieny MP, Pereira CA, Martin JP. Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol*. 2006 Sep;87(Pt 9):2583-93.
- Coelmont L, Hanouille X, Chatterji U, Berger C, Snoeck J, Bobardt M, Lim P, Vliegen I, Paeshuyse J, Vuagniaux G, Vandamme AM, Bartenschlager R, Gallay P, Lippens G, Neyts J. DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One*. 2010 Oct 27;5(10):e13687.
- Colina R, Casane D, Vasquez S, García-Aguirre L, Chunga A, Romero H, Khan B, Cristina J. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2004 Jan;85(Pt 1):31-7.
- Colson P, Brouk N, Lembo F, Castellani P, Tamalet C, Gérolami R. Natural presence of substitution R155K within hepatitis C virus NS3 protease from a treatment-naïve chronically infected patient. *Hepatology* 2008; 47:766-767.
- Comis RL. The current situation: erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2005 Aug;10(7):467-70. Review
- Conte I, Giuliano C, Ercolani C, Narjes F, Koch U, Rowley M, Altamura S, De Francesco R, Neddermann P, Migliaccio G, Stansfield I. Synthesis and SAR of piperazinyl-N-phenylbenzamides as inhibitors of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Mar 15;19(6):1779-83.
- Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 1999 Apr;10(4):439-49.
- Cooper C, Lawitz EJ, Ghali P, Rodriguez-Torres M, Anderson FH, Lee SS, Bédard J, Chauret N, Thibert R, Boivin I, Nicolas O, Proulx L. Evaluation of VCH-759 monotherapy in hepatitis C infection. *J. Hepatol*. 2009, 51, 39–46.

- Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussebart L, Manix C, Olson WC, Gardner JP, Dragic T. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 28;101(39):14067-72.
- Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, Dalgard O, Dillion JF, Flisiak R, Fornis X, Frankova S, Goldis A, Goulis I, Halota W, Hunyady B, Lagging M, Largen A, Makara M, Manolakopoulos S, Marcellin P, Marinho RT, Pol S, Poynard T, Puoti M, Sagalova O, Sibbel S, Simon K, Wallace C, Young K, Yurdaydin C, Zuckerman E, Negro F, Zeuzem S. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int*. 2011 Jul;31 Suppl 2:30-60.
- Cortez KJ, Maldarelli F. Clinical management of HIV drug resistance. *Viruses*. 2011 Apr;3(4):347-78.
- Crabbé R, Vuagniaux G, Dumont JM, Nicolas-Métral V, Marfurt J, Novaroli L. An evaluation of the cyclophilin inhibitor Debio 025 and its potential as a treatment for chronic hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Feb;18(2):211-20.
- Curry S, Qiu P, Tong X. Analysis of HCV resistance mutations during combination therapy with protease inhibitor boceprevir and PEG-IFN alpha-2b using TaqMan mismatch amplification mutation assay. *J Virol Methods*. 2008 Nov;153(2):156-62.
- Dane DS, Cameron C H, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970;295: 695-698.
- Davis GL, Alter MJ, El-Serag H, Poynard T, Jennings LW. Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology*. 2010 Feb;138(2):513-21, 521.e1-6.
- de Bruijne J, Buster EH, Gelderblom HC, Brouwer JT, de Knegt RJ, van Erpecum KJ, Schalm SW, Bakker CM, Zaaijer HL, Janssen HL, Reesink HW; Netherlands Association of Gastroenterologists and Hepatologists. Treatment of chronic hepatitis C virus infection - Dutch national guidelines. *Neth J Med*. 2008 Jul-Aug;66(7):311-22. Review.
- De Francesco R, Carfi A. Advances in the development of new therapeutic agents targeting the NS3/4A serine protease or the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Oct 10;59(12):1242-62. Review.
- De Meyer S, Dierynck I, Ghys A, Beumont M, Daems B, Van Baelen B, Sullivan JC, Bartels DJ, Kieffer TL, Zeuzem S, Picchio G. Characterization of telaprevir treatment outcomes and resistance in patients with prior treatment failure: results from the REALIZE trial. *Hepatology*. 2012 Dec;56(6):2106-15.
- Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. Transmission of diseases, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med*. 1967; 125: 673-88.
- Delang L, Vliegen I, Froeyen M, Neyts J. Comparative study of the genetic barriers and pathways towards resistance of selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep;55(9):4103-13.

- Delang L, Froeyen M, Herdewijn P, Neyts J. Identification of a novel resistance mutation for benzimidazole inhibitors of the HCV RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 2012a Jan;93(1):30-8.
- Delang L, Vliegen I, Leyssen P, Neyts J. In vitro selection and characterization of HCV replicons resistant to multiple non-nucleoside polymerase inhibitors. *J Hepatol.* 2012b Jan;56(1):41-8.
- Delang L, Neyts J, Vliegen I, Abrignani S, Neddermann P, De Francesco R. Hepatitis C virus-specific directly acting antiviral drugs. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:289-320.
- Delport W, Scheffler K, Seoighe C. Models of coding sequence evolution. *Brief Bioinform.* 2009 Jan;10(1):97-109.
- Delport W, Scheffler K, Botha G, Gravenor MB, Muse SV, Kosakovsky Pond SL. CodonTest: modeling amino acid substitution preferences in coding sequences. *PLoS Comput Biol.* 2010a Aug 19;6(8). pii: e1000885.
- Delport W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky Pond SL. Datamonkey: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics.* 2010b Oct 1;26(19):2455-7.
- Di Maio VC, Cento V, Mirabelli C, Artese A, Costa G, Alcaro S, Perno CF, Ceccherini-Silberstein F. Hepatitis C virus genetic variability and the presence of NS5B resistance-associated mutations as natural polymorphisms in selected genotypes could affect the response to NS5B inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 May;58(5):2781-97.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology.* 1983a Aug;85(2):439-62. Review.
- Dienstag JL. non-A, Non-B hepatitis. II. Experimental transmission, putative virus agents and markers, and prevention. *Gastroenterology.* 1983b Sep;85(3):743-68. Review.
- Dienstag JL, Alter HJ. Non-A, non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. *Semin Liver Dis.* 1986 Feb;6(1):67-81.
- Dill MT, Duong FH, Vogt JE, Bibert S, Bochud PY, Terracciano L, Papassotiropoulos A, Roth V, Heim MH. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology.* 2011 Mar;140(3):1021-31.
- Domingo E, Sabo D, Taniguchi T, Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell.* 1978 Apr;13(4):735-44.
- Domingo E, Martin V, Perales C, Grande-Pérez A, García-Arriaza J, Arias A. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;299:51-82.
- Donaldson EF, Harrington PR, O'Rear JJ, Naeger LK. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for Sofosbuvir. *Hepatology.* 2014 [En prensa]
- Doyle SE, Schreckhise H, Khuu-Duong K, Henderson K, Rosler R, Storey H, Yao L, Liu H, Barahmand-pour F, Sivakumar P, Chan C, Birks C, Foster D, Clegg CH, Wietzke-Braun

- P, Mihm S, Klucher KM. Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes. *Hepatology*. 2006 Oct;44(4):896-906.
- Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):13910-3
- Drucker E, Alcabes PG, Marx PA. The injection century: massive unsterile injections and the emergence of human pathogens. *Lancet*. 2001 Dec 8;358(9297):1989-92.
- Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*. 2008 Apr;9(4):267-76.
- Earl J, Kirkpatrick P. Fresh from the pipeline. Ezetimibe. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Feb;2(2):97-8.
- Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 2004 Aug 19;5:113.
- Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*. 2002;76(12):5974-84.
- Eigen M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* October 1971, Volume 58, Issue 10, pp 465-523.
- Einav S, Gerber D, Bryson PD, Sklan EH, Elazar M, Maerkl SJ, Glenn JS, Quake SR. Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat Biotechnol*. 2008 Sep;26(9):1019-27
- Einav S, Sobol HD, Gehrig E, Glenn JS. The hepatitis C virus (HCV) NS4B RNA binding inhibitor clemizole is highly synergistic with HCV protease inhibitors. *J Infect Dis*. 2010 Jul 1;202(1):65-74.
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):224-30.
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. 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 Jan 11;334(2):77-81.
- Esteban JI. Treatment of acute hepatitis C. In Arroyo V, ed. *Treatment of Liver Disease*. 1999. Barcelona: Masson, 279-86.
- Esteban JI. Diagnóstico y epidemiología molecular de la infección por HCV. Documentación extraída de la 1ª Reunión de Consenso: Manejo de las hepatitis crónicas víricas en pacientes con VIH, Organizada por la Fundación FIT en Madrid el día 6 de Octubre de 2000. En: *Formación e información sobre tratamientos en el VIH/SIDA*.
- Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol*. 2008 Jan;48(1):148-62.

- European Association for the Study of the Liver (EASL) Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2011;55:245–264.
- European Association for the Study of the Liver (EASL) Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;60(2):392-420. (Acceso Junio 2014) http://www.easl.eu/_newsroom/latest-news/easl-recommendations-on-treatment-of-hepatitis-c-2014
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Technical report. Hepatitis B and C in the EU neighbourhood: prevalence, burden of disease and screening policies. September 2010. www.ecdc.europa.eu
- European center for disease prevention and control (ECDC). (Acceso noviembre 2012). http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/hepatitis_C/Pages/index.aspx
- Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* 2007 Apr 12;446(7137):801-5.
- Everson GT, Sims KD, Rodriguez-Torres M, Hezode C, Lawitz E, Bourlière M, Loustaud-Ratti V, Rustgi V, Schwartz H, Tatum H, Marcellin P, Pol S, Thuluvath PJ, Eley T, Wang X, Huang SP, McPhee F, Wind-Rotolo M, Chung E, Pasquinelli C, Grasela DM, Gardiner DF. An Interferon-Free, Ribavirin-Free 12-Week Regimen of Daclatasvir (DCV), Asunaprevir (ASV), and BMS-791325 Yielded SVR4 of 94% in Treatment-Naïve Patients with Genotype (GT) 1 Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Hepatology.* 2012; 56: 1517A
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 1992;131:479-491.
- Excoffier L. Analysis of population subdivision, p. 271-307. In: Balding, D.J., Bishop, M., and Cannings, C., eds. *Handbook of statistical genetics.* Chichester (UK): John Wiley & Sons. 2001.
- Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):103-26.
- Fares MA, Travers SA. A novel method for detecting intramolecular coevolution: adding a further dimension to selective constraints analyses. *Genetics.* 2006: 173, 9-23.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of virus like antigen associated with acute illness. *Science.* 1973; 200: 365–73.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New Engl J Med.* 1975; 292: 767-770.
- Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun.* 1983 Aug;41(2):816-21.
- Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature.* 2005 Aug 18;436(7053):967-72. Review.

- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 1981. 17: 368–376
- Ferenci P, Scherzer TM, Kerschner H, Rutter K, Beinhardt S, Hofer H, Schöniger-Hekele M, Holzmann H, Steindl-Munda P. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. *Gastroenterology*. 2008 Nov;135(5):1561-7.
- Ferenci P, Beinhardt S. Silibinin: an old drug in the high tech era of liver transplantation. *J Hepatol*. 2013 Mar;58(3):409-11.
- Fiel MI. Pathology of chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis*. 2010 Nov;14(4):555-75.
- Fishman SL, Branch AD. The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus. *Infect Genet Evol*. 2009 Dec;9(6):1158-67.. Review.
- Fletcher NF, Yang JP, Farquhar MJ, Hu K, Davis C, He Q, Dowd K, Ray SC, Krieger SE, Neyts J, Baumert TF, Balfe P, McKeating JA, Wong-Staal F. Hepatitis C virus infection of neuroepithelioma cell lines. *Gastroenterology*. 2010 Oct;139(4):1365-74
- Fletcher NF, Wilson GK, Murray J, Hu K, Lewis A, Reynolds GM, Stamataki Z, Meredith LW, Rowe IA, Luo G, Lopez-Ramirez MA, Baumert TF, Weksler B, Couraud PO, Kim KS, Romero IA, Jopling C, Morgello S, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology*. 2012;142(3):634-643.e6.
- Flint M, Mullen S, Deatly AM, Chen W, Miller LZ, Ralston R, Broom C, Emini EA, Howe AY. Selection and characterization of hepatitis C virus replicons dually resistant to the polymerase and protease inhibitors HCV-796 and boceprevir (SCH 503034). *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Feb;53(2):401-11.
- Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, Horban A, Kryczka W, Pawlowska M, Heathcote JE, Mazzella G, Vandelli C, Nicolas-Métral V, Groscurin P, Liz JS, Scalfaro P, Porchet H, Crabbé R. The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. *Hepatology*. 2009 May;49(5):1460-8.
- Flisiak R, Jaroszewicz J, Flisiak I, Łapiński T. Update on alisporivir in treatment of viral hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Mar;21(3):375-82.
- Fonseca-Coronado S, Vaughan G, Cruz-Rivera MY, Carpio-Pedroza JC, Ruiz-Tovar K, Ruiz-Pacheco JA, Escobar-Gutiérrez A. Interleukin-28B genotyping by melt-mismatch amplification mutation assay PCR analysis using single nucleotide polymorphisms rs12979860 and rs8099917, a useful tool for prediction of therapy response in hepatitis C patients. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49(7):2706-10.
- Fonseca-Coronado S, Escobar-Gutiérrez A, Ruiz-Tovar K, Cruz-Rivera MY, Rivera-Osorio P, Vazquez-Pichardo M, Carpio-Pedroza JC, Ruiz-Pacheco JA, Cazares F, Vaughan G. Specific detection of naturally occurring hepatitis C virus mutants with resistance to telaprevir and boceprevir (protease inhibitors) among treatment-naïve infected individuals. *J Clin Microbiol*. 2012 Feb;50(2):281-7.

- Food and Drug Administration (FDA). Olysio (Simeprevir) for the treatment of chronic hepatitis C in combination antiviral treatment. (Acceso abril 2014). <http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/ucm377234.htm>
- Forestier N, Larrey D, Guyader D, *et al.* Treatment of chronic hepatitis C virus (HCV) genotype 1 patients with the NS3/4A protease inhibitor ITMN-191 leads to rapid reductions in plasma HCV RNA: results of a phase 1b multiple ascending dose (MAD) study. *Hepatology* 2008; 48:1132A.
- Forestier N, Larrey D, Guyader D, Marcellin P, Rouzier R, Patat A, Smith P, Bradford W, Porter S, Blatt L, Seiwert SD, Zeuzem S. Treatment of chronic hepatitis C patients with the NS3/4A protease inhibitor danoprevir (ITMN-191/RG7227) leads to robust reductions in viral RNA: a phase 1b multiple ascending dose study. *J Hepatol.* 2011;54(6):1130-6.
- Forestier N, Zeuzem S. Telaprevir for the treatment of hepatitis C. *Expert Opin Pharmacother.* 2012 Mar;13(4):593-606.
- Forns X, Fernández-Llama P, Pons M, Costa J, Ampurdanés S, López-Labrador FX, Olmedo E, López-Pedret J, Darnell A, Revert L, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. Incidence and risk factors of hepatitis C virus infection in a haemodialysis unit. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Apr;12(4):736-40.
- Foster GR, Hézode C, Bronowicki JP, Carosi G, Weiland O, Verlinden L, van Heeswijk R, van Baelen B, Picchio G, Beumont M. Telaprevir alone or with peginterferon and ribavirin reduces HCV RNA in patients with chronic genotype 2 but not genotype 3 infections. *Gastroenterology.* 2011a Sep;141(3):881-889.e1.
- Foster TL, Gallay P, Stonehouse NJ, Harris M. Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner. *J Virol.* 2011b Jul;85(14):7460-4.
- Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 22;102(8):2986-91.
- Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, El Khoby T, Abdel-Wahab Y, Aly Ohn ES, Anwar W, Sallam I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet.* 2000; 11;355(9207):887-91.
- Frey-Settsein. How frequent is posttransfusion hepatitis after the introduction of 3rd generation donor screening for hepatitis B? What is its probable nature? *Vox Sang.* 1977;32(6)346-63
- Frick DN, Rypma RS, Lam AM, Gu B. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J Biol Chem.* 2004 Jan 9;279(2):1269-80.
- Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Sep;54(9):3641-50.

- Fridell RA, Qiu D, Valera L, Wang C, Rose RE, Gao M. Distinct functions of NS5A in hepatitis C virus RNA replication uncovered by studies with the NS5A inhibitor BMS-790052. *J Virol*. 2011a Jul;85(14):7312-20.
- Fridell RA, Wang C, Sun JH, O'Boyle DR 2nd, Nower P, Valera L, Qiu D, Roberts S, Huang X, Kienzle B, Bifano M, Nettles RE, Gao M. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: in vitro and in vivo correlations. *Hepatology*. 2011b Dec;54(6):1924-35.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002 Sep 26;347(13):975-82.
- Friedrich-Rust M, Koch C, Rentzsch A, Sarrazin C, Schwarz P, Herrmann E, Lindinger A, Sarrazin U, Poynard T, Schäfers HJ, Zeuzem S, Abdul-Khaliq H. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with Fontan circulation using transient elastography and biochemical fibrosis markers. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Mar;135(3):560-7
- Friedrich-Rust M, Rosenberg W, Parkes J, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C. Comparison of ELF, FibroTest and FibroScan for the non-invasive assessment of liver fibrosis. *BMC Gastroenterol*. 2010 Sep 9;10:103.
- Fu YX, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 1993 Mar;133(3):693-709.
- Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997 Oct;147(2):915-25.
- Fuentes J. Historia natural y manifestaciones extrahepáticas de la infección por VHC. En: Guarner C, Enriquez J. *Hepatitis C*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge, SL; 2008. p. 91-111.
- Fung J, Lai CL, Hung I, Young J, Cheng C, Wong D, Yuen MF. Chronic hepatitis C virus genotype 6 infection: response to pegylated interferon and ribavirin. *J Infect Dis*. 2008 Sep 15;198(6):808-12.
- Galbraith RM, Eddleston AL, Portmann B, Williams R, Gower PE. Chronic liver disease developing after outbreak of HBsAG-negative hepatitis in haemodialysis unit. *Lancet*. 1975 Nov 8;2(7941):886-90.
- Gallay PA, Lin K. Profile of alisporivir and its potential in the treatment of hepatitis C. *Drug Des Devel Ther*. 2013;7:105-15.
- Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, Angus PW, Ritchie B, Elston R, Ipe D, Morcos PN, Baher L, Najera I, Chu T, Lopatin U, Berrey MM, Bradford W, Laughlin M, Shulman NS, Smith PF. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet*. 2010 Oct 30;376(9751):1467-75.
- Gane EJ, Pockros P, Zeuzem S, Marcellin P, Shikhman A, Bernaards C, Yetzer E, Shulman NS, Tong X, Nájera I, Bertasso A, Hammond J, Stancic S. Interferon-free treatment with

- a combination of mericitabine and danoprevir/r with or without ribavirin in treatment-naïve HCV genotype 1-infected patients. 47th EASL, Barcelona, Spain, April 18-22, 2012. Abst. 1412.
- Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Subramanian GM, Symonds WT, McHutchison JG, Pang PS. Efficacy of nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus the NS5A inhibitor ledipasvir or the NS5B non-nucleoside inhibitor GS-9669 against HCV genotype 1 infection. *Gastroenterology*. 2014a Mar;146(3):736-743.e1.
- Gane EJ, Pockros PJ, Zeuzem S, Marcellin P, Shikhman A, Bernaards C, Zhou J, Yetzer ES, Ballester R, Dwyer C, Tong X, Nájera I, Bertasso A, Hammond J, Kindrick A, Morcos PN, Smith P, Stancic S, Shulman NS. Mericitabine and ritonavir-boosted danoprevir with or without ribavirin in treatment-naive HCV genotype 1 patients: INFORM-SVR study. *Liver Int*. 2014b May 10.
- Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, Serrano-Wu MH, Langley DR, Sun JH, O'Boyle DR 2nd, Lemm JA, Wang C, Knipe JO, Chien C, Colonna RJ, Grasela DM, Meanwell NA, Hamann LG. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature*. 2010 May 6;465(7294):96-100.
- Gao M. Antiviral activity and resistance of HCV NS5A replication complex inhibitors. *Curr Opin Virol*. 2013 Oct;3(5):514-20.
- Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR Jr, Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill KA, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 7;102(23):8132-7.
- Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol*. 2008 Mar;82(5):2120-9.
- Gaudieri S, Rauch A, Pfafferott K, Barnes E, Cheng W, McCaughan G, Shackel N, Jeffrey GP, Mollison L, Baker R, Furrer H, Günthard HF, Freitas E, Humphreys I, Klenerman P, Mallal S, James I, Roberts S, Nolan D, Lucas M. Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1069-82.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009 Sep 17;461(7262):399-401.
- Gelman MA, Glenn JS. Mixing the right hepatitis C inhibitor cocktail. *Trends Mol Med*. 2011 Volume 17, Issue 1, 34–46.
- Gentsch J, Brohm C, Steinmann E, Friesland M, Menzel N, Vieyres G, Perin PM, Frentzen A, Kaderali L, Pietschmann T. hepatitis C Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003355.

- Georgescu EF, Streba L, R Teodorescu, et al. Potential enhancement of both early (EVR) and sustained (SVR) virological response by fluvastatin in chronic hepatitis C treated with standard PegIFN-ribavirin therapy. A pilot study. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Berlin. 2011. Abstract 198.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1335-74.
- Ghany MG, Lok AS, Everhart JE, Everson GT, Lee WM, Curto TM, Wright EC, Stoddard AM, Sterling RK, Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Morishima C, Morgan TR, Dienstag JL; HALT-C Trial Group. Predicting clinical and histologic outcomes based on standard laboratory tests in advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010;138(1):136-46.
- Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB; American Association for Study of Liver Diseases. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011 Oct;54(4):1433-44.
- Gish RG, Meanwell NA. The NS5A replication complex inhibitors: difference makers?. *Clin Liver Dis*. 2011 Aug;15(3):627-39.
- González ME, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett*. 2003;552:28–34.
- González-Candelas F, López-Labrador FX. Clinical Relevance of Genetic Heterogeneity in HCV Future Virology. 2010;5(1):33-49.
- González-Candelas F, López-Labrador FX, Bracho MA. Recombination in hepatitis C virus. *Viruses*. 2011 Oct;3(10):2006-24.
- Götte M. The distinct contributions of fitness and genetic barrier to the development of antiviral drug resistance. *Curr Opin Virol*. 2012 Oct;2(5):644-50.
- Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Ghanem L, Bukh J. Differential efficacy of protease inhibitors against HCV genotypes 2a, 3a, 5a, and 6a NS3/4A protease recombinant viruses. *Gastroenterology*. 2011 Sep;141(3):1067-79.
- Grakoui AC, Wychowski CC, Lin CS, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol*. 1993. 67:1385–1395.
- Gray F, Amphlett E, Bright H, Chambers L, Cheasty A, Fenwick R, Haigh D, Hartley D, Howes P, Jarvest R, Mirzai F, Nerozzi F, Parry N, Slater M, Smith S, Thommes P, Wilkinson C, Williams E. GSK625433; a novel and highly potent inhibitor of the HCV NS5B polymerase. *J Hepatol* 2007; 46(Suppl. 1): S225 (594A).
- Gretch DR, Polyak SJ, Wilson JJ, Carithers RL Jr, Perkins JD, Corey L. Tracking hepatitis C virus quasispecies major and minor variants in symptomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J Virol*. 1996 Nov;70(11):7622-31.
- Griffin S, Stgelais C, Owsianka AM, Patel AH, Rowlands D, Harris M. Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology*. 2008a Dec;48(6):1779-90.

- Griffin S, Trowbridge R, Thommes P, Parry N, Rowlands D, Harris M, Bright H. Chimeric GB virus B genomes containing hepatitis C virus p7 are infectious in vivo. *J Hepatol.* 2008b Dec;49(6):908-15.
- Guedj J, Dahari H, Pohl RT, Ferenci P, Perelson AS. Understanding silibinin's modes of action against HCV using viral kinetic modeling. *J Hepatol.* 2012 May;56(5):1019-24.
- Guedj J, Yu J, Levi M, Li B, Kern S, Naoumov NV, Perelson AS. Modeling viral kinetics and treatment outcome during alisporivir interferon-free treatment in hepatitis C virus genotype 2 and 3 patients. *Hepatology.* 2014;59(5):1706-14.
- Guidance on prevention of viral hepatitis B and C among people who inject drugs. Geneva: OMS. 2012. (Acceso enero 2014). <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/hepatitis/en/index.html>
- Haid S, Novodomská A, Gentsch J, Grethe C, Geuenich S, Bankwitz D, Chhatwal P, Jannack B, Hennebelle T, Bailleul F, Keppler OT, Poenisch M, Bartenschlager R, Hernandez C, Lemasson M, Rosenberg AR, Wong-Staal F, Davioud-Charvet E, Pietschmann T. A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes. *Gastroenterology.* 2012 Jul;143(1):213-22.e5.
- Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol.* 2011 Jul;55(1):192-206.
- Halfon P, Sarrazin C. Future treatment of chronic hepatitis C with direct acting antivirals: is resistance important? *Liver Int.* 2012 Feb;32 Suppl 1:79-87.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. 41:95-98.
- Hang JQ, Yang Y, Harris SF, Leveque V, Whittington HJ, Rajyaguru S, Ao-Ieong G, McCown MF, Wong A, Giannetti AM, Le Pogam S, Talamás F, Cammack N, Nájera I, Klumpp K. Slow binding inhibition and mechanism of resistance of non-nucleoside polymerase inhibitors of hepatitis C virus. *J Biol Chem.* 2009 Jun 5;284(23):15517-29.
- He Y, King MS, Kempf DJ, Lu L, Lim HB, Krishnan P, Kati W, Middleton T, Molla A. Relative replication capacity and selective advantage profiles of protease inhibitor-resistant hepatitis C virus (HCV) NS3 protease mutants in the HCV genotype 1b replicon system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Mar;52(3):1101-10.
- Hebner CW, Martin R, Knox S, Miller MD, Mo H, Svaroskaia ES. The effects of combining two Gilead direct acting antivirals GS-9256–GS-9190, ribavirin, and pegylated interferon on the detection of drug resistance mutations early in treatment of HCV. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA. 2011.
- Henikoff S, Henikoff JG. Amino acid substitution matrices from protein blocks, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89, 10915-10919.
- Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 2008 Dec 17;27(24):3300-10.

- Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, Farese RV Jr, Ott M. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med*. 2010 Nov;16(11):1295-8.
- Herker E, Ott M. Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Jun;22(6):241-8.
- Hernandez D, Zhou N, Ueland J, Monikowski A, McPhee F. Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors. *J Clin Virol* 2013; 57: 13-18
- Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):781-8.
- Hollinger FB, Bradley DW, Dreesman GR, Melnick JL. Detection of viral hepatitis type A. *Am J Clin Pathol*. 1976 May;65 (5 Suppl):854-65.
- Hollinger FB, Mosley JW, Szmunes W, Aach RD, Peters RL, Stevens C. Transfusion-transmitted viruses study: experimental evidence for two non-A, non-B, hepatitis agents. *J Infect Dis*. 1980 Sep;142(3):400-7.
- Holmes EC, Moya A. Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses? *J Virol*. 2002 Jan;76(1):460-5.
- Holmes EC. Does hepatitis C virus really form quasispecies?. *Infect Genet Evol*. 2010 May;10(4):431-2.
- Hope RG, McLauchlan J. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol*. 2000 Aug;81(Pt 8):1913-25.
- Hopkins S, Gallay P. Cyclophilin inhibitors: an emerging class of therapeutics for the treatment of chronic hepatitis C infection. *Viruses*. 2012 Oct 29;4(11):2558-77.
- Horner SM, Gale M Jr. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Med*. 2013 Jul;19(7):879-88.
- Howe AY, Cheng H, Thompson I, Chunduru SK, Herrmann S, O'Connell J, Agarwal A, Chopra R, Del Vecchio AM. Molecular mechanism of a thumb domain hepatitis C virus nonnucleoside RNA-dependent RNA polymerase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Dec;50(12):4103-13.
- Howe AY, Cheng H, Johann S, Mullen S, Chunduru SK, Young DC, Bard J, Chopra R, Krishnamurthy G, Mansour T, O'Connell J. Molecular mechanism of hepatitis C virus replicon variants with reduced susceptibility to a benzofuran inhibitor, HCV-796. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3327-38.
- Hraber PT, Leach RW, Reilly LP, Thurmond J, Yusim K, Kuiken C; Los Alamos HIV database team. Los Alamos hepatitis C virus sequence and human immunology databases: an expanding resource for antiviral research. *Antivir Chem Chemother*. 2007;18(3):113-23.

- Hsu HH, Wright TL, Tsao SC, Combs C, Donets M, Feinstone SM, Greenberg HB. Antibody response to hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Am J Gastroenterol*. 1994 Aug;89(8):1169-74.
- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):7271-6.
- Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, Cameron CE, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJ, Altan-Bonnet N. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*. 2010 May 28;141(5):799-811.
- Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M Jr, Ye J. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 3;104(14):5848-53.
- Huang Q, Huang N, Lau M, Bencsik M, Huq A, Peng A. et al. Resistance monitoring of HCV patients treated for three days with the NS5A inhibitor PPI-461 reveals rapid emergence of resistant HCV variants. *Hepatology*, 2011;54, p. 536A
- Hwang LY, Kramer JR, Troisi C, Bull L, Grimes CZ, Lyster R, Alter MJ. Relationship of cosmetic procedures and drug use to hepatitis C and hepatitis B virus infections in a low-risk population. *Hepatology*. 2006 Aug;44(2):341-51.
- Icard V, Diaz O, Scholtes C, Perrin-Cocon L, Ramière C, Bartenschlager R, Penin F, Lotteau V, André P. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One*. 2009;4(1):e4233.
- Ikedo M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology*. 2006 Jul;44(1):117-25.
- Imhof I, Simmonds P. Genotype differences in susceptibility and resistance development of hepatitis C virus to protease inhibitors telaprevir (VX-950) and danoprevir (ITMN-191). *Hepatology*. 2011 Apr;53(4):1090-9.
- Iwarson S, Lindberg J, Lundin P. Progression of hepatitis non-A, non-B to chronic active hepatitis: a histological follow-up of two cases. *J Clin Pathol*. 1979 Apr; 32(4):351-5.
- Jackson D, Tabor E, Gerety RJ. Acute non-A, non-B hepatitis: specific ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum of infected hepatocytes. *Lancet*. 1979 Jun 9;1(8128):1249-50.
- Jacobson IM, Cacoub P, Dal Maso L, Harrison SA, Younossi ZM. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010 Dec;8(12):1017-29.
- Jacobson IM, Catlett I, Marcellin P, Bzowej NH, Muir AJ, Adda N, Bengtsson L, George S, Seepersaud S, Ramachandran R, Sussky K, Kauffman RS, Botfield M. Telaprevir substantially improved svr rates across all IL28B genotypes in the advance trial. *Journal of Hepatology* 2011a March;54 (Suppl. 1): S542–S543.

- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R, George J, Rizzetto M, Shouval D, Sola R, Terg RA, Yoshida EM, Adda N, Bengtsson L, Sankoh AJ, Kieffer TL, George S, Kauffman RS, Zeuzem S; ADVANCE Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2011b Jun; 23;364(25):2405-16.
- Jain MK, Zoellner C. Role of ribavirin in HCV treatment response: now and in the future. *Expert Opin Pharmacother*. 2010 Mar;11(4):673-83.
- Jiang F, Ramanathan A, Miller MT, Tang GQ, Gale M, Patel SS, *et al*. Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature*. 2011;479:423-7.
- Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol*. 2009 Dec;83(24):12680-91.
- Jiménez-Hernández N. Evolución del virus de la hepatitis C en muestras hospitalarias de la Comunidad Valenciana. Tesis Doctoral Universidad de Valencia-España 2005.
- Johnson CL, Owen DM, Gale M Jr. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. *J Biol Chem*. 2007 Apr 6;282(14):10792-803.
- Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol*. 2007. 81, 8374–8383.
- Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1577-81.
- Jopling CL. Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem Soc Trans*. 2008 Dec;36(Pt 6):1220-3.
- Joshi D, Carey I, Agarwal K. Review article: the treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection in liver transplant candidates and recipients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Apr;37(7):659-71.
- Kageyama S, Agdamag DM, Alesna ET, Leañó PS, Heredia AM, Abellanos-Tac-An IP, Jereza LD, Tanimoto T, Yamamura J, Ichimura H. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol*. 2006 Nov;78(11):1423-8.
- Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnus LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol*. 2002 Apr;76(8):4034-43.
- Kantarjian H, Jabbour E, Grimley J, Kirkpatrick P. Dasatinib. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Sep;5(9):717-8.
- Kanwal F, Hoang T, Kramer JR, Asch SM, Goetz MB, Zeringue A, Richardson P, El-Serag HB. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2011 Apr;140(4):1182-1188.e1.
- Kaul A, Stauffer S, Berger C, Pertel T, Schmitt J, Kallis S, Zayas M, Lohmann V, Luban J, Bartenschlager R. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog*. 2009 Aug;5(8):e1000546.

- Ke PY, Chen SS. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses*. 2012 Oct 19;4(10):2251-90. Review.
- Khoury G, Ewart G, Luscombe C, Miller M, Wilkinson J. Antiviral efficacy of the novel compound BIT225 against HIV-1 release from human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54(2):835-45.
- Khuroo MS, Khuroo MS, Dahab ST. Meta-analysis: a randomized trial of peginterferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C genotype 4. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 Nov 1;20(9):931-8.
- Kieffer TL, Sarrazin C, Miller JS, Welker MW, Forestier N, Reesink HW, Kwong AD, Zeuzem S. Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology*. 2007 Sep;46(3):631-9.
- Kieffer TL, Kwong AD, Picchio GR. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). *J Antimicrob Chemother*. 2010 Feb;65(2):202-12.
- Kieffer TL, De Meyer S, Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges A, Dierynck I, Spanks J, Dorrian J, Jiang M, Adiwijaya B, Ghys A, Beumont M, Kauffman RS, Adda N, Jacobson IM, Sherman KE, Zeuzem S, Kwong AD, Picchio G. Hepatitis C viral evolution in genotype 1 treatment-naïve and treatment-experienced patients receiving telaprevir-based therapy in clinical trials. *PLoS One*. 2012;7(4):e34372.
- Kim AY, Timm J, Nolan BE, Reyor LL, Kane K, Berical AC, Zachary KC, Lauer GM, Kuntzen T, Allen TM. Temporal dynamics of a predominant protease inhibitor-resistance mutation in a treatment-naïve, hepatitis C virus-infected individual. *J Infect Dis*. 2009 Mar 1;199(5):737-41.
- Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):343-55.
- Kim S, Welsch C, Yi M, Lemon SM. Regulation of the production of infectious genotype 1a hepatitis C virus by NS5A domain III. *J Virol*. 2011 Jul;85(13):6645-56.
- Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge. 1983.
- Knodell RG, Conrad ME, Dienstag JL, Bell CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterol* 1975; 69: 1278-1285.
- Knodell RG, Conrad ME, Ishak KG. Development of chronic liver disease after acute non-A, non-B post-transfusion hepatitis. Role of gamma-globulin prophylaxis in its prevention. *Gastroenterology*. 1977 May;72(5 Pt 1):902-9.
- Koev G, Dekhtyar T, Han L, Yan P, Ng TI, Lin CT, Mo H, Molla A. Antiviral interactions of an HCV polymerase inhibitor with an HCV protease inhibitor or interferon in vitro. *Antiviral Res*. 2007 Jan;73(1):78-83.
- Koev G, Mondal R, Beyer J, Reisch T, Masse S, Kati W, Hutchinson D, Flentge C, Randolph J, Donner P, Krueger A, Wagner R, Yan P, Lin T, Maring C, Molla A. Characterization of

- resistance mutations selected *in vitro* by the non-nucleoside HCV polymerase inhibitors ABT-333 and ABT-072. In: Abstracts of the Forty-fourth Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Copenhagen, 2009. Abstract 953, p. S346. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Komurian-Pradel F, Rajoharison A, Berland JL, Khouri V, Perret M, Van Roosmalen M, Pol S, Negro F, Paranhos-Baccalà G. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004 Oct;40(4):900-9.
- Koretz RL, Suffin SC, Gitnick GL. Post-transfusion chronic liver disease. *Gastroenterology*. 1976 Nov;71(5):797-803.
- Kosakovsky Pond SL, Frost SD. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol*. 2005 May;22(5):1208-22
- Kota S, Takahashi V, Ni F, Snyder JK, Strosberg AD. Direct binding of a hepatitis C virus inhibitor to the viral capsid protein. *PLoS One*. 2012;7(2):e32207.
- Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol*. 2001;75(10):4614-24.
- Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA*. 1967. 200: 365-373.
- Krugman S, Gilles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA*. 1984. 252: 393– 401.
- Kukulj G, McGibbon GA, McKercher G, Marquis M, Lefebvre S, Thauvette L, Gauthier J, Goulet S, Poupert MA, Beaulieu PL. Binding site characterization and resistance to a class of non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase. *J. Biol. Chem*. 2005. 280:39260–39267.
- Kuntzen T, Timm J, Berical A, Lennon N, Berlin AM, Young SK, Lee B, Heckerman D, Carlson J, Reyrol LL, Kleyman M, McMahon CM, Birch C, Schulze Zur Wiesch J, Ledlie T, Koehrsen M, Kodira C, Roberts AD, Lauer GM, Rosen HR, Bihl F, Cerny A, Spengler U, Liu Z, Kim AY, Xing Y, Schneidewind A, Madey MA, Fleckenstein JF, Park VM, Galagan JE, Nusbaum C, Walker BD, Lake-Bakaar GV, Daar ES, Jacobson IM, Gomperts ED, Edlin BR, Donfield SM, Chung RT, Talal AH, Marion T, Birren BW, Henn MR, Allen TM. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology*. 2008;48(6):1769-78.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, *et al*. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989; 244: 362-364.
- Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, Schiff ER, Vierling JM, Pound D, Davis MN, Galati JS, Gordon SC, Ravendhran N, Rossaro L, Anderson FH, Jacobson IM, Rubin R, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Chaudhri E, Albrecht JK; SPRINT-1 investigators. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):705-16.

- Kwong AD, McNair L, Jacobson I, George S. Recent progress in the development of selected hepatitis C virus NS3.4A protease and NS5B polymerase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Oct;8(5):522-31.
- Kwong AD, Najera I, Bechtel J, Bowden S, Fitzgibbon J, Harrington P, Kempf D, Kieffer TL, Koletzki D, Kukolj G, Lim S, Pilot-Matias T, Lin K, Mani N, Mo H, O'Rear J, Otto M, Parkin N, Pawlotsky JM, Petropoulos C, Picchio G, Ralston R, Reeves JD, Schooley RT, Seiwert S, Stranding D, Stuyver L, Sullivan J, Miller V; Forum for Collaborative Human Immunodeficiency Virus Research; HCV Drug Development Advisory Group (HCV DRAG); Sequence Analysis Working Group (SAWG); Phenotype Analysis Working Group (PAWG). Sequence and phenotypic analysis for resistance monitoring in hepatitis C virus drug development: recommendations from the HCV DRAG. *Gastroenterology*. 2011 Mar;140(3):755-60.
- Lacek K, Vercauteren K, Grzyb K, Naddeo M, Verhoye L, Slowikowski MP, Fafi-Kremer S, Patel AH, Baumert TF, Folgori A, Leroux-Roels G, Cortese R, Meuleman P, Nicosia A. Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *J Hepatol*. 2012 Jul;57(1):17-23.
- Lagacé L, White P, Bousquet C, Dansereau N, Dô F, Llinas-Brunet M, Marquis M, Massariol MJ, Maurice R, Spickler C, Thibeault D, Triki I, Zhao S, Kukolj G. In Vitro Resistance Profile of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor BI 201335. *Antimicrob Agents Chemother*. Jan 2012; 56(1): 569–572.
- Lalezari JP, Farrell GC, Shah PS, Schwab C, Walsh D, Vig P, Brown NA, Ruby E, Halfon S, Colonno R, Li L, Johnston B, Wargin W, Gane EJ. PPI-668, a potent new pan-genotypic HCV NS5A inhibitor: phase 1 efficacy and safety. *Hepatology* 2012; 56 Suppl: 1065A
- Lam AM, Murakami E, Espiritu C, Steuer HM, Niu C, Keilman M, Bao H, Zennou V, Bourne N, Julander JG, Morrey JD, Smee DF, Frick DN, Heck JA, Wang P, Nagarathnam D, Ross BS, Sofia MJ, Otto MJ, Furman PA. PSI-7851, a pronucleotide of beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methyluridine monophosphate, is a potent and pan-genotype inhibitor of hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3187-96.
- Lam AM, Espiritu C, Bansal S, Micolochick Steuer HM, Zennou V, Otto MJ, Furman PA. Hepatitis C virus nucleotide inhibitors PSI-352938 and PSI-353661 exhibit a novel mechanism of resistance requiring multiple mutations within replicon RNA. *J Virol*. 2011 Dec;85(23):12334-42.
- Lam AM, Espiritu C, Bansal S, Micolochick Steuer HM, Niu C, Zennou V, Keilman M, Zhu Y, Lan S, Otto MJ, Furman PA. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jun;56(6):3359-68.
- Lam NP, Neumann AU, Gretch DR, Wiley TE, Perelson AS, Layden TJ. Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology*. 1997 Jul;26(1):226-31.

- Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, Bös M, Cameron DR, Cartier M, Cordingley MG, Faucher AM, Goudreau N, Kawai SH, Kukolj G, Lagacé L, LaPlante SR, Narjes H, Poupart MA, Rancourt J, Sentjens RE, St George R, Simoneau B, Steinmann G, Thibeault D, Tsantrizos YS, Weldon SM, Yong CL, Llinàs-Brunet M. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*. 2003 Nov 13;426(6963):186-9.
- Lanford RE, Chavez D, Chisari FV, Sureau C. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J Virol*. 1995 Dec;69(12):8079-83.
- Lanford RE, Evans MJ, Lohmann V, Lindenbach B, Gale M Jr, Rehermann B, Chang KM, Lemon SM. The accelerating pace of HCV research: a summary of the 15th International Symposium on Hepatitis C Virus And Related Viruses. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):9-16.
- Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Ørum H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 2010 Jan 8;327(5962):198-201.
- Lang L. Combination therapy with telaprevir and pegylated interferon suppresses both wild-type and resistant hepatitis C virus. *Gastroenterology*. 2007 Jan;132(1):5-6.
- Lange C, Sarrazin C. Diagnostic tests in acute and chronic hepatitis C. En: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. *Hepatology –A Clinical Textbook*. 2^a ed. Düsseldorf: Flying Publisher; 2010.p. 159-70.
- Lara J, Xia G, Purdy M, Khudyakov Y. Coevolution of the hepatitis C virus polyprotein sites in patients on combined pegylated interferon and ribavirin therapy. *Virol*. 2011 Apr;85(7):3649-63.
- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology*. 1998 Nov;28(5):1398-401.
- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001 Jul 5;345(1):41-52.
- Lavie M, Goffard A, Dubuisson J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2007. 9, 71–86.
- Lawitz E, Rodriguez-Torres M, Muir AJ, Kieffer TL, McNair L, Khunvichai A, McHutchison JG. Antiviral effects and safety of telaprevir, peginterferon alfa-2a, and ribavirin for 28 days in hepatitis C patients. *J Hepatol*. 2008 Aug;49(2):163-9.
- Lawitz E, Rodriguez-Torres M, Rustgi VK, Hassanein T, Rahimy MH, Crowley CA, Freddo JL, Muir A, McHutchison J. Safety and antiviral activity of ANA598 in combination with pegylated interferon a2A plus ribavirin in treatment-naive genotype-1 chronic HCV patients. *J. Hepatol*. 2010. 52:S467.
- Lawitz E, Godofsky E, Rouzier R, Marbury T, Nguyen T, Ke J, Huang M, Praestgaard J, Serra D, Evans TG. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of the cyclophilin inhibitor

- NIM811 alone or in combination with pegylated interferon in HCV-infected patients receiving 14 days of therapy. *Antiviral Res.* 2011 Mar;89(3):238-45.
- Lawitz E, Marbury T, Cambell A, Dumas E, Kapoor M, Pilot-Matias T, Krishnan P, Setze C, Xie W, Podsadecki T, Bernstein B, Williams L. Safety. Safety and antiviral activity of ABT-267, a novel NS5A inhibitor, during 3-day monotherapy: first study in HCV genotype-1 (GT1)-infected treatment-naive subjects. *J Hepatol.* 2012a; 56: S469–S470
- Lawitz EJ, Gruener D, Hill JM, Marbury T, Moorehead L, Mathias A. *et al.* A phase 1, randomized, placebo-controlled, 3-day, dose-ranging study of GS-5885, an NS5A inhibitor, in patients with genotype 1 hepatitis C. *J Hepatol.* 2012b; 57: 24–31
- Le Pogam S, Kang H, Harris SF, Leveque V, Giannetti AM, Ali S, Jiang WR, Rajyaguru S, Tavares G, Oshiro C, Hendricks T, Klumpp K, Symons J, Browner MF, Cammack N, Nájera I. Selection and characterization of replicon variants dually resistant to thumb- and palm-binding nonnucleoside polymerase inhibitors of the hepatitis C virus. *J Virol.* 2006 Jun;80(12):6146-54.
- Le Pogam S, Jiang WR, Leveque V, Rajyaguru S, Ma H, Kang H, Jiang S, Singer M, Ali S, Klumpp K, Smith D, Symons J, Cammack N, Nájera I. In vitro selected Con1 subgenomic replicons resistant to 2'-C-methyl-cytidine or to R1479 show lack of cross resistance. *Virology.* 2006 Aug 1;351(2):349-59.
- Le Pogam S, Seshadri A, Kosaka A, Chiu S, Kang H, Hu S, Rajyaguru S, Symons J, Cammack N, Nájera I. Existence of hepatitis C virus NS5B variants naturally resistant to non-nucleoside, but not to nucleoside, polymerase inhibitors among untreated patients. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jun;61(6):1205-16.
- Le Pogam S, Seshadri A, Ewing A, Kang H, Kosaka A, Yan JM, Berrey M, Symonds B, De La Rosa A, Cammack N, Nájera I. RG7128 alone or in combination with pegylated interferon- α 2a and ribavirin prevents hepatitis C virus (HCV) Replication and selection of resistant variants in HCV-infected patients. *J Infect Dis.* 2010 Nov 15;202(10):1510-9.
- Le Pogam S, Yan JM, Chhabra M, Ilnicka M, Kang H, Kosaka A, Ali S, Chin DJ, Shulman NS, Smith P, Klumpp K, Nájera I. Characterization of hepatitis C virus (HCV) quasispecies dynamics upon short-term dual therapy with the HCV NS5B nucleoside polymerase inhibitor mericitabine and the NS3/4 protease inhibitor danoprevir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Nov;56(11):5494-502
- Lee LY, Tong CY, Wong T, Wilkinson M. New therapies for chronic hepatitis C infection: a systematic review of evidence from clinical trials. *Int J Clin Pract.* 2012 Apr;66(4):342-55.
- Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, Pasquier C, Izopet J. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol.* 2007 Apr;81(8):4357-62. Epub 2007 Jan 31.
- Legrand-Abravanel F, Henquell C, Le Guillou-Guillemette H, Balan V, Mirand A, Dubois M, Lunel-Fabiani F, Payan C, Izopet J. Naturally occurring substitutions conferring resistance to hepatitis C virus polymerase inhibitors in treatment-naïve patients infected with genotypes 1-5. *Antiviral Therapy.* 2009; 14:723-730.

- Lemm JA, O'Boyle D 2nd, Liu M, Nower PT, Colonna R, Deshpande MS, Snyder LB, Martin SW, St Laurent DR, Serrano-Wu MH, Romine JL, Meanwell NA, Gao M. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. *J Virol.* 2010 Jan;84(1):482-91.
- Lemm JA, Liu M, Gentles RG, Ding M, Voss S, Pelosi LA, Wang YK, Rigat KL, Mosure KW, Bender JA, Knipe JO, Colonna R, Meanwell NA, Kadow JF, Santone KS, Roberts SB, Gao M. Preclinical Characterization of BMS-791325, an Allosteric Inhibitor of Hepatitis C Virus NS5B Polymerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jun;58(6):3485-3495.
- Lemon SM, McKeating JA, Pietschmann T, Frick DN, Glenn JS, Tellinghuisen TL, Symons J, Furman PA. Development of novel therapies for hepatitis C. *Antiviral Res.* 2010 Apr;86(1):79-92.
- Lenz O, Verbinnen T, Lin TI, Vijgen L, Cummings MD, Lindberg J, Berke JM, Dehertogh P, Franssen E, Scholliers A, Vermeiren K, Ivens T, Raboisson P, Edlund M, Storm S, Vrang L, de Kock H, Fanning GC, Simmen KA. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May;54(5):1878-87.
- Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trépo C, Inchauspé G. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood.* 1998 May 15;91(10):3841-9.
- Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol.* 1999 Oct;6(10):937-43.
- Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, Kozal MJ, Svarovskaia ES, Johnson JA, Geretti AM, Metzner KJ, Jakobsen MR, Hullsiek KH, Ostergaard L, Miller MD, Kuritzkes DR. Impact of minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations on resistance genotype after virologic failure. *J Infect Dis.* 2013 Mar 15;207(6):893-7.
- Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 22;102(8):2992-7.
- Li Q, Brass AL, Ng A, Hu Z, Xavier RJ, Liang TJ, Elledge SJ. A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 22;106(38):16410-5.
- Li WH. *Molecular Evolution.* Sinauer Associates., Sunderland., MA. 1997.
- Li Y, Masaki T, Lemon SM. miR-122 and the Hepatitis C RNA genome: more than just stability. *RNA Biol.* 2013 Jun;10(6):919-23.
- Liang TJ, Ghany MG. Current and future therapies for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2013 May 16;368(20):1907-17.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009 Jun 1;25(11):1451-2.
- Lim SR, Qin X, Susser S, Nicholas JB, Lange C, Herrmann E, Hong J, Arfsten A, Hooi L, Bradford W, Nájera I, Smith P, Zeuzem S, Kossen K, Sarrazin C, Seiwert SD. Virologic

- escape during danoprevir (ITMN-191/RG7227) monotherapy is hepatitis C virus subtype dependent and associated with R155K substitution. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):271-9.
- Lin C, Lin K, Luong YP, Rao BG, Wei YY, Brennan DL, Fulghum JR, Hsiao HM, Ma S, Maxwell JP, Cottrell KM, Perni RB, Gates CA, Kwong AD. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):17508-14.
- Lin C, Gates CA, Rao BG, Brennan DL, Fulghum JR, Luong YP, Frantz JD, Lin K, Ma S, Wei YY, Perni RB, Kwong AD. In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *J Biol Chem.* 2005 Nov 4;280(44):36784-91
- Lin HM, Wang JC, Hu HS, Wu PS, Yang CC, Wu CP, Pu SY, Hsu TA, Jiaang WT, Chao YS, Chern JH, Yeh TK, Yueh A. Resistance analysis and characterization of a thiazole analogue, BP008, as a potent hepatitis C virus NS5A inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):44-53.
- Lin HM, Wang JC, Hu HS, Wu PS, Wang WH, Wu SY, Yang CC, Yeh TK, Hsu TA, Jiaang WT, Chao YS, Chern JH, Yueh A. Resistance studies of a dithiazol analogue, DBPR110, as a potential hepatitis C virus NS5A inhibitor in replicon systems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Feb;57(2):723-33.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* 2005a Jul 22;309(5734):623-6.
- Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 2005b Aug 18;436(7053):933-8.
- Liu J, Shi S, Zhuang H, Luo G. Recent advance in antiviral drugs for hepatitis C. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2011 Nov;36(11):1025-36.
- Liu R, Kong R, Mann P, Ingravallo P, Zhai Y, Xia E, Ludmerer S, Kozlowski J, Coburn C. In vitro resistance analysis of HCV NS5A inhibitor: MK-8742 demonstrates increased potency against clinical resistance variants and higher resistance barrier. *J Hepatol* 2012; 56 suppl 2: S334-S335
- Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol.* 2009 Feb;83(4):2011-4.
- Liverton NJ, Carroll SS, Dimuzio J, Fandozzi C, Graham DJ, Hazuda D, Holloway MK, Ludmerer SW, McCauley JA, McIntyre CJ, Olsen DB, Rudd MT, Stahlhut M, Vacca JP. MK-7009, a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):305-11.
- Llinàs-Brunet M, Bailey MD, Goudreau N, Bhardwaj PK, Bordeleau J, Bös M, Bousquet Y, Cordingley MG, Duan J, Forgione P, Garneau M, Ghiro E, Gorys V, Goulet S, Halmos T, Kawai SH, Naud J, Poupart MA, White PW. Discovery of a potent and selective

- noncovalent linear inhibitor of the hepatitis C virus NS3 protease (BI 201335). *J Med Chem.* 2010 Sep 9;53(17):6466-76.
- Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM, McKeating JA. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 6;101(27):10149-54.
- Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999 Jul 2;285(5424):110-3.
- Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, Martorell C, Everson GT, Ghalib R, Reindollar R, Rustgi V, McPhee F, Wind-Rotolo M, Persson A, Zhu K, Dimitrova DI, Eley T, Guo T, Grasela DM, Pasquinelli C. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med.* 2012 Jan 19;366(3):216-24.
- López-Labrador FX, Ampurdanés S, Forns X, Castells A, Sáiz JC, Costa J, Bruix J, Sánchez Tapias JM, Jiménez de Anta MT, Rodés J. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1997 Dec;27(6):959-65.
- López-Labrador FX, Moya A, González-Candelas F. Mapping natural polymorphisms of hepatitis C virus NS3/4A protease and antiviral resistance to inhibitors in worldwide isolates. *Antivir Ther.* 2008;13(4):481-94.
- Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature.* 2006 Aug 17;442(7104):831-5.
- Lu L, Pilot-Matias TJ, Stewart KD, *et al.* Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2260–6.
- Lu L, Krishnan P, Pithawalla R, Dekhtyar T, Ng T, He W, Pilot-Matias T, Larson D, Bosse T, Wagner R, Kempf D, Molla A, Mo H. Selection and characterization of hepatitis C virus replicons resistant to a potent polymerase inhibitor A-837093. *Hepatology.* 2006;44(Suppl. 1):351A.
- Lu L, Mo H, Pilot-Matias TJ, Molla A. Evolution of resistant M414T mutants among hepatitis C virus replicon cells treated with polymerase inhibitor A-782759. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun;51(6):1889-96.
- Lu L, Dekhtyar T, Masse S, Pithawalla R, Krishnan P, He W, Ng T, Koev G, Stewart K, Larson D, Bosse T, Wagner R, Pilot-Matias T, Mo H, Molla A. Identification and characterization of mutations conferring resistance to an HCV RNA-dependent RNA polymerase inhibitor in vitro. *Antiviral Res.* 2007 Oct;76(1):93-7.
- Lu L, Murphy D, Li C, Liu S, Xia X, Pham PH, Jin Y, Hagedorn CH, Abe K. Complete genomes of three subtype 6t isolates and analysis of many novel hepatitis C virus variants within genotype 6. *J Gen Virol.* 2008 Feb;89(Pt 2):444-52.
- Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoël M, Raffelsberger W, Poch O,

- McKeating JA, Brino L, Baumert TF. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med.* 2011 May;17(5):589-95
- Lürman A. Eine Icterusepidemie. *Berliner Klin Wochenschr* 1885; 22: 20-7
- Luscombe CA, Huang Z, Murray MG, Miller M, Wilkinson J, Ewart GD. A novel Hepatitis C virus p7 ion channel inhibitor, BIT225, inhibits bovine viral diarrhea virus in vitro and shows synergism with recombinant interferon-alpha-2b and nucleoside analogues. *Antiviral Res.* 2010 May;86(2):144-53.
- Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012 Aug;26(4):401-12.
- MacCallum F. Homologous serum hepatitis. *Lancet.* 1947; 2: 691-2.
- Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Feb 22;108(8):3193-8.
- Maggi F, Giorgi M, Fornai C, Morrica A, Vatteroni ML, Pistello M, Siciliano G, Nuccorini A, Bendinelli M. Detection and quasispecies analysis of hepatitis C virus in the cerebrospinal fluid of infected patients. *J Neurovirol.* 1999 Jun;5(3):319-23.
- Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, Allain JP, Hatzakis A. The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med.* 2009 Dec;6(12):e1000198.
- Magnius LO, Espmark JA. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1972; 80: 335-337.
- Magnius LO. Characterization of a new antigen-antibody system associated with hepatitis B. *Clin Exp Immunol.* 1975 May;20(2):209-16.
- Magnius LO, Lindholm A, Lundin P, Iwarson S. A new antigen-antibody system. Clinical significance in long-term carriers of hepatitis B surface antigen. *JAMA.* 1975 Jan 27;231(4):356-9.
- Mangia A, Santoro R, Sarli R, Mottola L, Piazzolla V, Petruzzellis D, Bacca D, Clemente R, Copetti M, di Mauro L, Lotti G, Sacco M, Stefano I. IL28B CC-genotype association with HLA-DQB1*0301 allele increases the prediction of spontaneous HCV RNA clearance in thalassaemic HCV-infected patients. *Antivir Ther.* 2011;16(8):1309-16.
- Manns MP, Cornberg M, Wedemeyer H. Current and future treatment of hepatitis C. *Indian J Gastroenterol.* 2001 Mar;20 Suppl 1:C47-51. Review.
- Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* 2006 Sep;55(9):1350-9.
- Manzin A, Candela M, Paolucci S, Caniglia ML, Gabrielli A, Clementi M. Presence of hepatitis C virus (HCV) genomic RNA and viral replicative intermediates in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells from HCV-infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994 Mar;1(2):160-3.

- Margeridon S, Le Pogam S, Liu T, *et al.* Ultra-deep sequencing of the NS3 and NS5B regions detects pre-existing resistant variants to direct acting antivirals (DAA) in HCV genotype 1 treatment-naive infected patients. *Hepatology* 2010; 52 Suppl 1: 714A
- Margeridon S, Le Pogam S, Liu TF, *et al.* No detection of variants bearing NS5B S282T mericitabine (MCB) resistance mutation in DAA treatment-naive HCV genotype 1 infected patients using ultra-deep pyrosequencing (UDPS). *Hepatology* 2011; 54 Suppl 1: 532A.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol.* 1992;66(5):3225-9.
- Martin DN, Uprichard SL. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jun 25;110(26):10777-82.
- Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara M, Fàbregas S, Vega R, Salmerón J, Diago M, Sánchez-Tapias JM, Bruguera M; Spanish Acute HCV Study Group. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol.* 2008 Jan;48(1):20-7.
- Martró E, González V, Buckton AJ, Saludes V, Fernández G, Matas L, Planas R, Ausina V. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):192-7.
- Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol.* 2008 Aug;82(16):7964-76.
- Matsumura T, Kato T, Sugiyama N, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M. 25-Hydroxyvitamin D3 suppresses hepatitis C virus production. *Hepatology.* 2012 Oct;56(4):1231-9.
- McCaughan GW. Asia Pacific Association for the study of the liver consensus statements on the diagnosis, management and treatment of hepatitis C virus. *J Gastro Hepatol.* 2007; 22:615-633.
- McCauley JA, McIntyre CJ, Rudd MT, Nguyen KT, Romano JJ, Butcher JW, Gilbert KF, Bush KJ, Holloway MK, Swestock J, Wan BL, Carroll SS, DiMuzio JM, Graham DJ, Ludmerer SW, Mao SS, Stahlhut MW, Fandozzi CM, Trainor N, Olsen DB, Vacca JP, Liverton NJ. Discovery of vaniprevir (MK-7009), a macrocyclic hepatitis C virus NS3/4a protease inhibitor. *J Med Chem.* 2010 Mar 25;53(6):2443-63.
- McCown MF, Rajyaguru S, Le Pogam S, Ali S, Jiang WR, Kang H, Symons J, Cammack N, Najera I. The hepatitis C virus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to nonnucleoside polymerase or protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May;52(5):1604-12.

- McCown MF, Rajyaguru S, Kular S, Cammack N, Nájera I. GT-1a or GT-1b subtype-specific resistance profiles for hepatitis C virus inhibitors telaprevir and HCV-796. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 May;53(5):2129-32.
- McDonald S. Acute yellow atrophy. *Edinb. Med. J.* 1908;15:208
- McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 20;104(8):2879-84.
- McPhee F, Falk P, Fracasso P, Lemm J, Liu M, Kirk M, Hernandez D, Cooney E, Hughes E, Gao M. Characterization of viral escape in HCV genotype 1-infected patients treated with BMS-791325 and pegylated interferon-alfa and ribavirin. *Journal of Hepatology* 2012a vol. 56: S473. Abstract:1194.
- McPhee F, Friberg J, Levine S, Chen C, Falk P, Yu F, Hernandez D, Lee MS, Chaniewski S, Sheaffer AK, Pasquinelli C. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor asunaprevir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012b Jul;56(7):3670-81.
- Mederacke I, Wedemeyer H, Manns MP. Boceprevir, an NS3 serine protease inhibitor of hepatitis C virus, for the treatment of HCV infection. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 Feb;10(2):181-9.
- Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol.* 2006 Dec;80(23):11571-8. Epub 2006 Sep 27.
- Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol.* 2008 Apr;82(7):3555-60.
- Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol.* 1995 Oct;76 (Pt 10):2493-507
- Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A, Haid S, Gentzsch J, Kaderali L, Bartenschlager R, Pietschmann T. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):e1002829.
- Merz A, Long G, Hiet MS, Brügger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem.* 2011 Jan 28;286(4):3018-32.
- Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46.
- Meuleman P, Bukh J, Verhoye L, Farhoudi A, Vanwolleghem T, Wang RY, Desombere I, Alter H, Purcell RH, Leroux-Roels G. In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology.* 2011 Mar;53(3):755-62.

- Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, Desombere I, Farhoudi A, Jones CT, Sheahan T, Grzyb K, Cortese R, Rice CM, Leroux-Roels G, Nicosia A. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*. 2012 Feb;55(2):364-72.
- Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH, Bukh J. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 22;102(12):4560-5.
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1167-72.
- Middleton T, He Y, Beyer J, Menon R, Klein C, Cohen D, Collins C. Resistance profile of ABT-333 and relationship to viral load decrease in patients treated in combination with peg-interferon and ribavirin for 28 days. *J. Hepatol*. 2010;52, S296–S297.
- Migliaccio G, Tomassini JE, Carroll SS, Tomei L, Altamura S, Bhat B, Bartholomew L, Bosserman MR, Ceccacci A, Colwell LF, Cortese R, De Francesco R, Eldrup AB, Getty KL, Hou XS, LaFemina RL, Ludmerer SW, MacCoss M, McMasters DR, Stahlhut MW, Olsen DB, Hazuda DJ, Flores OA. Characterization of resistance to non-obligate chain-terminating ribonucleoside analogs that inhibit hepatitis C virus replication *in vitro*. *J Biol Chem*. 2003 Dec 5;278(49):49164-70.
- Minna JD, Dowell J. Erlotinib hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 May;Suppl:S14-5.
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9):1089-97.
- Mo H, Lu L, Pilot-Matias T, Pithawalla R, Mondal R, Masse S, Dekhtyar T, Ng T, Koev G, Stoll V, Stewart KD, Pratt J, Donner P, Rockway T, Maring C, Molla A. Mutations conferring resistance to a hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase inhibitor alone or in combination with an HCV serine protease inhibitor *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4305-14.
- Mo H, Harris J, Bae A, Hebner C, Wong K, Delaney W, Oldach D, Miller MD. Characterization of Viral Resistance Mutations In Genotype 1 HCV Patients Receiving Combination Therapy with a Protease Inhibitor and a Polymerase Inhibitor with or without Ribavirin Gilead. *Journal of Hepatology* 2011 vol. 54: S484
- Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*. 2007; 5:453-463.
- Moreno C, Berg T, Tanwandee T, Thongsawat S, Van Vlierberghe H, Zeuzem S, Lenz O, Peeters M, Sekar V, De Smedt G. Antiviral activity of TMC435 monotherapy in patients infected with HCV genotypes 2-6: TMC435-C202, a phase IIa, open-label study. *J Hepatol*. 2012 Jun;56(6):1247-53.

- Moreno MP, Casane D, López L, Cristina J. Evidence of recombination in quasispecies populations of a Hepatitis C Virus patient undergoing anti-viral therapy. *Virology*. 2006 Oct 24;3:87.
- Mori J, Hammond JL, Srinivasan S, Jagannatha S, van der Ryst E. Genotypic characterization of filibuvir (PF-00868554) resistance in patients receiving four weeks co-administration of filibuvir with PegIFN/ RBV (12 week analysis). *EASL*, 2010. Vienna, Austria.
- Moriishi K, Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front Microbiol*. 2012 Feb 14;3:54.
- Morris CE, Klement J F, McAllister WT. *Gene*. 1986; 41(2-3):193-200.
- Morsica G, Tambussi G, Sitia G, Novati R, Lazzarin A, Lopalco L, Mukenge S. Replication of hepatitis C virus in B lymphocytes (CD19+). *Blood*. 1999 Aug 1;94(3):1138-9.
- Muir AJ, Shiffman ML, Zaman A, Yoffe B, de la Torre A, Flamm S, Gordon SC, Marotta P, Vierling JM, Lopez-Talavera JC, Byrnes-Blake K, Fontana D, Freeman J, Gray T, Hausman D, Hunder NN, Lawitz E. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2010a Sep;52(3):822-32.
- Muir AJ, Lawitz E, Ghalib RH, *et al*. Pegylated interferon-lambda (PEG-IFN- λ) phase 2, dose-ranging, active-controlled study in combination with ribavirin (RBV) for treatment-naïve HCV patients (Genotypes 1, 2, 3 or 4): Safety, viral response, and impact of IL28B host genotype through week 12. *Hepatology*. 2010b;52(4):715A–716A
- Muratori L, Giostra F, Cataleta M, Francesconi R, Ballardini G, Cassani F, Lenzi M, Bianchi FB. Testing for hepatitis C virus sequences in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis C in the absence of serum hepatitis C virus RNA. *Liver*. 1994 Jun;14(3):124-8.
- Murray R, Diefenbach W, Geller H, Leone N, Ratner F. The problem of reducing the danger of serum; hepatitis from blood and blood products. *N Y State J Med*. 1955 Apr 15;55(8):1145-60.
- Murray R. Viral hepatitis. *Bull N Y Acad Med*. 1955 May;31(5):341-58.
- Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet*. 2012;8(7):e1002764.
- Najera I. Resistance to HCV nucleoside analogue inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Curr Opin Virol*. 2013 Oct;3(5):508-13.
- Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One*. 2011;6(9):e24907.
- Navas-Martin S, Castillo I, Bartolomé J, Marriott E, Herrero M, Carreño V. Positive and negative hepatitis C virus RNA strands in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells in anti-HCV patients: relation with the liver lesion. *J Hepatol*. 1994 Aug;21(2):182-6.

- Navas-Martin S, Martín J, Quiroga JA, Castillo I, Carreño V. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients. *J Virol*. 1998 Feb;72(2): 1640–1646.
- Neefe JR . Recent advances in the knowledge of virus hepatitis. *Med Clin North Am*. 1946 Nov;30:1407-43.
- Neefe JR, Norris RF, Reinhold Ráška K, Radkovsky V, Some JG, Mitchell CN, Howell. Questions on the Development of the D. S.: Carriers of Hepatitis Virus in Epidemic Process in Infectious Hepathe Blood and Viral Hepatitis in titis. Review of Czechoslovak Medici Whole Blood Recipients. *J.' A. hI. A., ne*. 1956. II-4, pp. 1-10.
- Negro F, Alberti A. The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2011 Jul;31 Suppl 2:1-3.
- Negro F. Steatosis and insulin resistance in response to treatment of chronic hepatitis C.*J Viral Hepat*. 2012 Jan;19 Suppl 1:42-7.
- Nei M y Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 2000.
- Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, Rice CM, Wong J, Houghton M, Lau JY. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol*. 1997 Feb 1;158(3):1473-81.
- Nettles R, Wang X, Quadri S, Wu Y, Gao M, Belema M, *et al*. BMS-824393 is a potent hepatitis C virus NS5A inhibitor with substantial antiviral activity when given as monotherapy in subjects with chronic G1 HCV infection (Abstract 1858). *Hepatology*. 2010; 52: 1203A
- Nettles RE, Gao M, Bifano M, Chung E, Persson A, Marbury TC, Goldwater R, DeMicco MP, Rodriguez-Torres M, Vutikullird A, Fuentes E, Lawitz E, Lopez-Talavera JC, Grasela DM. Multiple ascending dose study of BMS-790052, a nonstructural protein 5A replication complex inhibitor, in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology*. 2011; 54(6): 1956-1965.
- Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. 1998 Oct 2;282(5386):103-7.
- Neumann UP, Biermer M, Eurich D, Neuhaus P, Berg T. Successful prevention of hepatitis C virus (HCV) liver graft reinfection by silibinin mono-therapy. *J Hepatol*. 2010 Jun;52(6):951-2.
- Neveu G, Barouch-Bentov R, Ziv-Av A, Gerber D, Jacob Y, Einav S. Identification and targeting of an interaction between a tyrosine motif within hepatitis C virus core protein and AP2M1 essential for viral assembly. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002845.
- Nguyen TT, Gates AT, Gutshall LL, Johnston VK, Gu B, Duffy KJ, Sarisky RT. Resistance profile of a hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase benzothiadiazine inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Nov;47(11):3525-30.

- Ni F, Kota S, Takahashi V, Strosberg AD, Snyder JK. Potent inhibitors of hepatitis C core dimerization as new leads for anti-hepatitis C agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Apr 15;21(8):2198-202.
- Nickle DC, Shriner D, Mittler JE, Frenkel LM, Mullins JI. Importance and detection of virus reservoirs and compartments of HIV infection. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6(4):410-6.
- Nicolas O, Boivin I, Bedard J. Genotypic analysis of HCV NS5b variants selected from patients treated with VCH-759, and viral load declines. *J. Hepatol*. 2008; 48(Suppl 2):S317.
- Nicolas O, Boivin I, D'Amours AB, Fex P, Denis F, Selliah S, Bedard J. Activity & genotypic and phenotypic analysis of HCV NS5b variants selected from patients treated with VCH-916. *J. Hepatol*. 2009; 50(Suppl 1): S349.
- Nijhuis M, van Maarseveen NM, Boucher CA. Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(189):299-320.
- Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol*. 2006 Aug;80(15):7569-77.
- Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 15;88(8):3392-6.
- O'Leary JG, Chan JL, McMahon CM, Chung RT. Atorvastatin does not exhibit antiviral activity against HCV at conventional doses: a pilot clinical trial. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):895-8.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. (Acceso Junio 2014). <http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-c-guidelines>
- Oon GCJ. Viral hepatitis - The silent killer. *Annals Academy of Medicine*. 2012; 41: 279–80.
- Ozaras R, Tahan V. Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Apr;7(3):351-61. Review.
- Paeshuysse J, Kaul A, De Clercq E, Rosenwirth B, Dumont JM, Scalfaro P, Bartenschlager R, Neyts J. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology*. 2006 Apr;43(4):761-70.
- Pal S, Sullivan DG, Kim S, Lai KK, Kae J, Cotler SJ, Carithers RL Jr, Wood BL, Perkins JD, Gretch DR. Productive replication of hepatitis C virus in perihepatic lymph nodes in vivo: implications of HCV lymphotropism. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(4):1107-16.
- Paolucci S, Fiorina L, Piralla A, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, Sacchi P, Gatti M, Dossena L, Baldanti F. Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Virol J*. 2012 Oct 24;9:245.
- Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, Bruno R, Baldanti F. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virol J*. 2013 Dec 17;10:355.

- Paredes AM, Blight KJ. A genetic interaction between hepatitis C virus NS4B and NS3 is important for RNA replication. *J Virol*. 2008 Nov;82(21):10671-83.
- Paul JH. Transmission experiments in serum jaundice and infectious hepatitis *The Journal of the American Association*. 1945;Vol. 128, 13: 911.
- Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):6104-8.
- Pavlovic D, Fischer W, Hussey M, Durantel D, Durantel S, Branza-Nichita N, Woodhouse S, Dwek RA, Zitzmann N. Long alkylchain iminosugars block the HCV p7 ion channel. *Adv Exp Med Biol*. 2005;564:3-4.
- Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. 1995 Jun;171(6):1607-10.
- Pawlotsky JM, Martinot-Peignoux M, Poveda JD, Bastie A, Le Breton V, Darthuy F, Rémiré J, Erlinger S, Dhumeaux D, Marcellin P. Quantification of hepatitis C virus RNA in serum by branched DNA-based signal amplification assays. *J Virol Methods*. 1999 May;79(2):227-35.
- Pawlotsky JM. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol*. 1999;31 Suppl 1:71-9. Review.
- Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004 Feb;12(2):96-102. Review.
- Pawlotsky JM. Therapeutic implications of hepatitis C virus resistance to antiviral drugs. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009 Jul;2(4):205-19.
- Pawlotsky JM. New antiviral agents for hepatitis C. *F1000 Biol Rep*. 2012a;4:5.
- Pawlotsky JM, Najera I, Jacobson I. Resistance to mericitabine, a nucleoside analogue inhibitor of HCV RNA-dependent RNA polymerase. *Antivir Ther*. 2012b;17(3):411-23.
- Pawlotsky JM. The science of direct-acting antiviral and host-targeted agent therapy. *Antivir Ther*. 2012c;17(6 Pt B):1109-17.
- Pawlotsky JM. Treatment of chronic hepatitis C: current and future. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013a;369:321-42.
- Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol*. 2013b;59(2):375-82.
- Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies. *Semin Liver Dis*. 2014;34(1):7-8.
- Payen JL. De la jaunisse à l'hépatite C, 5000 ans d'histoire. Editions EDK: Paris, 2002a.
- Payen JL, Rongières M. *Rev Prat*. History of hepatitis. I. From jaundice to viruses. 2002b. Dec 1; 52(19):2097-100.
- Payen JL, Rongières M. *Rev Prat*. History of hepatitis.2. Identification of epidemic hepatitis. 2002c. Dec 15; 52(20):2213-7.
- Payer BA, Reiberger T, Rutter K, Beinhardt S, Staettermayer AF, Peck-Radosavljevic M, Ferenci P. Successful HCV eradication and inhibition of HIV replication by intravenous silibinin in an HIV-HCV coinfecting patient. *J Clin Virol*. 2010 Oct;49(2):131-3.

- Pedersen J, Jensen TB, Carlsen TH, Schønning K, Christensen PB, Laursen AL, Krarup H, Bukh J, Weis N. Neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C, genotype 1, against a panel of genotype 1 culture viruses: lack of correlation to treatment outcome. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e62674
- Peng LF, Schaefer EA, Maloof N, Skaff A, Berical A, Belon CA, Heck JA, Lin W, Frick DN, Allen TM, Mizioroko HM, Schreiber SL, Chung RT. Ceestatin, a novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus replication, inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *J Infect Dis*. 2011 Aug 15;204(4):609-16.
- Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Levey AS. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med*. 1991 Aug 15;325(7):454-60.
- Perz JF, Alter MJ. The coming wave of HCV-related liver disease: dilemmas and challenges. *J Hepatol*. 2006 Mar;44(3):441-3.
- Petit JM, Benichou M, Duvillard L, Jooste V, Bour JB, Minello A, Verges B, Brun JM, Gambert P, Hillon P. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am J Gastroenterol*. 2003 May;98(5):1150-4.
- Pfeifer U, Thomssen R, Legler K, Böttcher U, Gerlich W, Weinmann E, Klinge O. Experimental non-A, non-B hepatitis: four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1980;33(3):233-43.
- Pietschmann T, Zayas M, Meuleman P, Long G, Appel N, Koutsoudakis G, Kallis S, Leroux-Roels G, Lohmann V, Bartenschlager R. Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathog*. 2009 Jun;5(6):e1000475.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998 Oct 30;282(5390):938-41.
- Plaza Z, Soriano V, Vispo E, Gonzalez M del Mar, Barreiro P, Seclén E, Poveda E. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. *Antivir Ther*. 2012;17(5):921-6.
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 2009 Feb 12;457(7231):882-6.
- Pol S, Aerssens J, Zeuzem S, Andreone P, Lawitz EJ, Roberts S, Younossi Z, Foster GR, Focaccia R, Horban A, Pockros PJ, Van Heeswijk R, de Meyer S, Luo D, Botfield M, Beumont M, Picchio G. Similar SVR rates in IL28B cc, ct or tt prior relapser partial- or null-responder patients treated with telaprevir/peginterferon/ribavirin: retrospective analysis of the realize study. *Journal of Hepatology* 2011;54 (Suppl. 1): S6–S7.
- Pol S, Ghalib RH, Rustgi VK, Martorell C, Everson GT, Tatum HA, Hézode C, Lim JK, Bronowicki JP, Abrams GA, Bräu N, Morris DW, Thuluvath PJ, Reindollar RW, Yin PD,

- Diva U, Hindes R, McPhee F, Hernandez D, Wind-Rotolo M, Hughes EA, Schnittman S. Daclatasvir for previously untreated chronic hepatitis C genotype-1 infection: a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 2a trial. *Lancet Infect Dis.* 2012 Sep;12(9):671-7.
- Pol S. Daclatasvir, an efficient inhibitor of the hepatitis C virus replication complex protein NS5A: review of virologic data, treatment rationale and clinical trials. *Clinical Investigation* 2013 3:2, 191-207.
- Poordad F, Bronowicki JP, Gordon SC, Zeuzem S, Jacobson IM, Sulkowski MS, Poynard T, T.R. Morgan, M. Burroughs, Sniukiene V, Boparai N, Brass CA, Albrecht JK, Bacon BR. IL28B polymorphism predicts virologic response in patients with Hepatitis C genotype 1 treated with Boceprevir (BOC) combination therapy. *Journal of Hepatology* 2011a;54 (Suppl.1):S6.
- Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki JP; SPRINT-2 Investigators. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2011b Mar 31;364(13):1195-206.
- Poordad F, Lawitz E, Kowdley KV, Cohen DE, Podsadecki T, Siggelkow S, Heckaman M, Larsen L, Menon R, Koev G, Tripathi R, Pilot-Matias T, Bernstein B. Exploratory study of oral combination antiviral therapy for hepatitis C. *N Engl J Med.* 2013 Jan 3;368(1):45-53.
- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet.* 1997 Mar 22;349(9055):825-32.
- Poynard T, Ratziu V, Benhamou Y, Opolon P, Cacoub P, Bedossa P. Natural history of HCV infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2000 Apr;14(2):211-28.
- Practice guidelines for the treatment of hepatitis C: recommendations from an AISF/SIMIT/SIMAST Expert Opinion Meeting. Italian Association for the Study of the Liver; Italian Society of Infectious, Tropical Diseases; Italian Society for the Study of Sexually Transmitted Diseases. *Dig Liver Dis.* 2010 Feb;42(2):81-91.
- Pradat P, Trépo C. HCV: epidemiology, modes of transmission and prevention of spread. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2000 Apr;14(2):201-10. Review.
- Premkumar A, Wilson L, Ewart GD, Gage PW. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett.* 2004 Jan 16;557(1-3):99-103.
- Prieto M, Berenguer M, Rimola A, Loinaz C, Barrios C, Clemente G, Figueras J, Vargas V, Casafont F, Pons JA, Herrero JI. Liver transplantation in hepatitis C. A Spanish multi-centre experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1998 Sep;10(9):771-6.
- Prince A, Brotman B, Grady G, *et al.* Long incubation post transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. *Lancet* 1974; 2: 2416.
- Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1968. 60: 814-821.

- Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1979 Feb;160(2):213-21.
- Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science.* 2001 Jun 22;292(5525):2323-5.
- Pybus OG, Drummond AJ, Nakano T, Robertson BH, Rambaut A. The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol.* 2003 Mar;20(3):381-7.
- Qiu P, Sanfiorenzo V, Curry S, Guo Z, Liu S, Skelton A, Xia E, Cullen C, Ralston R, Greene J, Tong X. Identification of HCV protease inhibitor resistance mutations by selection pressure-based method. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jun;37(10):e74.
- Raboissou P, de Kock H, Rosenquist A, Nilsson M, Salvador-Oden L, Lin TI, Roue N, Ivanov V, Wähling H, Wickström K, Hamelink E, Edlund M, Vrang L, Vendeville S, Van de Vreken W, McGowan D, Tahri A, Hu L, Boutton C, Lenz O, Delouvroy F, Pille G, Surleraux D, Wigerinck P, Samuelsson B, Simmen Structure-activity relationship study on a novel series of cyclopentane-containing macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3/4A protease leading to the discovery of TMC435350. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008 Sep 1;18(17):4853-8.
- Radkovsky Raska K. Some questions of the development of the epidemic process in infectious hepatitis. *Rev Czech Med.* 1956;2(4):321-30.
- Ralston R. Development of resistance to boceprevir: observations from clinical trials [abstract]. In: Program and abstracts of the 2nd International Workshop on Hepatitis C, Resistance and New Compounds (Boston). 2007.
- Ramos-Onsins SE., Rozas J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 2002. 19:2092-2100.
- Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T, Rice CM. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 31;104(31):12884-9.
- Rantala M, van de Laar MJ. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - Euro Surveill. 2008 May 22;13(21). pii: 18880. Review.
- Reddy KR, Nelson DR, Zeuzem S. Ribavirin: current role in the optimal clinical management of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2009 Feb;50(2):402-11.
- Reesink HW, Janssen HLA, Zeuzem S, Lawitz E, Rodriguez-Torres M, Patel K, Chen A, Davis C, King B, Levin A, Hodges MR. Final Results - Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Safety, Anti-viral Proof-of-Concept Study of Miravirsin, an Oligonucleotide Targeting miR-122, in Treatment-naive Patients with Genotype 1 Chronic HCV Infection. *Journal of Hepatology* April 2012, Volume 56, Supplement 2, Pages S26.
- Regenstein F. New approaches to the treatment of chronic viral hepatitis B and C. *Am J Med.* 1994 Jan 17;96(1A):47S-51S. Review.

- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2005 Mar;5(3):215-29. Review.
- Rehermann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med.* 2013 Jul;19(7):859-68. Review.
- Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet MS, Longerich T, Diehl S, Ramirez F, Balla T, Rohr K, Kaul A, Bühler S, Pepperkok R, Lengauer T, Albrecht M, Eils R, Schirmacher P, Lohmann V, Bartenschlager R. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe.* 2011 Jan 20;9(1):32-45.
- Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res.* 2011 Sep 1;39(17):7716-29.
- Romano KP, Ali A, Royer WE, Schiffer CA. Drug resistance against HCV NS3/4A inhibitors is defined by the balance of substrate recognition versus inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec 7;107(49):20986-91.
- Rong L, Dahari H, Ribeiro RM, Perelson AS. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Sci Transl Med.* 2010 May 5;2(30):30ra32.
- Roque-Afonso AM, Jiang J, Penin F, Tareau C, Samuel D, Petit MA, Bismuth H, Dussaix E, Féray C. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol.* 1999 Nov;73(11):9213-21.
- Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R, Gigou M, Dussaix E, Samuel D, Féray C. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol.* 2005 May;79(10):6349-57.
- Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1161-8.
- Rydberg EH, Cellucci A, Bartholomew L, Mattu M, Barbato G, Ludmerer SW, Graham DJ, Altamura S, Paonessa G, De Francesco R, Migliaccio G, Carfi A. Structural basis for resistance of the genotype 2b hepatitis C virus NS5B polymerase to site A non-nucleoside inhibitors. *J Mol Biol.* 2009 Jul 31;390(5):1048-59.
- Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med.* 2012 Jan 8;18(2):281-5.
- Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100(20):11646-51.

- Saleh MG, Tibbs CJ, Koskinas J, Pereira LM, Bomford AB, Portmann BC, McFarlane IG, Williams R. Hepatic and extrahepatic hepatitis C virus replication in relation to response to interferon therapy. *Hepatology*. 1994 Dec;20(6):1399-404.
- Salvatierra K, Fareleski S, Forcada A, López-Labrador FX. Hepatitis C virus resistance to new specifically-targeted antiviral therapy: A public health perspective. *World J Virol*. 2013 Feb 12;2(1):6-15.
- Sánchez R, Serra F, Tárraga J, Medina I, Carbonell J, Pulido L, de María A, Capella-Gutiérrez S, Huerta-Cepas J, Gabaldón T, Dopazo J, Dopazo H. Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. *Nucleic Acids Research* 2011 Jul;39(Web Server issue):W470-4.
- Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, Del Ninno E, Morabito A, Colombo M. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology*. 2006 Jun;43(6):1303-10.
- Sansonno D, Iacobelli AR, Cornacchiulo V, Iodice G, Dammacco F. Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Clin Exp Immunol*. 1996 Mar;103(3):414-21.
- Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W, Heim MH. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 13;105(19):7034-9.
- Sarrazin C, Rouzier R, Wagner F, Forestier N, Larrey D, Gupta SK, Hussain M, Shah A, Cutler D, Zhang J, Zeuzem S. SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology*. 2007a Apr;132(4):1270-8.
- Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Müh U, Welker M, Wincheringer D, Zhou Y, Chu HM, Lin C, Weegink C, Reesink H, Zeuzem S, Kwong AD. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology*. 2007b May;132(5):1767-77.
- Sarrazin C, Berg T, Ross RS, Schirmacher P, Wedemeyer H, Neumann U, Schmidt HH, Spengler U, Wirth S, Kessler HH, Peck-Radosavljevic M, Ferenci P, Vogel W, Moradpour D, Heim M, Cornberg M, Protzer U, Manns MP, Fleig WE, Dollinger MM, Zeuzem S. Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis C virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection. *Z Gastroenterol*. 2010 Feb;48(2):289-351.
- Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2010 Feb;138(2):447-62. Review.
- Sato C, Enomoto N. Specific hepatitis C virus NS5A sequences determine the outcome of interferon treatment. *Gastroenterology*. 1996 Oct;111(4):1152-4

- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 2002 Oct 1;21(19):5017-25.
- Schaefer EA, Chung RT. Anti-hepatitis C virus drugs in development. *Gastroenterology.* 2012 May;142(6):1340-1350.e1.
- Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, Eugen-Olsen J, Bukh J. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 22;105(3):997-1002.
- Scheel Troel KH, Rice Charles M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013 Jul;19(7):837-49.
- Schiano TD, Charlton M, Younossi Z, Galun E, Pruett T, Tur-Kaspa R, Eren R, Dagan S, Graham N, Williams PV, Andrews J. Monoclonal antibody HCV-AbXTL68 in patients undergoing liver transplantation for HCV: results of a phase 2 randomized study. *Liver Transpl.* 2006 Sep;12(9):1381-9.
- Schiff E, Poordad F, Jacobson IM, Steven L, Flamm SL, Bruce R, Bacon BR, Lawitz EJ, Gordon SR, McHutchison JG, Ghalib R, Poynard T, Sulkowski MS, Trepo C, Rizzetto M, Zeuzem S, Marcellin P, Mendez TP, Brass CA, Albrecht J. Role of Interferon Response During RE-Treatment of Null Responders with Boceprevir Combination Therapy: Results of Phase II Trial. *Gastroenterology* 2008 April; 134, Issue 4 (Suppl. 1): A-755.
- Schlütter J. Therapeutics: new drugs hit the target. *Nature.* 2011 Jun 8;474(7350):S5-7.
- Schneider MD, Sarrazin C. Antiviral therapy of hepatitis C in 2014: Do we need resistance testing? *Antiviral Res.* 2014 May;105:64-71.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin ver 3.5: A software package for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory Dept. of Anthropology, University of Geneva. 2000.
- Schoenfeld RC, Bourdet DL, Brameld KA, Chin E, de Vicente J, Fung A, Harris SF, Lee EK, Le Pogam S, Leveque V, Li J, Lui AS, Najera I, Rajyaguru S, Sangi M, Steiner S, Talamas FX, Taygerly JP, Zhao J. Discovery of a novel series of potent non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus NS5B. *J Med Chem.* 2013 Oct 24;56(20):8163-82.
- Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, et al: Posttransfusion hepatitis, 1973-1975: A Veterans Administration cooperative study, In Vyas GN, Cohen S, Schmid R (Eds): *Viral Hepatitis.* Philadelphia, Franklin Institute, 1978:219-242.
- Seeff LB, Beebe GW, Hoofnagle JH, *et al.* A serological follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. *N Eng J Med.* 1987; 316: 965-70.
- Seeff LB, Hoofnagle JH. Appendix: The National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C 2002. *Clin Liver Dis.* 2003 Feb;7(1):261-87.
- Seiwert S. Sequence variation of NS3 and NS4A in hepatitis C virus (HCV) replicons following exposure to ITMN-191 concentrations likely to encompass those achieved in

- human liver following clinical dosing [abstract]. In: Program and abstracts of the First International Workshop on Hepatitis C Resistance and New Compounds (Boston). 2006.
- Seiwert SD, Hon J, Lim SR, Wang T, Tan H, Blatt LM. Sequence variation of NS3/4A in HCV replicons exposed to ITMN-191 concentrations encompassing those likely to be achieved following clinical dosing. *J Hepatol* 2007; 46:S244-S245.
- Seiwert SD, Andrews SW, Jiang Y, Serebryany V, Tan H, Kossen K, Rajagopalan PT, Misialek S, Stevens SK, Stoycheva A, Hong J, Lim SR, Qin X, Rieger R, Condroski KR, Zhang H, Do MG, Lemieux C, Hingorani GP, Hartley DP, Josey JA, Pan L, Beigelman L, Blatt LM. Preclinical characteristics of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor ITMN-191 (R7227). *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Dec;52(12):4432-41.
- Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol*. 2005;32(2):92-101.
- Sentandreu V, Jiménez-Hernández N, Torres-Puente M, Bracho MA, Valero A, Gosalbes MJ, Ortega E, Moya A, González-Candelas F. Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PLoS One*. 2008 Sep 18;3(9):e3239.
- Sentandreu V, González-Candelas F, Moya A, López- Labrador FX. Hepatitis C virus NS3/4A protease and NS5B polymerase polymorphism in worldwide isolates: anticipated problems for STAT-C therapies in non-1 genotypes. In: Fourth European Congress of Virology; Cernobbio, Italy; 2010 Apr 7-11
- Shannon C, Weaver W. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana-USA. 1949.
- Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem*. 2007 Dec 21;282(51):37158-69.
- Sheaffer AK, Mulherin HM, Chen C, Dunaj CV, Lee MS, Franco DL, Campbell J, Sit SY, Scola P, McPee F. Characterization of HCV replicons resistant to inhibitors of NS3 protease activity. In: Proceedings of the 7th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, 2004. [Abstract 290].
- Shi ST, Herlihy KJ, Graham JP, Fuhrman SA, Doan C, Parge H, Hickey M, Gao J, Yu X, Chau F, Gonzalez J, Li H, Lewis C, Patick AK, Duggal R. In vitro resistance study of AG-021541, a novel nonnucleoside inhibitor of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Feb;52(2):675-83.
- Shi W, Freitas IT, Zhu C, Zheng W, Hall WW, Higgins DG. Recombination in hepatitis C virus: identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. *PLoS One*. 2012;7(7):e41997.
- Shih IH, Vliegen I, Peng B, Yang H, Hebner C, Paeshuyse J, Pürstinger G, Fenaux M, Tian Y, Mabery E, Qi X, Bahador G, Paulson M, Lehman LS, Bondy S, Tse W, Reiser H, Lee WA, Schmitz U, Neyts J, Zhong W. Mechanistic characterization of GS-9190 (Tegobuvir), a novel nonnucleoside inhibitor of hepatitis C virus NS5B polymerase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep;55(9):4196-203.

- Shih JW, Mur JI, Alter HJ. Non-A, non-B hepatitis: advances and unfulfilled expectations of the first decade. *Prog Liver Dis.* 1986; 8:433-52. Review.
- Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, *et al.* Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012a; 109:941-6.
- Shimakami T, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol* 2012b; 86:7372- 83.
- Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell RH, Alter HJ, London WT. Non-A, non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science.* 1979 Jul 13;205(4402):197-200.
- Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH, Yoshikura H. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun 15;89(12):5477-81.
- Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Shapiro M, Wong DC, Purcell RH, Yoshikura H. Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol.* 1998 Jun;79 (Pt 6):1383-6.
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol.* 1993 Nov;74 (Pt 11):2391-9.
- Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, *et al.* A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology.* 1994 May;19(5):1321-4.
- Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology.* 1995. 21, 570-583.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005 Oct;42(4):962-73. Review.
- Simmonds P. SSE: a nucleotide and amino acid sequence analysis platform. *BMC Res Notes.* 2012 Jan 20;5:50.
- Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:1-15.
- Simonsen KL, Churchill GA, Aquadro CF. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics.* 1995 Sep;141(1):413-29.
- Sims KD, Lemm J, Eley T, Liu M, Berglind A, Sherman D, Lawitz E, Vutikullird AB, Tebas P, Gao M, Pasquinelli C, Grasele DM. Randomized, Placebo-Controlled, Single-Ascending-Dose Study of BMS-791325, a Hepatitis C Virus (HCV) NS5B Polymerase Inhibitor, in HCV Genotype 1 Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jun;58(6):3496-3503.

- Sklan EH, Glenn JS. HCV NS4B: From Obscurity to Central Stage. In: Tan SL, editor. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006. Chapter 8.
- Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology*. 2014 Jan;59(1):318-27.
- Smith JO, Sterling RK. Systematic review: non-invasive methods of fibrosis analysis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009 Sep 15;30(6):557-76.
- Smuts HE, Kannemeyer J. Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. *J Clin Microbiol*. Jun 1995; 33(6): 1679–1681.
- Sofia MJ, Bao D, Chang W, Du J, Nagarathnam D, Rachakonda S, Reddy PG, Ross BS, Wang P, Zhang HR, Bansal S, Espiritu C, Keilman M, Lam AM, Steuer HM, Niu C, Otto MJ, Furman PA. Discovery of a β -d-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem*. 2010 Oct 14;53(19):7202-18.
- Sofia MJ, Chang W, Furman PA, Mosley RT, Ross BS. Nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA-polymerase. *J Med Chem*. 2012 Mar 22;55(6):2481-531.
- Soriano V, Vispo E, Poveda E, Labarga P, Martin-Carbonero L, Fernandez-Montero JV, Barreiro P. Directly acting antivirals against hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Aug;66(8):1673-86.
- Spangenberg HC, Viazov S, Kersting N, Neumann-Haefelin C, McKinney D, Roggendorf M, von Weizsäcker F, Blum HE, Thimme R. Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2005 Oct;42(4):828-37
- Stamatakis A. "RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models", *Bioinformatics* 2006. 22(21):2688–2690.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst Biol*. 2008 Oct;57(5):758-71.
- Stamatakis A, Ott M. Efficient computation of the phylogenetic likelihood function on multi-gene alignments and multi-core architectures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008 Dec 27;363(1512):3977-84.
- Stättermayer AF, Stauber R, Hofer H, Rutter K, Beinhardt S, Scherzer TM, Zinober K, Datz C, Maieron A, Dulic-Lakovic E, Kessler HH, Steindl-Munda P, Strasser M, Krall C, Ferenci P. Impact of IL28B genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011 Apr;9(4):344-350.e2.
- Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog*. 2007a Jul;3(7):e103.

- Steinmann E, Whitfield T, Kallis S, Dwek RA, Zitzmann N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Antiviral effects of amantadine and iminosugar derivatives against hepatitis C virus. *Hepatology*. 2007b Aug;46(2):330-8.
- Steinmann E, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses*. 2010 Sep;2(9):2078-95.
- StGelais C, Foster TL, Verow M, Atkins E, Fishwick CW, Rowlands D, Harris M, Griffin S. Determinants of hepatitis C virus p7 ion channel function and drug sensitivity identified in vitro. *J Virol*. 2009 Aug;83(16):7970-81.
- Strosberg AD, Kota S, Takahashi V, Snyder JK, Mousseau G. Core as a novel viral target for hepatitis C drugs. *Viruses*. 2010 Aug;2(8):1734-51.
- Sulkowski M, Gardiner D, Lawitz E, Hinestrosa F, Nelson D, Thuluvath P, Rodriguez-Torres M, Lok A, Schwartz H, Reddy KR, Eley T, Wind-Rotolo M, Huang S-P, Gao M, McPhee F, Hines R, Symonds W, Pasquinelli C, Grasela D. Potent viral suppression with the all-oral combination of daclatasvir (NS5A inhibitor) and GS-7977 (nucleotide NS5B inhibitor), +/- ribavirin, in treatment-naïve patients with chronic HCV GT1, 2, or 3 (100% SVR gt1, 91% gt2). *J Hepatol*. 2012; 56: S560.
- Sullivan JC, De Meyer S, Bartels DJ, Dierynck I, Zhang EZ, Spinks J, Tigges AM, Ghys A, Dorrian J, Adda N, Martin EC, Beumont M, Jacobson IM, Sherman KE, Zeuzem S, Picchio G, Kieffer TL. Evolution of treatment-emergent resistant variants in telaprevir phase 3 clinical trials. *Clin Infect Dis*. 2013 Jul;57(2):221-9.
- Sun SC, Bae A, Qi X, Harris J, Wong KA, Miller MD, Mo H. Natural variation in drug susceptibility to HCV polymerase inhibitors in treatment-naïve HCV patient isolates. *J Viral Hepat*. 2011 Dec;18(12):861-70.
- Susser S, Welker MW, Zettler M, Wohnsland A, Hughes E, Ralston R, Tong X, Zeuzem S, Sarrazin C. Clonal analysis of mutations selected in the HCV NS3 protease domain of genotype 1 non-responders treated with boceprevir (SCH503034). *J Hepatol* 2008; 48: S29.
- Susser S, Welsch C, Wang Y, Zettler M, Domingues FS, Karey U, Hughes E, Ralston R, Tong X, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1709-18.
- Susser S, Forestier N, Vermehren J, Grigorian N, Karey U, Zeuzem S, Sarrazin C. Decline of detectable resistance mutations within the NS3 protease quasispecies during long-term follow-up after treatment with telaprevir. *J Hepatol* 2010; 52: S300.
- Susser S, Vermehren J, Forestier N, Welker MW, Grigorian N, Füller C, Perner D, Zeuzem S, Sarrazin C. Analysis of long-term persistence of resistance mutations within the hepatitis C virus NS3 protease after treatment with telaprevir or boceprevir. *J Clin Virol*. 2011 Dec;52(4):321-7.
- Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. 2006;3(2):41-6.

- Syder AJ, Lee H, Zeisel MB, Grove J, Soulier E, Macdonald J, Chow S, Chang J, Baumert TF, McKeating JA, McKelvy J, Wong-Staal F. Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol.* 2011 Jan;54(1):48-55.
- Tabor E, Gerety RJ, Drucker JA, Seeff LB, Hoofnagle JH, Jackson DR, April M, Barker LF, Pineda-Tamondong G. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet.* 1978 Mar 4;1(8062):463-6.
- Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim SS, Sakamoto N, Xavier RJ, Chung RT. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe.* 2009 Mar 19;5(3):298-307
- Tai AW, Salloum S. The role of the phosphatidylinositol 4-kinase PI4KA in hepatitis C virus-induced host membrane rearrangement. *PLoS One.* 2011;6(10):e26300.
- Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989. 123:585-595.
- Takikawa S, Ishii K, Aizaki H, Suzuki T, Asakura H, Matsuura Y, Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol.* 2000 Jun;74(11):5066-74.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). 2011.
- Tanwandee T. *et al.* High sustained viral response with a HCV p7 inhibitor, bit225: Antiviral activity and tolerability of bit225 plus pegylated interferon alfa 2b and weight-based ribavirin for 28 days in HCV treatment-naive patients. *Hepatology.* 2012; 56, 1530.
- Taremi SS, Beyer B, Maher M, Yao N, Prosis W, Weber PC, Malcolm BA. Construction, expression, and characterization of a novel fully activated recombinant single-chain hepatitis C virus protease. *Protein Sci.* 1998 Oct;7(10):2143-9.
- Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis.* 2010 Feb;14(1):1-21, vii. Review.
- Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature.* 2005 May 19;435(7040):374-9.
- Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway JC, Rice CM. Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol.* 2008 Feb;82(3):1073-83.
- Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology.* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S99-105. Review.
- Theise ND. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. *Mod Pathol.* 2007 Feb;20 Suppl 1:S3-14. Review
- Thibeault D, Bousquet C, Gingras R, Lagacé L, Maurice R, White PW, Lamarre D. Sensitivity of NS3 serine proteases from hepatitis C virus genotypes 2 and 3 to the inhibitor BILN 2061. *J. Virol.* 2004; 78 (14):7352–7359.

- Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, Purcell RH, Rice CM. Family Flaviviridae. En: *Virus Taxonomy*. 8th ICTV Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Eds. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., y Ball L.A. Elsevier/Academic Press. 2005. pp. 981-998.
- Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2001 Nov 19;194(10):1395-406.
- Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15661-8.
- Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, Nolt K, Nelson KE, Strathdee SA, Johnson L, Laeyendecker O, Boitnott J, Wilson LE, Vlahov D. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA*. 2000 Jul 26;284(4):450-6.
- Thomas E, Ghany MG, Liang TJ. The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother*. 2012 Sep 25;23(1):1-12.
- Thompson AJ, McHutchison JG. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J Viral Hepat*. 2009 Jun;16(6):377-87.
- Thompson AJ, Locarnini S. Direct-acting antiviral agents for the treatment of HCV. *Antivir Ther*. 2012;17(6 Pt B):1105-7.
- Thompson AJ, McHutchison JG. Will IL28B polymorphism remain relevant in the era of direct-acting antiviral agents for hepatitis C virus? *Hepatology*. 2012 Jul;56(1):373-81.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
- Thompson PA, Patel R, Showalter RE, Li C, Appleman JR, Steffy K. In vitro studies demonstrate that combinations of antiviral agents that include HCV polymerase inhibitor ANA598 have the potential to overcome viral resistance. *Hepatology* 2008; 48(Suppl 1): S1164A.
- Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*. 2008 Jan;47(1):17-24.
- Tokita H, Shrestha SM, Okamoto H, Sakamoto M, Horikita M, Iizuka H, Shrestha S, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Nepal with novel genotypes and their classification into the third major group. *J Gen Virol*. 1994a Apr;75 (Pt 4):931-6.
- Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, Song P, Nakata S, Chosa T, Iizuka H, Mishihiro S, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994b Nov 8;91(23):11022-6.

- Tokita H, Okamoto H, Luengrojanyakul P, Vareesangthip K, Chainuvati T, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups. *J Gen Virol.* 1995 Sep;76 (Pt 9):2329-35.
- Tomei L, Altamura S, Bartholomew L, Biroccio A, Ceccacci A, Pacini L, Narjes F, Gennari N, Bisbocci M, Incitti I, Orsatti L, Harper S, Stansfield I, Rowley M, De Francesco R, Migliaccio G. Mechanism of action and antiviral activity of benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 2003 Dec;77(24):13225-31.
- Tomei L, Altamura S, Bartholomew L, Bisbocci M, Bailey C, Bosserman M, Cellucci A, Forte E, Incitti I, Orsatti L, Koch U, De Francesco R, Olsen DB, Carroll SS, Migliaccio G. Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. *J Virol.* 2004 Jan;78(2):938-46.
- Tong X, Guo Z, Wright-Minogue J, Xia E, Prongay A, Madison V, Qiu P, Venkatraman S, Velazquez F, Njoroge FG, Malcolm BA. Impact of naturally occurring variants of HCV protease on the binding of different classes of protease inhibitors. *Biochemistry.* 2006 Feb 7;45(5):1353-61.
- Tong X, Chase R, Skelton A, Chen T, Wright-Minogue J, Malcolm BA. Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res.* 2006 Jun;70(2):28-38.
- Tong X, Bogen S, Chase R, Girijavallabhan V, Guo Z, Njoroge FG, Prongay A, Saksena A, Skelton A, Xia E, Ralston R. Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. *Antiviral Res.* 2008 Mar;77(3):177-85.
- Tong X, Le Pogam S, Li L, Haines K, Piso K, Baronas V, Yan JM, So SS, Klumpp K, Nájera I. In vivo emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. *J Infect Dis.* 2014a Mar 1;209(5):668-75.
- Tong X, Lewyn Li L, Kristin Haines K, Isabel Najera I. The NS5B S282T Resistant Variant and Two Novel Amino Acid Substitutions That Affect Replication Capacity Were Identified in Hepatitis C Virus Infected Patients Treated with Mericitabine and Danoprevir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014b Jun;58(6):3105-3114.
- Torres-Puente M, Bracho MA, Jiménez N, García-Robles I, Moya A, González-Candelas F. Sampling and repeatability in the evaluation of hepatitis C virus genetic variability. *J Gen Virol.* 2003 Sep;84(Pt 9):2343-50.
- Treviño A, de Mendoza C, Parra P, Rodríguez C, Madejón A, Plaza Z, del Romero J, Poveda E, Soriano V. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV-coinfected patients. *Antivir Ther.* 2011;16(3):413-6.
- Troke PJ, Lewis M, Simpson P, Gore K, Hammond J, Craig C, Westby M. Characterization of resistance to the nonnucleoside NS5B inhibitor filibuvir in hepatitis C virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. 56:1331-1341.

- Trotard M, Lepère-Douard C, Régeard M, Piquet-Pellorce C, Lavillette D, Cosset FL, Gripon P, Le Seyec J. Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *FASEB J.* 2009 Nov;23(11):3780-9.
- Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol.* 2006 Feb;80(4):1734-41.
- Tsiquaye KN, Zuckerman AJ. New human hepatitis virus. *Lancet.* 1979 May 26;1(8126):1135-6.
- Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol.* 1992 Mar;66(3):1476-83.
- Tygstrup N. Viral Hepatitis. *Clinics in Gastroenterology* 1980; 3: 281.
- Vaillancourt FH, Pilote L, Cartier M, Lippens J, Liuzzi M, Bethell RC, Cordingley MG, Kukolj G. Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology.* 2009 Apr 25;387(1):5-10.
- van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, Wedemeyer H, Dufour JF, Lammert F, Duarte-Rojo A, Heathcote EJ, Manns MP, Kuske L, Zeuzem S, Hofmann WP, de Knegt RJ, Hansen BE, Janssen HL. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA.* 2012 Dec 26;308(24):2584-93.
- Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, Mavromara P. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem.* 2002 May 17;277(20):17713-21.
- Veldt BJ, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, Zeuzem S, Manns MP, Hansen BE, Schalm SW, Janssen HL. Sustained virologic response and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Ann Intern Med.* 2007 Nov 20;147(10):677-84.
- Verdegem D, Badillo A, Wieruszkeski JM, Landrieu I, Leroy A, Bartenschlager R, Penin F, Lippens G, Hanouille X. Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. *J Biol Chem.* 2011 Jun 10;286(23):20441-54.
- Vermehren J, Susser S, Lange CM, Forestier N, Karey U, Hughes E, Ralston R, Tong X, Zeuzem S, Sarrazin C. Mutations selected in the hepatitis C virus NS3 protease domain during sequential treatment with boceprevir with and without pegylated interferon alfa-2b. *J Viral Hepat.* 2012 Feb;19(2):120-7.
- Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J. Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):10159-68.
- Villano S, Howe A, Raible D, Harper D, Speth J, Bichier G. Analysis of HCV NS5B genetic variants following monotherapy with HCV-796, a nonnucleoside polymerase inhibitor, in

- treatment naïve HCV-infected patients. *Hepatology* 2006, Vol. 44, No. 4, Suppl. 1: 607A-608A. Abstract: 1127.
- Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, Owen DM, Grove J, Brimacombe C, McKeating JA, Pécheur EI, Graf TN, Oberlies NH, Lohmann V, Cao F, Tavis JE, Polyak SJ. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology*. 2010;51(6):1912-21.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005 Jul;11(7):791-6.
- Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*. 2001 May;7(5):710-21.
- Walker J, Crosby R, Wang A, Woldu E, Vamathevan J, Voitenleitner C, You S, Remlinger K, Duan M, Kazmierski W, Hamatake R. Preclinical characterization of GSK2336805, a novel inhibitor of hepatitis C virus replication that selects for resistance in NS5A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jan;58(1):38-47.
- Wall L, Dougherty A, 'BinGOs' Williams C, Rolsky D, Mitchell D, Schroeder M, Signes R, Orton Y. This is perl 5, version 16, subversion 3 (v5.16.3) built for IA64.ARCHREV_0-thread-multi-LP64-ld. Copyright 1987-2012. The source has been released on 2013-03-11.
- Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol*. 1993 Jun;67(6):3338-44.
- Wang C, Jia L, Huang H, Qiu D, Valera L, Huang X, Sun JH, Nower PT, O'Boyle DR 2nd, Gao M, Fridell RA. In vitro activity of BMS-790052 on hepatitis C virus genotype 4 NS5A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1588-90.
- Wang JT, Sheu JC, Lin JT, Wang TH, Chen DS. Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis*. 1992 Nov;166(5):1167-9.
- Wang P, Heitman J. The cyclophilins. *Genome Biology* 2005, 6:226.
- Waris G, Tardif K, Siddiqui A. Endoplasmic Reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces and ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem. Pharmacol*. 2002; 64:1425-1430.
- Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):1-16.
- Welsch C, Domingues FS, Susser S, Antes I, Hartmann C, Mayr G, Schlicker A, Sarrazin C, Albrecht M, Zeuzem S, Lengauer T. Molecular basis of telaprevir resistance due to V36 and T54 mutations in the NS3/4A protease of the hepatitis C virus. *Genome Biol*. 2008 Jan 23;9(1):R16
- White CP, Hirsch G, Patel S, Adams F, Peltekian KM. Complementary and alternative medicine use by patients chronically infected with hepatitis C virus. *Can J Gastroenterol*. 2007 Sep;21(9):589-95.

- Wiese M, Grüngreiff K, Güthoff W, Lafrenz M, Oesen U, Porst H; East German Hepatitis C Study Group. Outcome in a hepatitis C (genotype 1b) single source outbreak in Germany—a 25-year multicenter study. *J Hepatol.* 2005 Oct;43(4):590-8.
- Wilkin TJ, Gulick RM. CCR5 antagonism in HIV infection: current concepts and future opportunities. *Annu Rev Med.* 2012;63:81-93.
- Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, Furtado MR, Cao Y, Ho DD, Safrit JT. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science.* 1996 Apr 26;272(5261):537-42.
- Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, Weinman SA. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog.* 2010 Sep 2;6(9):e1001087
- Wyke RJ, Tsiquaye KN, Thornton A, White Y, Portmann B, Das PK, Zuckerman AJ, Williams R. Transmission of non-A non-B hepatitis to chimpanzees by factor-IX concentrates after fatal complications in patients with chronic liver disease. *Lancet.* 1979 Mar 10;1(8115):520-4.
- Wyles DL. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J Infect Dis.* 2013 Mar;207 Suppl 1:S33-9.
- Wyles DL, Gutierrez JA. Importance of HCV genotype 1 subtypes for drug resistance and response to therapy. *J Viral Hepat.* 2014 Apr;21(4):229-40.
- Xiao F, Fofana I, Thumann C, Maily L, Alles R, Robinet E, Meyer N, Schaeffer M, Habersetzer F, Doffoël M, Leyssen P, Neyts J, Zeisel MB, Baumert TF. Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C. *Gut.* 2014 May 21. pii: gutjnl-2013-306155
- Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* 2001 Jul 16;20(14):3840-8.
- Yang F, Robotham JM, Nelson HB, Irsigler A, Kenworthy R, Tang H. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J Virol.* 2008 Jun;82(11):5269-78.
- Yang G, Wiles J, Patel D, Zhao Y, Fabrycki J, Weinheimer S, Marlcor C, Rivera J, Wang Q, Gadhachanda V, Hashimoto A, Chen D, Pais G, Wang X, Deshpande M, Stauber K, Huang M, Phadke A. Preclinical characteristics of ACH-3102: a novel HCV NS5A inhibitor with improved potency against genotype-1a virus and variants resistant to 1st generation of NS5A inhibitors. *J Hepatol* 2012; 56 suppl 2:S330.
- Yang W, Zhao Y, Fabrycki J, Hou X, Nie X, Sanchez A, Phadke A, Deshpande M, Agarwal A, Huang M. Selection of replicon variants resistant to ACH-806, a novel hepatitis C virus inhibitor with no cross-resistance to NS3 protease and NS5B polymerase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jun;52(6):2043-52.
- Yang W, Sun Y, Hou X, Zhao Y, Fabrycki J, Chen D, Wang X, Agarwal A, Phadke A, Deshpande M, Huang M. ACH-806, an NS4A antagonist, inhibits hepatitis C virus

- replication by altering the composition of viral replication complexes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul;57(7):3168-77.
- Yang XF, Pan L, Wang Y, Ma L, Zhang Y, Zhou Y, Hao CQ, Ma ZY, Jia ZS. Generation of six genotypes of infectious HCV pseudo-particles and detection of neutralizing antibodies in HCV patients. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2013 Dec;21(12):903-6.
- Yao N, Reichert P, Taremi SS, Prosis WW, Weber PC. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure Fold Des.* 1999. 7:1353–1363
- Ye J, Wang C, Sumpter R Jr, Brown MS, Goldstein JL, Gale M Jr. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 23;100(26):15865-70.
- Yen T, Keeffe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol.* 2003 Jan;36(1):47-53. Review.
- Yi M, Tong X, Skelton A, Chase R, Chen T, Prongay A, Bogen SL, Saksena AK, Njorge FG, Veselnak RL, Pyles RB, Bourne N, Malcolm BA, Lemon SM. Mutations conferring resistance to SCH6, a novel hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor: reduced RNA replication fitness and partial rescue by second-site mutations. *J. Biol. Chem.* 2006. 281, 8205–8215.
- Yoshizawa H, Itoh Y, Iwakiri S, Kitajima K, Tanaka A, Nojiri T, Miyakawa Y, Mayumi M. Demonstration of two different types of non-A, non-B hepatitis by reinjection and cross-challenge studies in chimpanzees. *Gastroenterology.* 1981 Jul;81(1):107-13.
- Yu ML, Chuang WL. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Mar;24(3):336-45. Review.
- Yu X, Qiao M, Atanasov I, Hu Z, Kato T, Liang TJ, Zhou ZH. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology.* 2007 Oct 10;367(1):126-34.
- Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Apr;13(2):223-35. Review.
- Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Baumert TF. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol.* 2011;54(3):566-76.
- Zeuzem S, Sarrarin C., Rouzier, R., Tarral, A., Brion, N., Forestier, N., Gupta, S., Deckman, D., Fellows, K., Hussain, M., Cutler, D., Zhang, J. Anti-viral activity of SCH 503034, a HCV protease inhibitor, administered as monotherapy in HCV-1 patients refractory to pegylated interferon (PEG-IFN- alpha). *Hepatology* 2005a 42 (Suppl. 1), 233A.
- Zeuzem S, Sarrarin C, Wagner F, Rouzier R, Forestier N, Gupta S, Hussain M, Shah A, Cutler D, Zhang J. Combination therapy with HCV protease inhibitor SCH 503034, plus PEG-intron in hepatitis C genotype-1 PEG-intron non-responders: phase 1b results. *Hepatology* 2005b 42 (Suppl. 1), 276A.
- Zeuzem S, Hezode C, Ferenci P, Dusheiko GM, Alves K, Bengtsson L, Gharakhanian S, Kauffman R, Alam J, Pawlotsky J. Telaprevir in combination with peginterferon-alfa- 2a

- with or without ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C: Final results of the PROVE 2 study. *Hepatology* 2008; 48: 418A-419A.
- Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Mauss S, Wedemeyer H, Sarrazin C, Huetter D, Zehnter E, Manns MP. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2009a Feb;16(2):75-90.
- Zeuzem S, Rizzetto M, Ferenci P, Shiffman ML. Management of hepatitis C virus genotype 2 or 3 infection: treatment optimization on the basis of virological response. *Antivir Ther.* 2009b;14(2):143-54. Review.
- Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, Younossi Z, Foster GR, Horban A, Ferenci P, Nevens F, Müllhaupt B, Pockros P, Terg R, Shouval D, van Hoek B, Weiland O, Van Heeswijk R, De Meyer S, Luo D, Boogaerts G, Polo R, Picchio G, Beumont M; REALIZE Study Team. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med.* 2011a Jun 23;364(25):2417-28.
- Zeuzem S, Arora S, Bacon B, Box T, Charlton M, Diago M, Dieterich D, Esteban Mur R, Everson G, Fallón M, Ferenci P, Flisiak R, George J, Ghalib R, Gitlin N, Gladysz A, Gordon S, Greenbloom S, Hassanein T, Jacobson I, Jeffers L, Kowdley K, Lawitz E, Lee S, Leggett B, Lueth S, Nelson D, Pockros P, Rodriguez-Torres M, Rustgi V, Serfaty L, Sherman M, Shiffman M, Sola R, Sulkowski M, Vargas H, Vierling J, Yoffe B, Ishak L, Fontana D, Xu D, Lester J, Gray T, Horga A, Hillson J, Ramos E, Lopez-Talavera JC, Muir A, EMERGE Study Group. Pegylated interferon-lambda (PEG-IFN- λ ,) shows superior viral response with improved safety and tolerability versus PEG-IFN- α -2A in HCV patients (G1/2/3/4): EMERGE Phase IIB through week 12. *J Hepatol.* 2011b;54:S538–S539.
- Zeuzem S, Asselah T, Angus P, Zarski JP, Larrey D, Müllhaupt B, Gane E, Schuchmann M, Lohse A, Pol S, Bronowicki JP, Roberts S, Arasteh K, Zoulim F, Heim M, Stern JO, Kukolj G, Nehmiz G, Haefner C, Boecher WO. Efficacy of the protease inhibitor BI 201335, polymerase inhibitor BI 207127, and ribavirin in patients with chronic HCV infection. *Gastroenterology.* 2011c Dec;141(6):2047-55; quiz e14.
- Zeuzem S, Buggisch P, Agarwal K, Marcellin P, Sereni D, Klinker H, Moreno C, Zarski JP, Horsmans Y, Mo H, Arterburn S, Knox S, Oldach D, McHutchison JG, Manns MP, Foster GR. The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. *Hepatology.* 2012 Mar;55(3):749-58.
- Zhang EZ, Tigges A, Jiang M, Spanks J, Ardzinski A, Alves K, De Souza C, Bartels DJ, Koziel MJ, Di Bisceglie AM, Kieffer TL. Characterization of HCV variants in genotype 1 treatment-naive patients administered the combination of TVR and VX-222 in dual arms of ZENITH study. *J. Hepatol.* 2012. 56:S468 –S469. Abstract:1184.
- Zhang L, Jilg N, Shao RX, Lin W, Fusco DN, Zhao H, Goto K, Peng LF, Chen WC, Chung RT. IL28B inhibits hepatitis C virus replication through the JAK-STAT pathway. *J Hepatol.* 2011 Aug;55(2):289-98.

- Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, Song X, Ding M, Deng H. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol.* 2007 Nov;81(22):12465-71. Epub 2007 Sep 5.
- Zhou Y, Muh U, Hanzelka BL, Bartels DJ, Wei Y, Rao BG, Brennan DL, Tigges AM, Swenson L, Kwong AD, Lin C. Phenotypic and structural analyses of HCV NS3 protease Arg155 variants: sensitivity to telaprevir (VX-950) and interferon alpha. *J. Biol. Chem.* 2007; 282, 22619–22628.
- Zhou Y, Bartels DJ, Hanzelka BL, Muh U, Wei Y, Chu HM, Tigges AM, Brennan DL, Rao BG, Swenson L, Kwong AD, Lin C. Phenotypic characterization of Val36 resistant variants of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52, 110–120.
- Zhu H, Wong-Staal F, Lee H, Syder A, McKelvy J, Schooley RT, Wyles DL. Evaluation of ITX 5061, a scavenger receptor B1 antagonist: resistance selection and activity in combination with other hepatitis C virus antivirals. *J Infect Dis.* 2012. 15;205(4):656-62.
- Zignego AL, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti M, Foschi M, Maggi E, Romagnani S, Gentilini P, Bréchet C. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol.* 1992 Jul;15(3):382-6.
- Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol.* 2003 Jan-Feb;13(1):57-68.

ANEXO I

Protocolo Extracción de ARN viral (Extracción magnética *Nuclisens* miniMag, Biomérieux)

Lisis

1. Centrifugar los tubos con tampón de lisis durante 10 segundos a 1500xg.
2. Abrir los tubos con tampón de lisis y añadir las muestras (10-1000 µl).
3. Cerrar los tubos con tampón de lisis y mezclar.
4. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Unión

1. Centrifugar los tubos con tampón de lisis durante 10 segundos a 1500 xg.
2. Abrir los tubos con tampón de lisis y añadir 20 µl de control interno y 50 µl de sílice.
3. Cerra los tubos y mezclar suavemente.
4. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Lavado

1. Centrifugar los tubos durante 2 minutos a 1500 xg.
2. Abrir los tubos y eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 400 µl de *Wash Buffer1* y transferir todo a cada uno de los tubos de 1,5 mL colocados en miniMag.
4. Lavar durante 30 segundos (Tecla 1 STEP) en miniMAG (cuerpo magnético acostado).
5. Eliminar el sobrenadante (cuerpo magnético levantado).
6. Añadir 400 µl de *Wash Buffer1* (cuerpo magnético acostado) y repetir los pasos 4 y 5.
7. Añadir 500 µl de *Wash Buffer2* (cuerpo magnético acostado) y repetir los pasos 4 y 5.
8. Repetir el paso7.
9. Añadir 500 µl de *Wash Buffer3* (cuerpo magnético acostado).
10. Lavar durante 15 segundos (Tecla 1 STEP) en miniMAG (cuerpo magnético acostado).
11. Eliminar el sobrenadante (cuerpo magnético levantado).

Elución

1. Añadir 50 µl de *Elution Buffer*.
2. Incubar durante 5 minutos a 60°C en termoagitador (velocidad: 1:1400 rpm).
3. Volver a colocar los tubos en el miniMAG (Rack Magnético).
4. Abrir los tubos y transferir el líquido eluido en nuevos tubos (miniMAG, cuerpo magnético levantado).

ANEXO II

Fórmula TBE 1X

- 0.089 mM Tris-HCL
- 0.089 mM ácido bórico
- 0.002 mM EDTA

En H₂O desionizada ajustar a pH= 8,3

ANEXO III

Fórmula Tampón de carga 6x:

- 10mM Tris-HCL (pH 7.6)
- 0.03% azul de bromofenol
- 0.03% xileno cianol FF
- 60% glicerol
- 60mM EDTA

En ml de H₂O desionizada

ANEXO IV

Protocolo Purificación de productos de PCR (NucleoFast 96PCR)

1. Transferir la muestra de PCR (20-300 µl) en los pocillos de la placa nucleofast.
2. Centrifugar 15 minutos a 4.500xg Descartar el eluido.
3. Añadir 100 µl de agua libre de nucleasa y centrifugar 15 minutos a 4.500xg. Descartar el eluido.
4. Repetir el paso 4.
5. Añadir 50 µl de agua libre de nucleasas.
6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Recuperar el eluido pipeteando 5-10 veces y transferir a tubos individuales.

ANEXO V

Protocolo de eliminación de los terminadores de secuenciación Big Dye en placas EDGBIO DTR V3

1. Llevar la muestra a 10 µl con agua destilada antes de añadir a la placa V3.
2. Retirar el adhesivo inferior y después el superior manteniendo la placa horizontal para evitar perder el gel.
3. Colocar la placa V3 sobre una placa de residuos y colocar en la centrífuga.
4. Centrifugar 3 minutos a 850xg. Descartar el eluido.
5. Transferir la muestra de 10-15 µl a la placa con cuidado de no tocar los laterales de la placa. Cubrir.
6. Colocar la placa V3 sobre la placa receptora y colocar en la centrífuga.
7. Centrifugar 5 minutos a 850xg. Conservar el eluido.

ANEXO VI

Medio SOC:

2% w/v Bacto- triptona (20 g) 0,5% w/v Bacto-extracto de levadura (5 g) NaCl 8.56mM NaCl (0,5 g) o 10 mM de NaCl (0,584 g) KCl 2.5mM KCl (0,186 g) MgCl 2MgSO 410 mM MgCl 2 (0.952 g) o 20mM MgSO4 (2,408 g); dd H 2 O[4]dd H 2 O a 1000 ml; 20mM glucosa (3,603 g)

Ajustar a pH 7,0 mediante la adición de concentrado de hidróxido de sodio.

El medio SOC no debe ser esterilizado en autoclave, porque la alta temperatura puede causar que la glucosa reaccione con péptidos tripticos. El medio se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0,22 micras. Por otra parte, el magnesio y glucosa pueden ser esterilizados en autoclave por separado y mezclados después a sus concentraciones finales, aunque el autoclave puede causar la caramelización de la glucosa.

ANEXO VII

Medio de cultivo LB (Luria-Bertani) + ampicilina + X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) + IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)

(por litro)

Extracto de levadura (5g) Bactotriptona (10g) NaCl (10g) Agar 1,6%.

Ajustar a pH 6,1 mediante la adición de NaOH.

Autoclavar, dejar enfriar hasta 42°C y añadir ampicilina (100 µg/ml) X-gal (500 µM) IPTG 40 µg/ml, mezclar y plaquear en placas de petri.

ANEXO VIII***Secuencias de referencia VHC Genotipos/subtipos******Genotipo 1 Número de Acceso***

1a	AF011751
1a	AJ278830
1a	AF387806
1a	M62321
1a	AF511950
1a	HPCHCJ1
1a	AF387808
1a	AF271632
1a	EF407457
1a	HQ850279
1a	M67463
1b	AF165057
1b	AF165051
1b	HPCJTA
1b	HPCJ491
1b	D90208
1b	EU781827
1b	EU781828
1b	AF165047
1b	AF165045
1b	AF165063
1b	M58335
1c	D14853
1c	AY051292
1c	AY651061
1e	KC248194
1g	AM910652
1l	KC248193
1l	KC248196
1l	KC248197
1h	KC248198
1h	KC248199
1*	AJ851228
1*	HQ537007
1*	KC248195

(continuación).

Genotipo 2 **Número de Acceso**

2a	AF238483
2a	AB047644
2a	AF238481
2a	AB047639
2a	AB047642
2a	AB047645
2a	AF238484
2a	HPCPOLP
2a	AB047641
2a	AF169002
2b	AY232737
2b	AY232739
2b	AY232747
2b	AY232731
2b	AF238486
2b	AY232749
2b	AY232733
2b	HPCJ8G
2b	AY232743
2k	AB031663
2l	DQ155561
2c	D50409

Genotipo 3

3a	AF046866
3a	HPCEGS
3a	X76918
3a	DQ437509
3a	HPCK3A
3b	HPCFG
3k	HPCJK049E1

Genotipo 4

4a	DQ418784
4a	DQ418789
4a	DQ418782
4a	DQ988077
4a	DQ988075

(continuación).

Genotipo 4 **Número de Acceso**

4a	DQ418785
4a	DQ418787
4a	DQ418788
4a	DQ418783
4a	DQ988079
4a	DQ988073
4a	DQ988076
4a	Y11604
4a	DQ988074
4a	DQ988078
4f	EF589160
4f	EF589161
4d	DQ516083
4d	DQ418786

Genotipo 5

5a	AF064490
5a	Y13184

Genotipo 6

6a	DQ480515
6a	DQ480523
6a	DQ480519
6a	DQ480520
6a	DQ480517
6a	Y12083
6a	DQ480522
6b	D84262
6c	EF424629
6d	D84263
6e	DQ314805
6f	DQ835764
6g	HPCJK046E2
6g	DQ314806
6h	D84265
6i	DQ835762
6i	DQ835770
6j	DQ835761

(continuación).

Genotipo 6	Número de Acceso
6j	DQ835769
6k	D84264
6k	DQ278893
6k	DQ278891
6l	EF424628
6m	DQ835765
6n	DQ83576
6n	DQ278894
6o	EF424627
6p	EF424626
6q	EF424625
6w	DQ278892
Genotipo 7	
7a	EF108306

ANEXO IX

Alineamiento realizado con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidas de NS3 de los 60 aislados del VHC de los pacientes estudiados con respecto a la secuencia de referencia del aislado Con1 genotipo 1b del VHC.

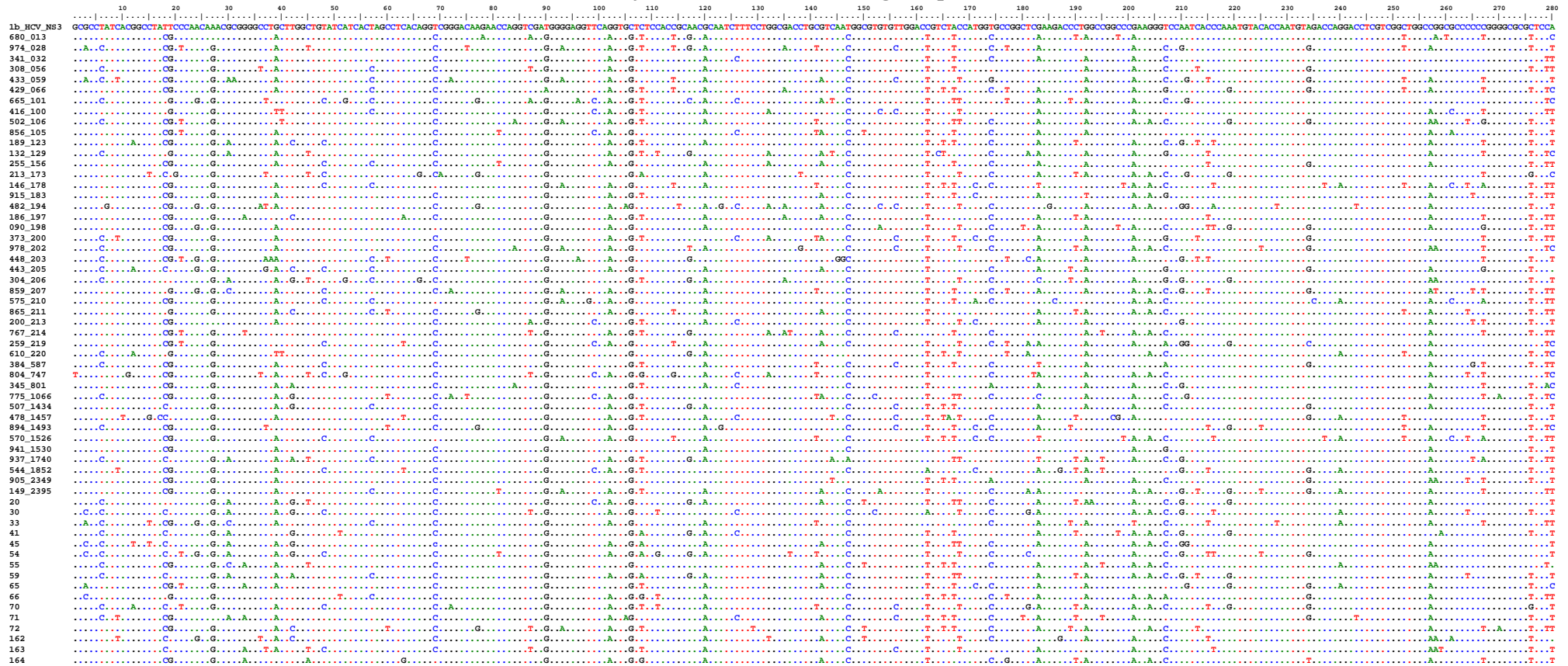
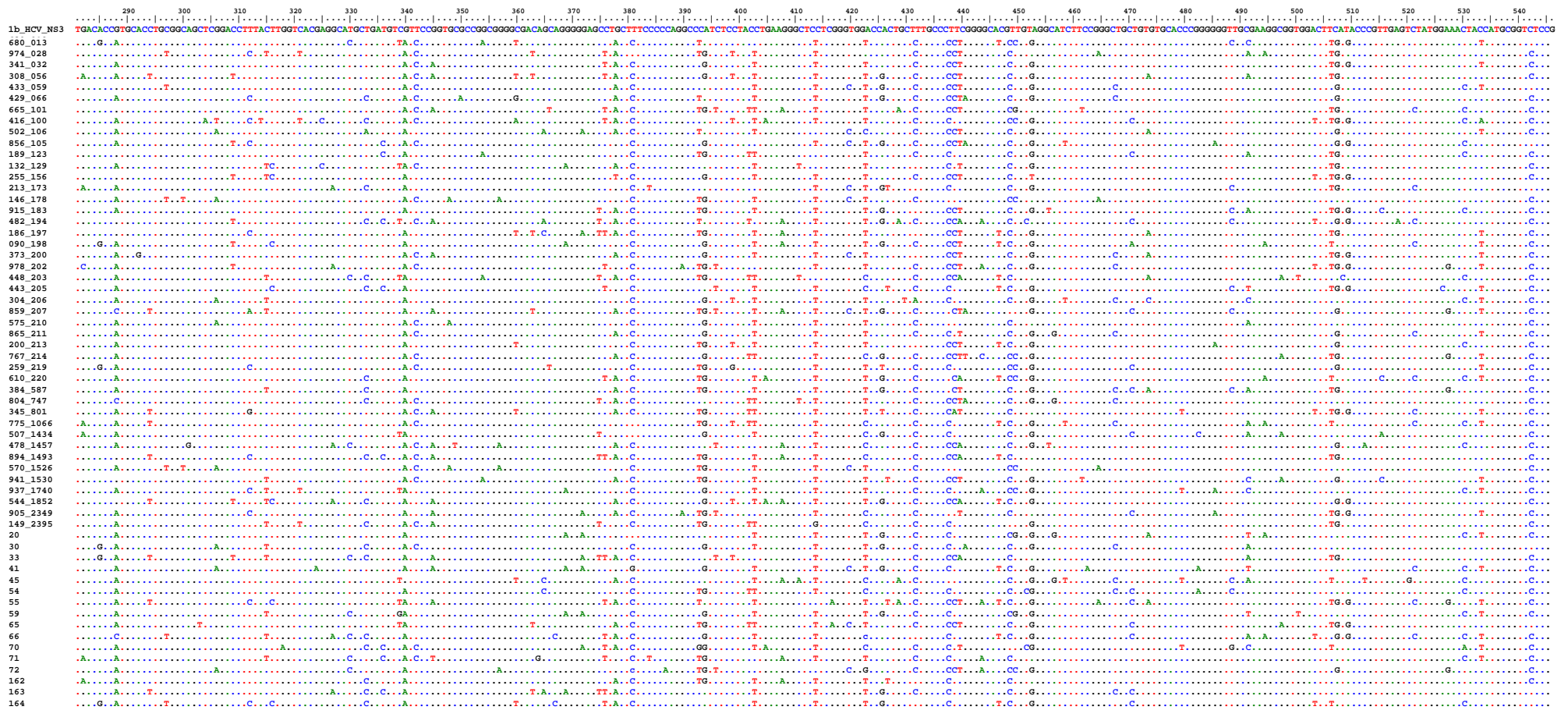


Figura 1. Alineamiento de las 60 secuencias amplificadas de nucleótidos del gen NS3, destacando únicamente nucleótidos que son distintos con respecto al gen NS3 de referencia del aislado Con1 del VHC genotipo 1b.



Continuación Figura 1.

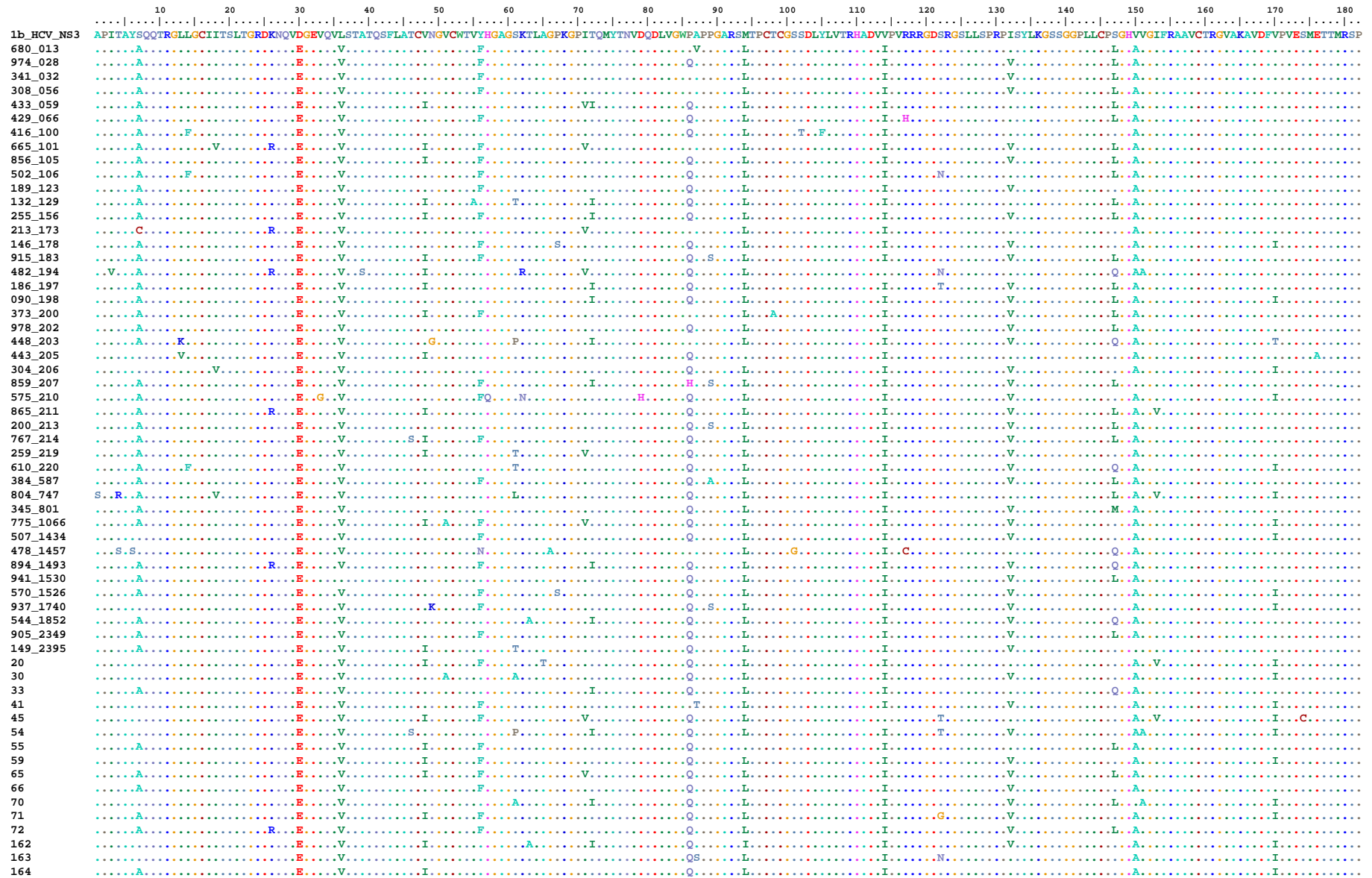


Figura 2. Alineamiento de las 60 secuencias amplificadas, traducidas a aminoácidos del gen NS3. Se resaltan los aminoácidos que son diferentes con respecto al gen NS3 de referencia del aislado Con1 del VHC genotipo 1b.

ANEXO IX

Alineamiento realizado con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidas de NS5B de los 60 aislados del VHC de los pacientes estudiados con respecto a la secuencia de referencia del aislado Con1 genotipo 1b del VHC.

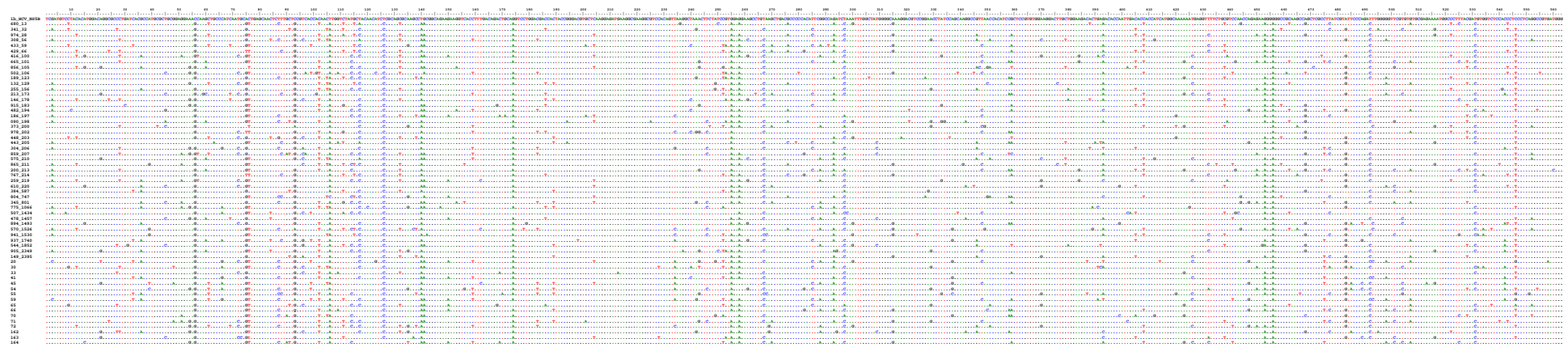


Figura 3. Alineamiento de las 60 secuencias de nucleótidos amplificadas del gen NS5B, destacando únicamente nucleótidos que son distintos con respecto al gen NS5B de referencia del aislado Con1 del VHC genotipo 1b.



Continuación Figura 3.

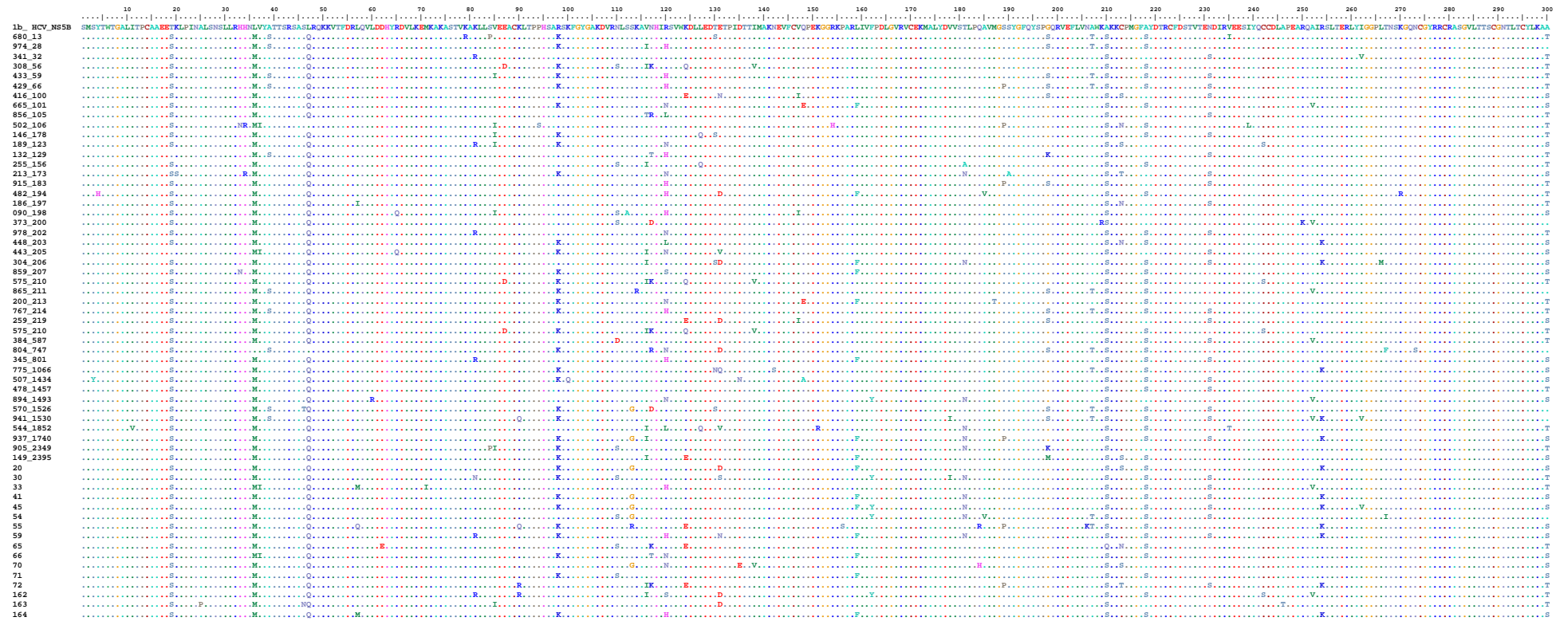
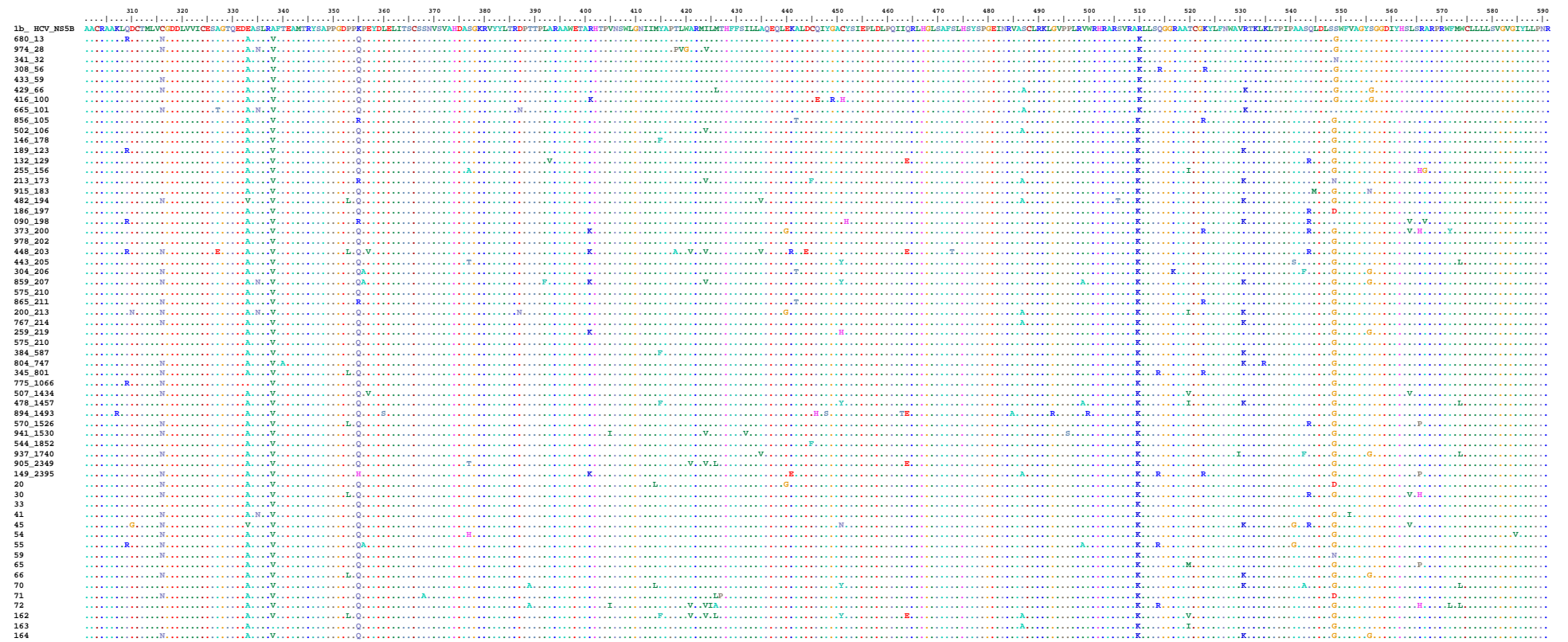


Figura 4. Alineamiento de las 60 secuencias amplificadas, traducidas a aminoácidos del gen NS5B. Se resaltan los aminoácidos que son diferentes con respecto al gen NS5B de referencia del aislado Con1 del VHC genotipo 1b.



Continuación Figura 4.

ANEXO X

NS3 Posiciones aa	Fármaco*	Resistencias / Aislamientos
C16S	GS-9132 ^{NS4A}	NINGÚNA
Q41R/K/P/H	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /DNV ^{III} /SCH567312 ^I	NINGÚNA
F43S/C/Y/V/I/L	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /DNV ^{III} /VPV ^{III} /SCH567312 ^I	NINGÚNA
T54A/S/V/G/C	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /VPV ^{III} /NLV ^{II} /VDV ^{II} /SCH567312 ^I /PHX-1766 [†]	NINGÚNA
Q80K/L/N/R/H/G	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /SMV ^{AP} /ASV ^{III} /DNV ^{III} /VPV ^{III} /SOV ^{II}	NINGÚNA
R109K	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /SCH446211 [†]	NINGÚNA
R123T	TPV ^{AP} /CPV [†]	NINGÚNA
S138T/D/P	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /DNV ^{III}	NINGÚNA
R155K/T/Q/I/M//G/ L/ S/P/N/W	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /SMV ^{AP} /VPV ^{III} /FDV [†] /DNV ^{III} /ABT-450 ^{III} /ASV ^{III} /NLV ^{II} /GS9256 ^{II} /MK5172 ^{II} /BMS-791325 ^{II} /PHX-1766 [†]	NINGÚNA
A156V/T/S/I/F/N/G/D	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /SMV ^{AP} /VPV ^{III} /FDV [†] /DNV ^{III} /ABT-450 ^{III} /ASV ^{III} /NLV ^{II} /GS9256 ^{II} /MK5172 ^{II} /BMS-791325 ^{II} /SCH567312 ^I /PHX-1766 [†]	NINGÚNA
V158I/M	BOC ^{AP}	NINGÚNA
V163L	BOC ^{AP}	NINGÚNA
D168A/V/T/H/E/Q/Y/ N/P/I/G/F/S/K	TPV ^{AP} /BOC ^{AP} /SMV ^{AP} /VPV ^{III} /FDV [†] /DNV ^{III} /ABT-450 ^{III} /ASV ^{III} /NLV ^{II} /GS9256 ^{II} /MK5172 ^{II} /BMS-791325 ^{II} /SOV ^{II} /IDX-320 ^{II}	NINGÚNA
E173G	ASV ^{III}	NINGÚNA
M175L	TPV ^{AP} /BOC ^{AP}	NINGÚNA

Tabla 1. *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a IP. Valor absoluto y porcentaje de posiciones detectadas en el análisis de cambio en la composición aminoacídica de los 60 aislados. Resaltando en rojo las posiciones asociadas a mutaciones de resistencia a algún inhibidor. En observaciones y en negrita se indican variaciones (polimorfismos) que no se sabe si son responsables de alguna resistencia a algún inhibidor.*

* Sitio de unión a NS3: Sitio Activo, Sitio de unión: NS4A

† Fase de estudio detenido.

(I) Fase pre-clínico/Fase 1 de desarrollo clínico.

(II) Fase 2 de desarrollo clínico.

(III) Fase 3 de desarrollo clínico.

(AP) Aprobado.

IP-Macrocíclicos (azul)

IP-Lineares (verde)

ANEXO XII

Análisis de codones en las posiciones asociadas a mutaciones descritas en la bibliografía como causantes de resistencia a IP, IAN e INN del VHC, de los 60 aislados de pacientes analizados.

NS3 1b Con1		Aislados (60)
Posición aa	Codon	Codones
16 •	TGT (C)	TGT (C) : 43/60 TGC (C) : 17/60
36 •	GTC (V)	GTC (V): 26/60 GTT (V): 25/60 GTA (V): 5/60 GTG (V): 3/60 CTC (L): 1/60
39 •	GCA (A)	GCA (A): 44/60 GCG (A): 13/60 GCC (A): 1/60 GCT (A): 1/60 TCA (S): 1/60
41 •	CAA (Q)	CAA (Q): 58/60 CAG (Q): 2/60
43 •	TTC (F)	TTC (F): 59/60 TTT (F): 1/60
54 •	ACC (T)	ACC (T): 4/60 ACA (T): 2/60 ACT (T): 54/60
55 •	GTC (V)	GTC (V): 47/60 GTT (V): 12/60 GCC (A): 1/60
79 •	GAC (D)	GAC (D): 57/60 GAT (D): 2/60 CAC (H): 1/60
80 •	CAG (Q)	CAG (Q): 49/60 CAA (Q): 11/60
87 ••	GCG (A)	GCG (A): 51/60 GCC (A): 4/60 GCA (A): 2/60 TCG (S): 1/60 GTG (V): 1/60 ACG (T): 1/60
105 •	TAC (Y)	TAC (Y): 43/60 TAT (Y): 16/60 TTC (F): 1/60
109 •	AGG (R)	AGG (R): 52/60 AGA (R): 6/60 CGG (R): 2/60
117 ••	CGC (R)	CGC (R): 58/60 CAC (H): 1/60 TGC (C): 1/60
122 •	AGC (S)	AGC (S): 51/60 AGT (S): 2/60 ACC (T): 3/60 AAC (N): 3/60 GGC (G): 1/60
123 •	AGG (R)	AGG (R): 51/60 AGA (R): 7/60 CGG (R): 2/60
138 •	TCC (S)	TCC (S): 6/60 TCG (S): 1/60 TCT (S): 53/60
155 •	CGG (R)	CGG (R): 55/60 CGA (R): 4/60 AGG (R): 1/60
156 •	GCT (A)	GCT (A): 47/60 GCC (A): 13/60
158 •	GTG (V)	GTG (V): 51/60 GTA (V): 8/60 GTC (V): 1/60
163 •	GTT (V)	GTT (V): 50/60 GTC (V): 9/60 GTG (V): 1/60
168 •	GAC (D)	GAC (D): 53/60 GAT (D): 7/60
170 ••	GTA (V)	GTA (V): 22/60 GTG (V): 16/60 ATA (I): 21/60 ACA (T): 1/60
173 •	GAG (E)	GAG (E): 59/60 GAA (E): 1/60
174 •	TCT (S)	TCT (S): 48/60 TCC (S): 11/60 TGT (C): 1/60
175 •	ATG (M)	ATG (M): 60/60
176 •	GAA (E)	GAA (E): 53/60 GAG (E): 6/60 GCA (A): 1/60

- AA Sin mutaciones
- AA Polimorfismos no asociados a resistencias
- AA Mutaciones asociadas a resistencias

Tabla 2. **Análisis de codones en la región NS3 de los 60 aislados del VHC de los pacientes analizados.** Únicamente las sustituciones de nucleótido en las posiciones de codones de interés y su frecuencia. En rojo se resaltan las variaciones que se asocian a mutaciones de resistencia y en verde los polimorfismos con efecto desconocido.

Inhibidor	NS5B 1b Con1		Aislados (60)
	Posición aa	Codon	Codones
IAN	15 •	GCT (A)	GCT (A): 50/60 GCA (A): 1/60 GCC (A): 8/60 GCG (A): 1/60
IAN	72 •	AAG (K)	AAG (K): 60/60
IAN	96 •	TCG (S)	TCG (S): 42/60 TCA (S): 18/60
IAN	142 •	AAT (N)	AAT (N): 46/60 AAC (N): 13/60 AGT (S): 1/60
IAN	159 •	CTT (L)	CTT (L): 36/60 CTC (L): 8/60 TTA (L): 1/60 TTT (F): 8/60 TTC (F): 7/60
IAN	222 •	CGC (R)	CGC (R): 60/60
IAN	223 •	TGT (C)	TGT (C): 45/60 TGC (C): 15/60
IAN	239 •	ATC (I)	ATC (I): 17/60 ATT (I): 42/60 CTT (L): 1/60
IAN	282 •	AGC (S)	AGC (S): 57/60 AGT (S): 3/60
IAN	320 •	CTT (L)	CTT (L): 50/60 CTC (L): 10/60
IAN	321 •	GTC (V)	GTC (V): 60/60
IAN	396 •	GCG (A)	GCG (A): 60/60
IAN	586 •	TAT (Y)	TAC (Y): 60/60

- AA Sin mutaciones
- AA Polimorfismos no asociados a resistencias
- AA Mutaciones asociadas a resistencias

Tabla 3. *Análisis de codones en la región NS5B de los 60 aislados de VHC de los pacientes analizados. Únicamente las sustituciones de nucleótido en las posiciones de codones de interés y su frecuencia. En rojo se resaltan las variaciones que se asocian a mutaciones de resistencia y en verde los polimorfismos con efecto desconocido. IAN (Inhibidores análogos de nucleótidos) INN (Inhibidores no nucleosídicos).*

Inhibidor	NS5B 1b Con1		Aislados (60)
	Posición aa	Codon	Codones
INN	19 •	ACC (T)	ACC (T): 2/60 AGC (S): 55/60 AGT (S): 3/60
INN	50 •	AAG (K)	AAG (K): 49/60 AAA (K): 11/60
INN	55 •	GAC (D)	GAC (D): 60/60
INN	71 •	ATG (M)	ATG (M): 59/60 ATA (I): 1/60
INN	95 •	CAT (H)	CAT (H): 42/60 CAC (H): 18/60
INN	138 •	ATC (I)	ATC (I): 56/60 ATT (I): 1/60 GTC (V): 3/60
INN	300 ••	GCT(A)	GCT(A): 7/60 ACT (T): 25/60 ACC (T): 2/60 ACA (T): 1/60 TCT (S): 22/60 AGT (S): 3/60
INN	314 •	CTC (L)	CTC (L): 56/60 CTT (L): 4/60
INN	316 •	TGC (C)	TGC (C): 27/60 TGT (C): 3/60 AAC (N): 25/60 AAT (N): 5/60
INN	338 •	GCC (A)	GCC (A): 1/60 GTC (V): 59/60
INN	363 •	ATA (I)	ATA (I): 60/60
INN	365 •	TCA (S)	TCA (S): 58/60 TCT (S): 2/60
INN	368 •	TCC (S)	TCC (S): 57/60 TCT (S): 1/60 TCA (S): 1/60 GCC (A) 1/60
INN	389 •	ACC (T)	ACC (T): 57/60 ACT (T): 1/60 GCC (A): 2/60
INN	392 •	CTT (L)	CTT (L): 46/60 CTC (L): 13/60 TTT (F): 1/60
INN	411 •	AAC (N)	AAC (N): 58/60 AAT (N): 2/60
INN	414 •	ATG (M)	ATG (M): 58/60 CTG (L): 2/60
INN	419 •	TTG (L)	TTG (L): 20/60 TTA (L): 30/60 CTA (L): 5/60 CTG (L): 4/60 GTG (V): 1/60
INN	421 •	GCA (A)	GCA (A): 46/60 GCG (A): 10/60 GTA (V): 3/60 GTG (V): 1/60
INN	422 •	AGG (R)	AGG (R): 60/60
INN	423 •	ATG (M)	ATG (M): 60/60
INN	424 •	ATC (I)	ATC (I): 7/60 ATA (I): 2/60 ATT (I): 42/60 GTC (V): 3/60 GTT (V): 6/60
INN	426 •	ATG (M)	ATG (M): 55/60 CTG (L): 2/60 GCG (A): 1/60 TTA (L): 1/60 TTG (L): 1/60
INN	442 •	GCC (A)	GCC (A): 58/60 ACC (T): 2/60
INN	445 •	TGT (C)	TGT (C): 52/60 TGC (C): 6/60 TTC (F): 2/60
INN	447 •	ATC (I)	ATC (I): 59/60 ATT (I): 1/60
INN	448 •	TAC (Y)	TAC (Y): 48/60 TAT (Y): 11/60 TCC (S): 1/60
INN	451 •	TGT (C)	TGT (C): 49/60 CAT (H): 3/60 AAT (N): 1/60 TAT (Y): 4/60 TAC (Y): 1/60 TGC (C): 2/60
INN	452 •	TAC (Y)	TAC (Y): 58/60 TAT (Y): 1/60 CAC (H): 1/60
INN	462 •	ATC (I)	ATC (I): 60/60
INN	465 •	CGA (R)	CGA (R): 57/60 AGA (R): 3/60
INN	482 •	ATC (I)	ATC (I): 60/60
INN	486 •	GCT (A)	GCT (A): 60/60
INN	494 •	GTA (V)	GTA (V): 59/60 GTG (V): 1/60
INN	495 •	CCG (P)	CCG (P): 16/60 CCA (P): 44/60
INN	496 •	CCC (P)	CCC (P): 58/60 CCT (P): 1/60 TCC (S): 1/60
INN	499 •	GTC (V)	GTC (V): 57/60 GCC (A): 3/60
INN	531 •	AGG (R)	AGG (R): 43/60 AGA (R): 1/60 AAG (K): 12/60 AAA (K): 4/60
INN	554 •	GGT (G)	GGT (G): 49/60 GGA (G): 5/60 GGC (G): 5/60 GGG (G): 1/60
INN	555 •	TAC (Y)	TAC (Y): 59/60 TAT (Y): 1/60
INN	556 •	AGC (S)	AGC (S): 51/60 GGC (G): 8/60 AAC (N): 1/60
INN	558 •	GGA (G)	GGA (G): 60/60
INN	559 •	GAC (D)	GAC (D): 60/60
INN	571 •	TGG (W)	TGG (W): 60/60

• AA Sin mutaciones • AA Polimorfismos no asociados a resistencias • AA Mutaciones asociadas a resistencias

Continuación Tabla 3.

ANEXO XIII

Aislamientos	429_66 (IC)		304_206 (IC)		859_207 (IC)		575_210 (IC)		865_211 (IC)		146_178 (ID)		482_194 (ID)		186_197 (ID)		373_200 (ID)		610_220 (ID)		
NS3 Posiciones aa	SANGER	CLONS (n=36)	SANGER	CLONS (n=30)	SANGER	CLONS (n=35)	SANGER	CLONS (n=32)	SANGER	CLONS (n=44)	SANGER	CLONS (n=32)	SANGER	CLONS (n=31)	SANGER	CLONS (n=41)	SANGER	CLONS (n=42)	SANGER	CLONS (n=32)	
C16S	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	
V36A/M/L/G/I/C	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (90,63) L (9,38)	V	V (97,73) L (2,27)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	
A39V	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	S	S (96,77)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	
Q41R/K/P/H	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	
F43S/C/Y/V/I/L	F	F (100)	F	F (100)	F	F (100)	F	F (100)	F	F (100)	F	F (100)	F	F (100)	F	F (100)	F	F (100)	F	F (100)	
T54A/S/V/G/C	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	
V55A/F/I/K/T	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (97,56) A (2,44)	V	V (100)	V	V (100)	
D79E	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (96,88) N (3,13)	
Q80K/L/N/R/H/G	Q	Q (97,23) H (2,77)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	Q	Q (100)	
A87T	A	A (100)	A	A (96,67) V (3,33)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (97,56) T (2,44)	A	A (100)	A	A (100)	
Y105C	Y	Y (100)	Y	Y (93,33) F (6,67)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	
R109K	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (96,88) K (3,13)	
R117H	H	H (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	
S122G/A/R/N/T	S	S (100)	S	S (96,67) G (3,33)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (96,88) N (3,13)	N	N (96,77)	S (3,23)	T (2,44)	S	S (100)	S (97,62) T (2,38)	S	S (100)
R123T	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	
S138T/D/P	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	
R155K/T/I/M/G/L/S/Q/P/N/W	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	
A156S/T/V/I/F/N/G/D	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	
V158I/M	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (96,88) M (3,13)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	
V163L	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	
D168Q/A/Y/V/E/T/N/P/I/H/G/F/S/K	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	
V170A/T/G/L/M	V	V (97,23) I (2,77)	I	I (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (97,73) I (2,27)	I	I (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	
E173G	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	
S174F/P	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	
M175L	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	
E176G	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	E	E (100)	

Tabla 4. *Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a IP del VHC. En rojo se resaltan las frecuencias y las mutaciones de resistencia y en negrita los polimorfismos de función desconocida, encontradas en el análisis de clones moleculares de los 10 aislados de los pacientes analizados. IC: Pacientes Inmunocompetentes; ID: Pacientes Inmunodeprimidos.*

	Aislamientos NSSb Posiciones aa	429_66 (IC)		304_206 (IC)		859_207 (IC)		575_210 (IC)		865_211 (IC)	
		SANGER	CLONS (n=30)	SANGER	CLONS (n=36)	SANGER	CLONS (n=31)	SANGER	CLONS (n=31)	SANGER	CLONS (n=30)
IAN	A15G	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
IAN	K72M	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)
IAN	S96T	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
IAN	N142T	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)
IAN	L159F	L	L (100)	F	F (100)	F	F (100)	L	L (100)	L	L (100)
IAN	R222Q	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
IAN	C223H/Y	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)
IAN	I239V/L	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
IAN	S282T/R	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
IAN	L320I/F	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
IAN	V321I	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
IAN	A396G	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
IAN	Y586C	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
INN	T19S/P	S	S (96,67) R (3,33)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (93,33) N (6,67)
INN	K50R	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)
INN	D55E	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (96,67) Y (3,33)
INN	M71V	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	H95Q/R	H	H (100)	H	H (100)	H	H (100)	H	H (100)	H	H (100)
INN	138I	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	V	V (100)	I	I (100)
INN	A300T	T	T (86,67) A (13,33)	S	S (100)	S	S (100)	T	T (100)	A	A (93,33) V (3,33) T (3,33)
INN	L314F	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (96,77) P (3,23)	L	L (100)
INN	C316Y/F/N/S	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	C	C (100)	N	N (100)
INN	A338V	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	I363V	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	S365T/A/L/F	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
INN	S368A/T	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
INN	T389A/S	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)
INN	L392I	L	L (100)	L	L (100)	F	F (100)	L	L (100)	L	L (100)
INN	N411S	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)
INN	M414L/T/I/V/Q	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	L419M/V/S/I	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
INN	A421V	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
INN	R422K	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
INN	M423T/V/I/A	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)

Tabla 5. Posiciones asociadas a mutaciones de resistencias a IAN e INN del VHC. En rojo se resaltan las frecuencias y las mutaciones de resistencia y en negrita los polimorfismos de función desconocida, encontradas en el análisis de clones moleculares de los 10 aislados de los pacientes analizados. IC: Pacientes Inmunocompetentes. IAN (Inhibidores análogos de nucleótidos) INN (Inhibidores no nucleosídicos).

INN	I424V	I	I (100)	I	I (100)	V	V (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	M426T/V/I	M	M (83,33) L(16,67)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	A442T	A	A (100)	T	T (86,11) A (13,89)	A	A (100)	A	A (80,65) T (19,35)	T	T (96,67) A (3,33)
INN	C445F	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)
INN	I447F	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	Y448H/C	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
INN	C451R	C	C (100)	C	C (100)	Y	Y (100)	C	C (96,77) Y (3,23)	C	C (100)
INN	Y452H	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
INN	I462T	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	R465G	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
INN	I482L/V/T/S	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	A486V/I/T/M	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (87,1) S (12,9)	A	A (100)
INN	V494A/I	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	P495L/A/S/T/Q	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)
INN	P496A/T/S	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)
INN	V499A	V	V (100)	V	V (100)	A	A (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	R531K	K	K (83,33) R (16,67)	R	R (100)	K	K (100)	R	R (64,52) K (35,48)	R	R (96,67) K (3,33)
INN	G554D/S	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)
INN	Y555C	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
INN	S556G/N/C	G	G (86,67) S (13,33)	G	G (97,22) S (2,78)	G	G (100)	S	S (100)	S	S (100)
INN	G558R	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)
INN	D559G/S/N	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)
INN	W571R	W	W (100)	W	W (100)	W	W (100)	W	W (100)	W	W (100)

Continuación Tabla 5. IC: Pacientes Inmunocompetentes.

	Aislamientos	146_178 (ID)		482_194 (ID)		186_197 (ID)		373_200 (ID)		610_220 (ID)	
	N55b Posiciones aa	SANGER	CLONS (n=31)	SANGER	CLONS (n=32)	SANGER	CLONS (n=31)	SANGER	CLONS (n=33)	SANGER	CLONS (n=34)
IAN	A15G	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (97,06) V (2,94)
IAN	K72M	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)
IAN	S96T	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
IAN	N142T	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)
IAN	L159F	L	L (100)	F	F (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
IAN	R222Q	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
IAN	C223H/Y	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)
IAN	I239V/L	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
IAN	S282T/R	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (97,06) R (2,94)
IAN	L320I/F	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
IAN	V321I	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
IAN	A396G	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
IAN	Y586C	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
INN	T19S/P	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
INN	K50R	K	K (100)	K	K (96,88) Q (3,13)	K	K (100)	K	K (100)	K	K (100)
INN	D55E	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)
INN	M71V	M	M (100)	M	M (96,88) V (3,13)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	H95Q/R	H	H (100)	H	H (100)	H	H (100)	H	H (96,97) L (3,03)	H	H (100)
INN	138I	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	A300T	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	A	A (100)	T	T (100)
INN	L314F	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
INN	C316Y/F/N/S	C	C (100)	N	N (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)
INN	A338V	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	I363V	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	S365T/A/L/F	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
INN	S368A/T	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)
INN	T389A/S	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)	T	T (100)
INN	L392I	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
INN	N411S	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)	N	N (100)
INN	M414L/T/I/V/Q	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	L419M/V/S/I	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)	L	L (100)
INN	A421V	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
INN	R422K	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
INN	M423T/V/I/A	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)
INN	I424V	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	M426T/V/I	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)	M	M (100)

Tabla 5. ID: Pacientes Inmunodeprimidos

INN	A442T	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (97,06) T (2,94)
INN	C445F	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)
INN	I447F	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	Y448H/C	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
INN	C451R	C	C (100)	C	C (100)	C	C (100)	C	C (96,97) S (3,03)	H	H (100)
INN	Y452H	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
INN	I462T	I	I (100)	I	I (96,88) T (3,13)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	R465G	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)	R	R (100)
INN	I482L/V/T/S	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)	I	I (100)
INN	A486V/I/T/M	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)	A	A (100)
INN	V494A/I	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	P495L/A/S/T/Q	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)
INN	P496A/T/S	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)	P	P (100)
INN	V499A	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)	V	V (100)
INN	R531K	R	R (100)	K	K (100)	R	R (61,29) K (38,71)	R	R (100)	R	R (100)
INN	G554D/S	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)
INN	Y555C	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)	Y	Y (100)
INN	S556G/N/C	S	S (100)	S	S (100)	S	S (100)	S	S (96,97) G (3,03)	S	S (91,18) G (8,82)
INN	G558R	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)	G	G (100)
INN	D559G/S/N	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)	D	D (100)
INN	W571R	W	W (100)	W	W (100)	W	W (100)	W	W (100)	W	W (100)

Continuación Tabla 5. ID: Pacientes Inmunodeprimidos.

ANEXO XIV

Alineamiento realizado con las secuencias de aminoácidos deducidas de NS3 y de NS5B del VHC de los clones moleculares de los 10 aislados de VHC seleccionados, sólo se muestran las posiciones asociadas a mutaciones descritas en la literatura como causantes de resistencia a IP, IAN e INN del VHC. La primera secuencia corresponde al aislado prototipo Con1 (VHC-1b) y la segunda corresponde a la secuencia directa (Sanger) del aislado seleccionado y las siguientes son las secuencias de clones moleculares correspondiente a ese aislado. Los puntos indican identidad con el prototipo. Los colores empleados en la tabla se corresponden con la naturaleza del aminoácido y de la cadena lateral: rojo para aminoácidos polares con carga positiva; negro para polares con carga negativa; azul para aminoácidos con cadenas laterales polares pero sin carga; verde para los aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas y granate para cisteína, naranja para glicina y gris para prolina. Están ordenados por regiones (NS3 y NS5B) y por pacientes (5 inmunocompetente y 5 inmunodeprimido).

Posición aa NS3 Mutaciones IP	00000000001111111111111111111111	Posición aa NS3 Mutaciones IP	00000000001111111111111111111111
	133344557880012235556677777		133344557880012235556677777
	66913459075972385683803456		66913459075972385683803456
	CVAQFTVDQAYRRRSRAVVDESME		CVAQFTVDQAYRRRSRAVVDESME
1b. Con1.GER		1b. Con1.GER	
429_066_sangerH.....	304_206_sangerI.....
429_066_CL78_A1H.....	304_206_CL13B1I.....
429_066_CL78_A2H.....	304_206_CL13B2I.....
429_066_CL78_A4H.....	304_206_CL13B3I.....
429_066_CL78_A5H.....	304_206_CL13B4I.....
429_066_CL78_A6H.....	304_206_CL13B5I.....
429_066_CL78_A7H.....	304_206_CL13B6F.....I.....
429_066_CL78_A9H.....I.....	304_206_CL13B7I.....
429_066_CL78_A11H.....	304_206_CL13B9I.....
429_066_CL78_A12H.....	304_206_CL13B10G.....I.....
429_066_CL78_B1H.....	304_206_CL13B11I.....
429_066_CL78_B2H.....	304_206_CL13C1I.....
429_066_CL78_B3H.....	304_206_CL13C2I.....
429_066_CL78_B7H.....	304_206_CL13C3I.....
429_066_CL78_B8H.....	304_206_CL13C4VF.....I.....
429_066_CL78_B9H.....	304_206_CL13C5I.....
429_066_CL78_B10H.....	304_206_CL13C6I.....
429_066_CL78_B12H.....	304_206_CL13C7I.....
429_066_CL78_C2H.....	304_206_CL13C8I.....
429_066_CL78_C3H.....	304_206_CL13C9I.....
429_066_CL78_C4H.....	304_206_CL13C10I.....
429_066_CL78_C5H.....H.....	304_206_CL13C12I.....
429_066_CL78_C6H.....	304_206_CL13D1I.....
429_066_CL78_C8H.....	304_206_CL13D2I.....
429_066_CL78_C10H.....	304_206_CL13D3I.....
429_066_CL80_A11H.....	304_206_CL13D5I.....
429_066_CL80_A12H.....	304_206_CL13D6I.....
429_066_CL80_B1H.....	304_206_CL13D8I.....
429_066_CL80_B2H.....	304_206_CL13D9I.....
429_066_CL80_B4H.....	304_206_CL13D11I.....
429_066_CL80_B5H.....	304_206_CL13D12I.....
429_066_CL80_B6H.....		
429_066_CL80_B7H.....		
429_066_CL80_B9H.....		
429_066_CL80_B10H.....		
429_066_CL80_C1H.....		
429_066_CL80_C5H.....		

Posición aa NS3 Mutaciones IP

```

00000000001111111111111111111111
13344557880012235556677777
66913459075972385683803456
CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDVESME
1b. Con1 .GER
859_207_sanger
859_207_CL8B1
859_207_CL11B10
859_207_CL11B12
859_207_CL12D1
859_207_CL12D2
859_207_CL12D3
859_207_CL12D4
859_207_CL12D5
859_207_CL12D6
859_207_CL12D7
859_207_CL12D8
859_207_CL12D9
859_207_CL12D12
859_207_CL12E1
859_207_CL12E2
859_207_CL12E4
859_207_CL12E5
859_207_CL12E6
859_207_CL12E7
859_207_CL12E8
859_207_CL12E9
859_207_CL12E10
859_207_CL12E11
859_207_CL12F1
859_207_CL12F2
859_207_CL12F3
859_207_CL12F4
859_207_CL12F5
859_207_CL12F6
859_207_CL12F7
859_207_CL12F8
859_207_CL12F9
859_207_CL12F10
859_207_CL12F11
859_207_CL12F12
    
```

Posición aa NS3 Mutaciones IP

```

00000000001111111111111111111111
13344557880012235556677777
66913459075972385683803456
CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDVESME
1b. Con1 .GER
575_210_sanger
575_210_CL12A11
575_210_CL12A12
575_210_CL12B1
575_210_CL12B4
575_210_CL12B5
575_210_CL12B6
575_210_CL12B7
575_210_CL12B8
575_210_CL12B10
575_210_CL12B11
575_210_CL12C4
575_210_CL12C7
575_210_CL12C9
575_210_CL71A1
575_210_CL71A4
575_210_CL71A5
575_210_CL71A6
575_210_CL71A9
575_210_CL71A10
575_210_CL71B3
575_210_CL71B5
575_210_CL71B7
575_210_CL71B8
575_210_CL71B9
575_210_CL71B12
575_210_CL76B1
575_210_CL76B2
575_210_CL76B3
575_210_CL76B5
575_210_CL76B6
575_210_CL76B7
575_210_CL76B8
    
```

Posición aa NS3 Mutaciones IP

```

00000000001111111111111111111111
13344557880012235556677777
66913459075972385683803456
CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDVESME
1b. Con1 .GER
865_211_sanger
865_211_CL4A5
865_211_CL4A8
865_211_CL4B5
865_211_CL8B3
865_211_CL8B4
865_211_CL8B6
865_211_CL8B7
865_211_CL8B8
865_211_CL8B11
865_211_CL12G1
865_211_CL12G2
865_211_CL12G3
865_211_CL12G4
865_211_CL12G5
865_211_CL12G6
865_211_CL12G7
865_211_CL12G8
865_211_CL12G9
865_211_CL12G11
865_211_CL12G12
865_211_CL12H1
865_211_CL12H2
865_211_CL12H3
865_211_CL12H4
865_211_CL12H5
865_211_CL12H6
865_211_CL12H7
865_211_CL12H8
865_211_CL12H9
865_211_CL12H10
865_211_CL12H11
865_211_CL12H12
865_211_CL13A1
865_211_CL13A2
865_211_CL13A3
865_211_CL13A4
865_211_CL13A5
865_211_CL13A6
865_211_CL13A7
865_211_CL13A8
865_211_CL13A9
865_211_CL13A10
865_211_CL13A11
865_211_CL13A12
    
```

Posición aa NS3 Mutaciones IP

```

00000000001111111111111111111111
13344557880012235556677777
66913459075972385683803456
CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDVESME
1b. Con1 .GER
146_178_sanger
146_178_CL8A1
146_178_CL8A2
146_178_CL8A3
146_178_CL8A4
146_178_CL8A7
146_178_CL8C1
146_178_CL8C4
146_178_CL15D1
146_178_CL15D5
146_178_CL15D7
146_178_CL15D8
146_178_CL15D9
146_178_CL15D12
146_178_CL15F1
146_178_CL15F6
146_178_CL15G10
146_178_CL15G12
146_178_CL15H4
146_178_CL15H5
146_178_CL15H6
146_178_CL72A6
146_178_CL72A7
146_178_CL72A8
146_178_CL72A9
146_178_CL72A12
146_178_CL72B3
146_178_CL73A2
146_178_CL73A8
146_178_CL73B1
146_178_CL73B3
146_178_CL73B5
146_178_CL73B10
    
```

Posición aa NS3 Mutaciones IP		Posición aa NS3 Mutaciones IP	
	00000000001111111111111111111111		00000000001111111111111111111111
	13344557880012235556677777		13344557880012235556677777
	66913459075972385683803456		66913459075972385683803456
1b. Con1.GER	CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDDVESME	1b. Con1.GER	CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDDVESME
482_194_sanger	..S.....N.....	186_197_sangerT.....
482_194_CL1A1	..S.....N.....	186_197_CL15C10T.....
482_194_CL1A2	..S.....N.....	186_197_CL15C12T.....
482_194_CL1A4	..S.....N.....	186_197_CL17A10T.....
482_194_CL1A5	..S.....N.....	186_197_CL17A12T.....
482_194_CL1A6	..S.....N.....	186_197_CL17A12T.....
482_194_CL1A7	..S.....N.....	186_197_CL1D1T.....
482_194_CL1A8	..S.....N.....	186_197_CL1D2T.....
482_194_CL1A9	..S.....N.....	186_197_CL1D3T.....
482_194_CL1A10	..S.....N.....	186_197_CL1D4T.....
482_194_CL1B1	..S.....N.....	186_197_CL1D5T.....
482_194_CL1B3	..S.....N.....	186_197_CL1D6T.....
482_194_CL1B4	..S.....N.....	186_197_CL1D7T.....
482_194_CL2E1	..S.....N.....	186_197_CL1D8T.....
482_194_CL2E2	..S.....N.....	186_197_CL1D10T.....
482_194_CL2E3	..S.....N.....	186_197_CL1D11T.....
482_194_CL2E4	..S.....N.....	186_197_CL1D12T.....
482_194_CL2E5	..S.....N.....	186_197_CL1E1T.....
482_194_CL2E6	..S.....N.....	186_197_CL1E2A.....
482_194_CL2E7	..S.....N.....	186_197_CL1E3T.....
482_194_CL2E8	..S.....N.....	186_197_CL1E6T.....
482_194_CL2E9	..S.....N.....	186_197_CL1E7T.....
482_194_CL2E10	..S.....N.....	186_197_CL1E8T.....
482_194_CL19E10	..S.....N.....	186_197_CL1E9T.....
482_194_CL19F5	..S.....N.....	186_197_CL1E11T.....
482_194_CL19F6	..S.....N.....	186_197_CL1E12T.....
482_194_CL20A1	..S.....N.....	186_197_CL15A1T.....
482_194_CL20B1	..S.....N.....	186_197_CL15A2T.....
482_194_CL20B2	..S.....N.....	186_197_CL15A4T.....
482_194_CL76_A2	..S.....N.....	186_197_CL15A5T.....
482_194_CL76_A3	..S.....N.....	186_197_CL15B1T.....
482_194_CL76_A4	..S.....N.....	186_197_CL15B2T.....
		186_197_CL15B4T.....
		186_197_CL15B5T.....
		186_197_CL15B6T.....
		186_197_CL15B7T.....
		186_197_CL15B8T.....
		186_197_CL15B9T.....
		186_197_CL15B11T.....
		186_197_CL15C3T.....
		186_197_CL15C4T.....
		186_197_CL15C5T.....
		186_197_CL15C9T.....

Posición aa NS3 Mutaciones IP

00000000001111111111111111111111
 13344557880012235556677777
 66913459075972385683803456
CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDDVESME

1b. Con1.GER
 373_200_sanger
 373_200_CL1G1
 373_200_CL1G2
 373_200_CL1G3
 373_200_CL1G4
 373_200_CL1G5
 373_200_CL1G6
 373_200_CL1G7
 373_200_CL1G8
 373_200_CL1G9
 373_200_CL1G10
 373_200_CL1G11
 373_200_CL1G12
 373_200_CL19B2
 373_200_CL19B5
 373_200_CL19C2
 373_200_CL19C3
 373_200_CL19C4
 373_200_CL19C5
 373_200_CL19C8
 373_200_CL19C9
 373_200_CL19C11
 373_200_CL19D7
 373_200_CL19D9
 373_200_CL19D10
 373_200_CL19D11
 373_200_CL19E6
 373_200_CL19E7
 373_200_CL20B7
 373_200_CL20B8
 373_200_CL20B9
 373_200_CL71C1
 373_200_CL71C2
 373_200_CL71C3
 373_200_CL71C4
 373_200_CL71C5
 373_200_CL71C7
 373_200_CL71C8
 373_200_CL71C11
 373_200_CL71C12
 373_200_CL71D1
 373_200_CL71D2
 373_200_CL71D3

Posición aa NS3 Mutaciones IP

00000000001111111111111111111111
 13344557880012235556677777
 66913459075972385683803456
CVAQFTVDQAYRRSRRAVVDDVESME

1b. Con1.GER
 610_220_sanger
 610_220_CL2B1
 610_220_CL2B2
 610_220_CL2B3
 610_220_CL2B4
 610_220_CL2B5
 610_220_CL2B6
 610_220_CL2B7
 610_220_CL2B8
 610_220_CL2B9
 610_220_CL2B10
 610_220_CL2B11
 610_220_CL2B12
 610_220_CL17B4
 610_220_CL19F8
 610_220_CL19F9
 610_220_CL19F11
 610_220_CL19FG6
 610_220_CL19G7
 610_220_CL19G8
 610_220_CL19G9
 610_220_CL19G11
 610_220_CL19H3
 610_220_CL19H8
 610_220_CL19H11
 610_220_CL20C4
 610_220_CL20D3
 610_220_CL20D4
 610_220_CL76D3
 610_220_CL77_2
 610_220_CL77_4
 610_220_CL77_5
 610_220_CL77_6

Posición aa NS5B Mutaciones IAN-INN

	00000000112222333333333334444444444444444444444455555555
	115577993452238011223666899111222224444555668899993555578
	5905125682923920460183589261491234625781252526456914568916
1b. Con1. GER	ATKDMKHSINLRCSALCLVAISSSTLANMLARMIMACIYCYIRIAVPPVRAGYSGDWY
429_66_sanger	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL30pppA8	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL30ppC4	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL30ppE4	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL32C1	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL32B12	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL32E9	.S.....N..V.....L.....G....
429_66_CL32E12	.S.....N..V.....K...G....
429_66_CL33B3	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL33C8	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL33G7	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL33G11	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL34G6	.S.....N..V.....K...G....
429_66_CL34H9	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41A11	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41B2	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41B5	.S.....T.N..V.....G....
429_66_CL41C6	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41C7	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41C8	.S.....N..V.....L.....G....
429_66_CL41C10	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41E1	.S.....T.N..V.....L.....K...G....
429_66_CL41E6	.R.....T.N..V.....L.....G....
429_66_CL41E8	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41F4	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41F5	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41F7	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41G11	.S.....T.N..V.....G....
429_66_CL41H2	.S.....T.N..V.....L.....K...G....
429_66_CL41H5	.S.....T.N..V.....K...G....
429_66_CL41H6	.S.....T.N..V.....K...G....

Posición aa NS5B Mutaciones IAN-INN

	00000000112222333333333334444444444444444444444455555555
	115577993452238011223666899111222224444555668899993555578
	5905125682923920460183589261491234625781252526456914568916
1b. Con1. GER	ATKDMKHSINLRCSALCLVAISSSTLANMLARMIMACIYCYIRIAVPPVRAGYSGDWY
304_206_sanger	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74A7	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74A8	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74B	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74C3	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74C6	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74C7	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74C9	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74C11	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D1	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D2	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D3	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D4	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D5	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D6	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D7	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D8	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D9	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL74D10	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G2	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G3	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G4	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G6	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G7	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G8	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G9	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G10	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G11	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75G12	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75H1	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75H2	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75H3	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75H4	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75H6	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75H7	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75H9	.S.....F...S.N..V.....T.....G....
304_206_CL75H10	.S.....F...S.N..V.....T.....G....

ANEXO XV

Tabla 6. *Análisis de codones de la proteasa NS3 en clones moleculares de 10 pacientes seleccionados. Sustituciones de nucleótido en las posiciones de codones de interés y frecuencia. En rojo variaciones respecto al aislado Con1 que se asocian a mutaciones de resistencia a IP y en verde polimorfismos de función desconocida. IC: Pacientes Inmunocompetentes.*

Posición aa	Codon	429_66 (IC)	304_206 (IC)	859_207 (IC)	575_210 (IC)	865_211 (IC)
16 •	TGT (C)	TGT (C): 36/36	TGT (C): 30/30	TGC (C): 35/35	TGT (C): 32/32	TGT (C): 44/44
36 •	GTC (V)	GTT (V): 36/36	GTT (V): 30/30	GTC (V) :35/35	GTC (V): 24/32 GTT (V): 5/32 CTC (L): 3/32	GTC (V): 43/44 CTC (L): 1/44
39 •	GCA (A)	GCA (A): 36/36	GCG (A): 30/30	GCA (A): 33/35 GCG (A): 2/35	GCA (A): 30/32 GCG (A): 30/32	GCA (A): 44/44
41 •	CAA (Q)	CAA (Q): 36/36	CAA (Q): 30/30	CAA (Q): 35/35	CAA (Q): 32/32	CAA (Q): 44/44
43 •	TTC (F)	TTC (F): 36/36	TTC (F): 30/30	TTC (F): 35/35	TTC (F): 32/32	TTC (F): 44/44
54 •	ACC (T)	ACT (T): 36/36	ACT (T): 30/30	ACT (T): 35/35	ACC (T): 3/32 ACT (T): 29/32	ACC (T): 5/44 ACT (T): 39/44
55 •	GTC (V)	GTT (V): 36/36	GTC (V): 29/30 GTT (V): 1/30	GTC (V): 35/35	GTC (V): 32/32	GTC (V): 44/44
79 •	GAC (D)	GAC (D): 36/36	GAC (D): 30/30	GAC (D): 35/35	GAC (D): 32/32	GAC (D): 44/44
80 •	CAG (Q)	CAG (Q): 35/36 CAC (H): 1/36	CAG (Q): 28/30 CAA (Q): 2/30	CAG (Q): 35/35	CAG (Q): 32/32	CAG (Q): 44/44
87 ••	GCG (A)	GCG (A): 36/36	GCG (A): 29/30 GTG (V): 1/30	GCG (A): 35/35	GCG (A): 32/32	GCC (A): 1/44 GCG (A): 43/44
105 •	TAC (Y)	TAC (Y): 36/36	TAC (Y): 1/30 TAT (Y): 27/30 TTT (F): 2/30	TAT (Y): 35/35	TAC (Y): 32/32	TAC (Y): 44/44
109 •	AGG (R)	AGG (R): 36/36	AGG (R): 30/30	AGG (R): 34/35 AGA (R): 1/35	AGG (R): 32/32	AGG (R): 44/44
117 •	CGC (R)	CAC (H): 36/36	CGC (R): 30/30	CGC (R): 35/35	CGC (R): 32/32	CGC (R): 44/44
122 •	AGC (S)	AGC (S): 36/36	AGC (S): 29/30 GGC (G): 1/30	AGC (S): 35/35	AGC (S): 32/32	AGC (S): 44/44
123 •	AGG (R)	AGG (R): 22/36 CGG (R): 14/36	AGG (R): 30/30	AGG (R): 34/35 CGG (R): 1/35	AGG (R): 32/32	AGG (R): 44/44
138 •	TCC (S)	TCT (S): 36/36	TCT (S): 30/30	TCT (S): 35/35	TCC (S): 3/32 TCT (S): 29/32	TCT (S): 44/44
155 •	CGG (R)	CGG (R): 36/36	CGG (R): 29/30 CGA (R): 1/30	CGG (R): 35/35	CGG (R): 32/32	CGG (R): 44/44
156 •	GCT (A)	GCT (A): 36/36	GCT (A): 1/30 GCC (A): 29/30	GCT (A): 34/35 GCC (A): 1/35	GCT (A): 32/32	GCC (A): 44/44
158 •	GTG (V)	GTG (V): 36/36	GTG (V): 30/30	GTG (V): 35/35	GTG (V): 10/32 GTA (V): 22/32	GTG (V): 44/44
163 •	GTT (V)	GTT (V): 36/36	GTT (V): 30/30	GTT (V): 13/35 GTC (V): 22/35	GTT (V): 31/32 GTA (V): 1/32	GTT (V): 44/44
168 •	GAC (D)	GAT (D): 34/36 GAC (D): 2/36	GAC (D): 30/30	GAC (D): 35/35	GAC (D): 32/32	GAC (D): 44/44
170 •	GTA (V)	GTA (V): 35/36 ATA (I): 1/36	ATA (I): 30/30	GTA (V): 35/35	GTA (V): 32/32	GTA (V): 43/44 ATA (I): 1/44
173 •	GAG (E)	GAG (E): 36/36	GAG (E): 30/30	GAG (E): 35/35	GAG (E): 32/32	GAG (E): 44/44
174 •	TCT (S)	TCC (S): 34/36 TCT (S): 2/36	TCT (S): 30/30	TCT (S): 35/35	TCT (S): 32/32	TCT (S): 41/44 TCC (S): 3/44
175 •	ATG (M)	ATG (M): 36/36	ATG (M): 30/30	ATG (M): 35/35	ATG (M): 32/32	ATG (M): 44/44
176 •	GAA (E)	GAG (E): 34/36 GAA (E): 2/36	GAA (E): 30/30	GAA (E): 1/35 GAG (E): 34/35	GAA (E): 32/32	GAA (E): 44/44

Posición aa	Codon	146_178 (ID)	482_194 (ID)	186_197 (ID)	373_200 (ID)	610_220 (ID)
16 •	TGT (C)	TGC (C): 32/32	TGT (C): 30/31 TGC (C): 1/31	TGT (C): 41/41	TGT (C): 41/42 TGC (C): 1/42	TGT (C): 32/32
36 •	GTC (V)	GTC (V):32/32	GTC (V) :31/31	GTC (V): 1/41 GTT (V): 40/41	GTT (V): 42/42	GTC (V) :30/32 GTT (V): 2/32
39 •	GCA (A)	GCA (A): 32/32	GCA (A): 1/31 TCA (S): 30/31	GCA (A): 41/41	GCA (A): 42/42	GCA (A): 5/32 GCG (A): 27/32
41 •	CAA (Q)	CAA (Q): 32/32	CAA (Q): 2/31 CAG (Q): 29/31	CAA (Q): 40/41 CAG (Q): 1/41	CAA (Q): 39/42 CAG (Q): 3/42	CAA (Q): 32/32
43 •	TTC (F)	TTC (F): 32/32	TTC (F): 31/31	TTC (F): 41/41	TTC (F): 42/42	TTC (F): 32/32
54 •	ACC (T)	ACT (T): 32/32	ACT (T): 31/31	ACT (T): 41/41	ACC (T): 1/42 ACT (T): 41/42	ACT (T): 31/32 ACG (T): 1/32
55 •	GTC (V)	GTC (V): 1/32 GTT (V): 31/32	GTC (V): 31/31	GTC (V): 40/41 GCC (A): 1/41	GTC (V): 42/42	GTC (V): 3/32 GTT (V): 29/32
79 •	GAC (D)	GAT (D): 32/32	GAC (D): 31/31	GAC (D): 41/41	GAC (D): 42/42	GAC (D): 31/32 AAC (N): 1/32
80 •	CAG (Q)	CAA (Q): 32/32	CAG (Q): 31/31	CAG (Q): 41/41	CAG (Q): 42/42	CAA (Q): 32/32
87 ••	GCG (A)	GCC (A) : 32/32	GCG (A): 31/31	GCG (A): 39/41 GCA (A): 1/41 ACG (T): 1/41	GCG (A): 42/42	GCG (A): 29/32 GCA (A): 3/32
105 •	TAC (Y)	TAC (Y): 32/32	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 41/41	TAC (Y): 39/42 TAT (Y): 3/42	TAC (Y): 27/32 TAT (Y): 5/32
109 •	AGG (R)	AGG (R): 32/32	AGG (R): 31/31	AGG (R): 41/41	AGG (R): 42/42	AGG (R): 31/32 AAG (K): 1/32
117 •	CGC (R)	CGC (R): 32/32	CGC (R): 31/31	CGC (R): 40/41 CGT (R): 1/41	CGC (R): 42/42	CGC (R): 32/32
122 •	AGC (S)	AGC (S): 31/32 AAC (N): 1/32	AGC (S): 1/31 AAC (N): 30/31	ACC (T): 41/41	AGC (S): 41/42 ACC (T): 1/42	AGC (S): 32/32
123 •	AGG (R)	AGG (R) : 32/32	AGG (R) : 31/31	AGG (R): 41/41	AGG (R): 42/42	AGG (R): 30/32 AGA (R): 2/32
138 •	TCC (S)	TCT (S): 32/32	TCT (S): 31/31	TCC (S): 1/41 TCT (S): 40/41	TCC (S): 1/42 TCT (S): 41/42	TCT (S): 32/32
155 •	CGG (R)	CGA (R) : 32/32	CGG (R): 31/31	CGG (R): 41/41	CGG (R): 42/42	CGG (R): 32/32
156 •	GCT (A)	GCT (A) : 32/32	GCT (A): 30/31 GCC (A): 1/31	GCT (A): 41/41	GCT (A): 7/42 GCC (A): 35/42	GCT (A): 32/32
158 •	GTG (V)	GTG (V): 30/32 GTA (V): 1/32 ATG (M): 1/32	GTG (V): 31/31	GTG (V): 1/41 GTA (V): 40/41	GTG (V): 2/42 GTA (V): 40/42	GTG (V): 32/32
163 •	GTT (V)	GTT (V): 32/32	GTC (V): 31/31	GTT (V): 41/41	GTT (V): 41/42 GTC (V): 1/42	GTT (V): 32/32
168 •	GAC (D)	GAC (D): 32/32	GAT (D): 31/31	GAC (D): 41/41	GAC (D): 41/42 GAT (D): 1/42	GAC (D): 32/32
170 •	GTA (V)	ATA (I): 32/32	GTG (V): 31/31	GTA (V): 40/41 GTG (V): 1/41	GTA (V): 1/42 GTG (V): 41/42	GTA (V): 9/32 ATA (I): 23/32
173 •	GAG (E)	GAG (E): 32/32	GAA (E): 31/31	GAG (E): 41/41	GAG (E): 42/42	GAG (E): 32/32
174 •	TCT (S)	TCT (S): 32/32	TCC (S): 31/31	TCT (S): 41/41	TCT (S): 42/42	TCC (S): 32/32
175 •	ATG (M)	ATG (M): 32/32	ATG (M): 31/31	ATG (M): 41/41	ATG (M): 42/42	ATG (M): 32/32
176 •	GAA (E)	GAA (E) : 32/32	GAA (E): 31/31	GAA (E): 41/41	GAA (E): 42/42	GAA (E): 31/32 GAG (E): 1/32

Continuación Tabla 6. ID: Pacientes Inmunodeprimidos.

Tabla 7. *Análisis de codones de NS5B en clones moleculares de los 10 pacientes seleccionados. Únicamente sustituciones de nucleótido en codones de interés y su frecuencia. En rojo variaciones respecto al aislado Con1 asociadas con resistencia a IAN e INN, y en verde polimorfismos de función desconocida. IC: Pacientes Inmunocompetentes.*

Inhibidor	Posición aa	Codon	429_66 (IC)	304_206 (IC)	859_207 (IC)	575_210 (IC)	865_211 (IC)
IAN	15 •	GCT (A)	GCT (A): 30/30	GCT (A): 36/36	GCT (A): 31/31	GCT (A): 31/31	GCT (A): 30/30
IAN	72 •	AAG (K)	AAG (K): 30/30	AAG (K): 36/36	AAG (K): 31/31	AAG (K): 31/31	AAG (K): 30/30
IAN	96 •	TCG (S)	TCG (S): 12/30 TCA (S): 18/30	TCG (S): 36/36	TCG (S): 31/31	TCG (S): 20/31 TCA (S): 10/31 TCT (S): 1/31	TCG (S): 30/30
IAN	142 •	AAT (N)	AAT (N): 30/30	AAT (N): 36/36	AAT (N): 31/31	AAT (N): 18/31 AAC (N): 13/31	AAT (N): 30/30
IAN	159 •	CTT (L)	CTT (L): 30/30	TTC (F): 36/36	TTC (F): 31/31	CTT (L): 29/31 CTC (L): 2/31	CTT (L): 27/30 CTC (L): 3/30
IAN	222 •	CGC (R)	CGC (R): 30/30	CGC (R): 36/36	CGC (R): 31/31	CGC (R): 31/31	CGC (R): 30/30
IAN	223 •	TGT (C)	TGT (C): 4/30 TGC (C): 26/30	TGC (C): 36/36	TGT (C): 31/31	TGT (C): 30/31 TGC (C): 1/31	TGT (C): 30/30
IAN	239 •	ATC (I)	ATC (I): 22/30 ATT (I): 8/30	ATT (I): 36/36	ATT (I): 31/31	ATT (I): 31/31	ATT (I): 30/30
IAN	282 •	AGC (S)	AGC (S): 30/30	AGC (S): 36/36	AGC (S): 31/31	AGC (S): 31/31	AGC (S): 30/30
IAN	320 •	CTT (L)	CTC (L): 30/30	CTT (L): 36/36	CTT (L): 31/31	CTT (L): 28/31 CTC (L): 3/31	CTT (L): 29/30 CTC (L): 1/30
IAN	321 •	GTC (V)	GTC (V): 30/30	GTC (V): 36/36	GTC (V): 31/31	GTC (V): 31/31	GTC (V): 30/30
IAN	396 •	GCG (A)	GCG (A): 30/30	GCG (A): 36/36	GCG (A): 31/31	GCG (A): 31/31	GCG (A): 30/30
IAN	586 •	TAT (Y)	TAC (Y): 30/30	TAC (Y): 36/36	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 30/30
INN	19 ••	ACC (T)	AGC (S): 29/30 AGA (R): 1/30	AGC (S): 36/36	AGT (S): 31/31	AGC (S): 31/31	AGC (S): 28/30 AAC (N): 2/30
INN	50 •	AAG (K)	AAG (K): 30/30	AAG (K): 36/36	AAG (K): 31/31	AAG (K): 31/31	AAG (K): 30/30
INN	55 •	GAC (D)	GAC (D): 30/30	GAC (D): 24/36 GAT (D): 12/36	GAC (D): 31/31	GAC (D): 31/31	GAC (D): 29/30 TAC (Y): 1/30
INN	71 •	ATG (M)	ATG (M): 30/30	ATG (M): 36/36	ATG (M): 31/31	ATG (M): 31/31	ATG (M): 30/30
INN	95 •	CAT (H)	CAT (H): 24/30 CAC (H): 6/30	CAC (H): 36/36	CAT (H): 31/31	CAT (H): 31/31	CAT (H): 30/30
INN	138 •	ATC (I)	ATC (I): 30/30	ATC (I): 36/36	ATC (I): 31/31	GTC (V): 31/31	ATC (I): 30/30
INN	300 ••	GCT(A)	GCT(A): 4/30 ACT (T): 26/30	TCT (S): 36/36	TCT (S): 31/31	ACT (T): 22/31 ACA (T): 9/31	GCT (A): 28/30 GTT (V): 1/30 ACT (T): 1/30
INN	314 •	CTC (L)	CTC (L): 30/30	CTC (L): 36/36	CTC (L): 31/31	CTC (L): 1/31 CTT (L): 29/31 CCT (P): 1/31	CTC (L): 30/30
INN	316 •	TGC (C)	AAC (N): 29/30 AAT (N): 1/30	AAC (N): 36/36	AAC (N): 31/31	TGC (C): 31/31	AAT (N): 22/30 AAC (N): 8/30
INN	338 •	GCC (A)	GTC (V): 30/30	GTC (V): 36/36	GTC (V): 31/31	GTC (V): 31/31	GTC (V): 30/30
INN	363 •	ATA (I)	ATA (I): 30/30	ATA (I): 36/36	ATA (I): 31/31	ATA (I): 31/31	ATA (I): 30/30
INN	365 •	TCA (S)	TCA (S): 30/30	TCA (S): 36/36	TCA (S): 31/31	TCA (S): 31/31	TCA (S): 30/30
INN	368 •	TCC (S)	TCC (S): 4/30 TCA (S): 26/30	TCC (S): 36/36	TCC (S): 31/31	TCC (S): 18/31 TCT (S): 13/31	TCC (S): 28/30 TCA (S): 2/30

INN	389 •	ACC (T)	ACC (T): 30/30	ACC (T): 36/36	ACC (T): 31/31	ACC (T): 30/31ACT (T): 1/31	ACC (T): 30/30
INN	392 •	CTT (L)	CTT (L): 30/30	CTC (L): 36/36	TTT (F): 31/31	CTT (L): 10/31 CTC (L): 18/31 CTA (L): 3/31	CTT (L): 30/30
INN	411 •	AAC (N)	AAC (N): 30/30	AAC (N): 36/36	AAC (N): 31/31	AAC (N): 31/31	AAC (N): 30/30
INN	414 •	ATG (M)	ATG (M): 30/30	ATG (M): 36/36	ATG (M): 31/31	ATG (M): 31/31	ATG (M): 30/30
INN	419 •	TTG (L)	TTG (L): 4/30 CTA (L): 7/30 TTA (L): 19/30	TTG (L): 36/36	TTA (L): 31/31	TTG (L): 6/31 TTA (L): 25/31	TTA (L): 30/30
INN	421 •	GCA (A)	GCA (A): 30/30	GCA (A): 36/36	GCA (A): 31/31	GCA (A): 31/31	GCA (A): 30/30
INN	422 •	AGG (R)	AGG (R): 30/30	AGG (R): 36/36	AGG (R): 31/31	AGG (R): 31/31	AGG (R): 30/30
INN	423 •	ATG (M)	ATG (M): 30/30	ATG (M): 36/36	ATG (M): 31/31	ATG (M): 31/31	ATG (M): 30/30
INN	424 •	ATC (I)	ATT (I): 30/30	ATT (I): 36/36	GTT (V): 31/31	ATC (I): 6/31ATT (I): 25/31	ATT (I): 30/30
INN	426 •	ATG (M)	ATG (M): 25/30 TTA (L): 5/30	ATG (M): 36/36	ATG (M): 31/31	ATG (M): 31/31	ATG (M): 30/30
INN	442 •	GCC (A)	GCC (A): 30/30	GCC (A): 5/36 ACC (T): 31/36	GCC (A): 31/31	GCC (A): 25/31 ACC (T): 6/31	GCC (A): 1/30 ACC (T): 29/30
INN	445 •	TGT (C)	TGT (C): 30/30	TGT (C): 27/36 TGC (C): 9/36	TGT (C): 31/31	TGT (C): 31/31	TGT (C): 29/30 TGC (C): 1/30
INN	447 •	ATC (I)	ATC (I): 30/30	ATC (I): 36/36	ATC (I): 31/31	ATC (I): 31/31	ATC (I): 30/30
INN	448 •	TAC (Y)	TAC (Y): 30/30	TAC (Y): 36/36	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 30/30
INN	451 •	TGT (C)	TGT (C): 30/30	TGT (C): 36/36	TAT (Y): 31/31	TGT (C): 30/31 TAT (Y): 1/31	TGT (C): 30/30
INN	452 •	TAC (Y)	TAC (Y): 30/30	TAC (Y): 36/36	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 30/30
INN	462 •	ATC (I)	ATC (I): 30/30	ATC (I): 36/36	ATC (I): 31/31	ATC (I): 31/31	ATC (I): 30/30
INN	465 •	CGA (R)	CGA (R) : 30/30	CGA (R): 36/36	CGA (R): 31/31	CGA (R): 21/31 AGA (R): 10/31	CGA (R) : 30/30
INN	482 •	ATC (I)	ATC (I): 30/30	ATC (I): 36/36	ATC (I): 31/31	ATC (I): 31/31	ATC (I): 30/30
INN	486 •	GCT (A)	GCT (A): 30/30	GCT (A): 36/36	GCT (A): 31/31	GCT (A): 27/31 TCT (S): 4/31	GCT (A): 30/30
INN	494 •	GTA (V)	GTA (V): 25/30 GTG (V): 5/30	GTA (V): 36/36	GTA (V): 31/31	GTA (V): 31/31	GTA (V): 30/30
INN	495 •	CCG (P)	CCG (P): 4/30 CCA (P): 26/30	CCA (P): 36/36	CCG (P): 31/31	CCG (P): 4/31 CCA (P): 27/31	CCA (P): 30/30
INN	496 •	CCC (P)	CCC (P): 30/30	CCC (P): 36/36	CCC (P): 31/31	CCC (P): 31/31	CCC (P): 30/30
INN	499 •	GTC (V)	GTC (V): 30/30	GTC (V): 36/36	GCC (A): 31/31	GTC (V): 31/31	GTC (V): 30/30
INN	531 •	AGG (R)	AGG (R): 5/30 AAA (K):25/30	AGG (R): 36/36	AAG (K): 31/31	AGG (R): 20/31 AAG (K): 11/31	AGG (R) : 29/30 AAG (K): 1/30
INN	554 •	GGT (G)	GGT (G): 30/30	GGT (G): 24/36 GGC (G): 12/36	GGT (G): 31/31	GGT (G): 13/31 GGC (G): 28/31	GGT (G): 30/30
INN	555 •	TAC (Y)	TAC (Y): 20/30 TAT (Y): 10/30	TAC (Y): 36/36	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 30/30
INN	556 •	AGC (S)	AGC (S): 4/30 GGC (G): 26/30	AGC (S): 1/36 GGC (G): 35/36	GGC (G): 31/31	AGC (S): 31/31	AGC (S): 30/30
INN	558 •	GGA (G)	GGA (G): 30/30	GGA (G): 36/36	GGA (G): 31/31	GGA (G): 31/31	GGA (G): 30/30
INN	559 •	GAC (D)	GAC (D): 30/30	GAC (D): 36/36	GAC (D): 31/31	GAC (D): 31/31	GAC (D): 29/30 GAT (D): 1/30
INN	571 •	TGG (W)	TGG (W): 30/30	TGG (W): 36/36	TGG (W): 31/31	TGG (W): 31/31	TGG (W): 30/30

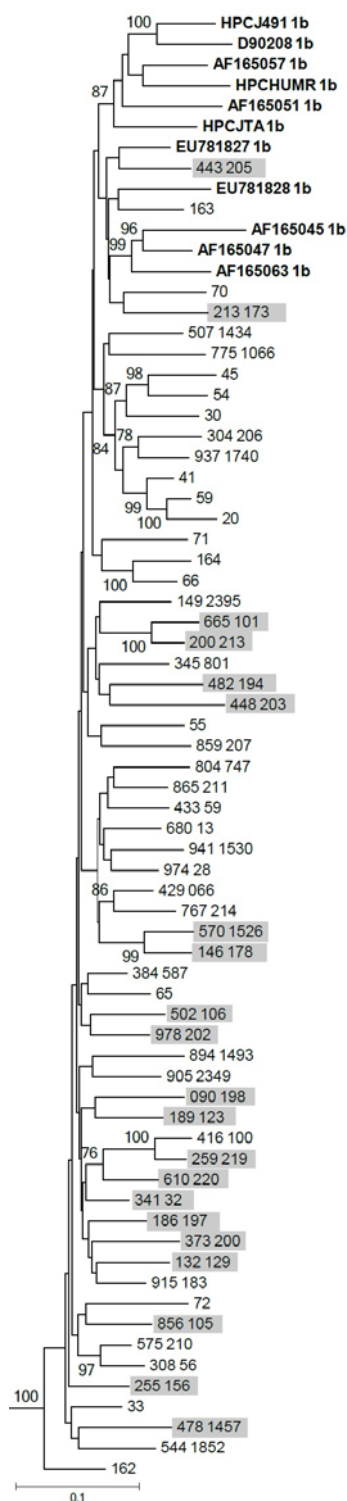
Continuación Tabla 7. ID: Pacientes Inmunodeprimidos.

Inhibidor	Posición aa	Codon	146 178 (ID)	482 194 (ID)	186 197 (ID)	373 200 (ID)	610 220 (ID)
IAN	15 •	GCT (A)	GCT (A): 31/31	GCG (A): 32/32	GCT (A): 31/31	GCT (A): 9/33 GCC (A): 24/33	GCT (A): 10/34 GCC (A): 23/34 GTC (V): 1/34
IAN	72 •	AAG (K)	AAG (K): 31/31	AAG (K): 32/32	AAG (K): 31/31	AAG (K): 33/33	AAG (K): 34/34
IAN	96 •	TCG (S)	TCG (S): 31/31	TCG (S): 32/32	TCG (S): 28/31 TCA (S): 3/31	TCG (S): 2/33 TCA (S): 31/33	TCG (S) 31/34 TCA (S): 3/34
IAN	142 •	AAT (N)	AAT (N): 31/31	AAT (N): 32/32	AAT (N): 31/31	AAT (N): 27/33 AAC (N): 6/33	AAT (N): 34/34
IAN	159 •	CTT (L)	CTT (L): 31/31	TTT (F): 32/32	CTT (L): 2/31 CTC (L): 29/31	CTT (L): 33/33	CTT (L): 34/34
IAN	222 •	CGC (R)	CGC (R): 31/31	CGC (R): 32/32	CGC (R): 31/31	CGC (R): 33/33	CGC (R): 34/34
IAN	223 •	TGT (C)	TGT (C): 31/31	TGT (C): 31/32 TGC (C): 1/32	TGT (C): 31/31	TGC (C): 33/33	TGT (C): 32/34 TGC (C): 2/34
IAN	239 •	ATC (I)	ATT (I): 31/31	ATT (I): 32/32	ATC(I): 2/31 ATT(I): 29/31	ATC (I): 33/33	ATT (I): 33/34 ATC (I): 1/34
IAN	282 •	AGC (S)	AGC (S): 31/31	AGC (S): 32/32	AGC (S): 31/31	AGC (S): 33/33	AGC (S): 33/34 AGA (R): 1/34
IAN	320 •	CTT (L)	CTT (L): 31/31	CTT (L): 32/32	CTT (L): 25/31 CTC (L): 6/31	CTT (L): 33/33	CTT (L): 33/34 CTC (L): 1/34
IAN	321 •	GTC (V)	GTC (V): 31/31	GTC (V): 32/32	GTC (V): 31/31	GTC (V): 33/33	GTC (V): 34/34
IAN	396 •	GCG (A)	GCG (A): 31/31	GCG (A): 32/32	GCG (A): 31/31	GCG (A): 33/33	GCG (A): 34/34
IAN	586 •	TAT (Y)	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 32/32	TAC (Y): 31/31	TAT (Y): 1/33 TAC (Y): 32/33	TAC (Y): 34/34
INN	19 ••	ACC (T)	AGC (S): 31/31	AGC (S): 32/32	AGC (S): 30/31 AGT (S): 1/31	AGC (S): 33/33	AGC (S): 33/34 AGT (S): 1/34
INN	50 •	AAG (K)	AAG (K): 31/31	AAG (K): 31/32 CAG (Q): 1/32	AAA (K): 29/31 AAG (K): 2/31	AAG (K): 33/33	AAG (K): 34/34
INN	55 •	GAC (D)	GAC (D): 31/31	GAC (D): 32/32	GAC (D): 31/31	GAC (D): 33/33	GAC (D): 34/34
INN	71 •	ATG (M)	ATG (M): 31/31	ATG (M): 31/32 GTG (V): 1/32	ATG (M): 31/31	ATG (M): 33/33	ATG (M): 34/34
INN	95 •	CAT (H)	CAT (H): 31/31	CAT (H): 32/32	CAT (H): 31/31	CAT (H): 30/33 CAC (H): 2/33 CTT (L): 1/33	CAT (H): 34/34
INN	138 •	ATC (I)	ATC (I): 31/31	ATC (I): 32/32	ATC (I): 31/31	ATC (I): 33/33	ATC (I): 34/34
INN	300 ••	GCT(A)	ACT (T): 5/31 ACC (T): 26/31	ACT (T): 32/32	ACT (T): 31/31	GCT(A): 33/33	ACT (T): 34/34
INN	314 •	CTC (L)	CTC (L): 31/31	CTC (L): 32/32	CTC (L): 31/31	CTC (L): 30/33 CTT(L): 3/33	CTC (L): 34/34
INN	316 •	TGC (C)	TGC (C): 31/31	AAC (N): 32/32	TGC (C): 31/31	TGT(C): 33/33	TGC (C): 33/34 TGT (C): 1/34
INN	338 •	GCC (A)	GTC (V): 31/31	GTC (V): 32/32	GTC (V): 31/31	GTC (V): 33/33	GTC (V): 34/34
INN	363 •	ATA (I)	ATA (I): 31/31	ATA (I): 32/32	ATA (I): 30/31 ATT (I): 1/31	ATA (I): 33/33	ATA (I): 34/34
INN	365 •	TCA (S)	TCA (S): 31/31	TCA (S): 32/32	TCA (S): 31/31	TCA (S): 33/33	TCA (S): 33/34 TCG (S): 1/34
INN	368 •	TCC (S)	TCC (S): 31/31	TCC (S): 32/32	TCC (S): 31/31	TCC (S): 33/33	TCC (S): 34/34
INN	389 •	ACC (T)	ACC (T): 31/31	ACC (T): 32/32	ACC (T): 31/31	ACC (T): 33/33	ACC (T): 34/34
INN	392 •	CTT (L)	CTC (L): 31/31	CTT (L): 32/32	CTT (L): 30/31 CTC (L): 1/31	CTT (L): 33/33	CTT (L): 26/34 CTC (L): 8/34

INN	411 •	AAC (N)	AAC (N): 31/31	AAC (N): 32/32	AAC (N): 31/31	AAC (N): 33/33	AAC (N): 34/34
INN	414 •	ATG (M)	ATG (M): 31/31	ATG (M):32/32	ATG (M): 31/31	ATG (M): 33/33	ATG (M): 34/34
INN	419 •	TTG (L)	TTA (L): 31/31	CTA (L): :32/32	TTG (L): 2/31TTA (L): 25/31 CTA (L): 4/31	TTG (L): 27/33 TTA (L): 5/33 CTA (L): 1/33	TTG (L): 15/34 TTA (L): 19/34
INN	421 •	GCA (A)	GCG (A): 31/31	GCA (A): 32/32	GCA (A): 31/31	GCG (A): 32/33 GGG (G): 1/33	GCA (A): 34/34
INN	422 •	AGG (R)	AGG (R): 31/31	AGG (R): 32/32	AGG (R): 31/31	AGG (R): 33/33	AGG (R): 33/34 AGA (R): 1/34
INN	423 •	ATG (M)	ATG (M): 31/31	ATG (M): 32/32	ATG (M): 31/31	ATG (M): 33/33	ATG (M): 34/34
INN	424 •	ATC (I)	ATC (I): 31/31	ATT (I): 32/32	ATT (I): 31/31	ATC (I): 1/33 ATT (I):32/33	ATC (I): 1/34 ATT (I): 33/34
INN	426 •	ATG (M)	ATG (M): 31/31	ATG (M): 32/32	ATG (M): 31/31	ATG (M): 33/33	ATG (M): 34/34
INN	442 •	GCC (A)	GCC (A): 31/31	GCC (A): 32/32	GCC (A): 31/31	GCC (A): 33/33	GCC (A): 33/34 ACC (T): 1/34
INN	445 •	TGT (C)	TGC (C): 31/31	TGT (C): 32/32	TGT (C): 29/31 TGC (C): 2/31	TGT (C): 4/33 TGC (C): 29/33	TGT (C) : 34/34
INN	447 •	ATC (I)	ATC (I): 31/31	ATC (I): 32/32	ATC (I): 31/31	ATC (I): 33/33	ATC (I): 34/34
INN	448 •	TAC (Y)	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 32/32	TAC (Y): 31	TAC (Y): 32/33 TAT (Y): 1/33	TAC (Y): 33/34 TAT (Y): 1/34
INN	451 •	TGT (C)	TGT (C): 31/31	TGT (C):32/32	TGT (C): 31/31	TGT (C): 32/33 TCT (S): 1/33	CAT (H): 34/34
INN	452 •	TAC (Y)	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 32/32	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 33/33	TAC (Y): 34/34
INN	462 •	ATC (I)	ATC (I): 31/31	ATC (I): 31/32ACC (T): 1/32	ATC (I): 31/31	ATC (I): 33/33	ATC (I): 34/34
INN	465 •	CGA (R)	CGA (R): 31/31	CGA (R): 32/32	CGA (R): 31/31	CGA (R): 33/33	CGA (R): 34/34
INN	482 •	ATC (I)	ATC (I): 31/31	ATC (I): 32/32	ATC (I): 31/31	ATC (I): 33/33	ATC (I): 34/34
INN	486 •	GCT (A)	GCT (A): 30/31 GCA (A): 1/31	GCT (A): 32/32	GCT (A): 30/31 GCA (A): 1/31	GCT (A): 33/33	GCG (A): 8/34 GCT (A): 26/34
INN	494 •	GTA (V)	GTA (V): 31/31	GTA (V): 32/32	GTA (V): 31/31	GTA (V): 33/33	GTA (V): 34/34
INN	495 •	CCG (P)	CCG (P): 31/31	CCA (P): 32/32	CCG (P): 2/31 CCA (P): 29/31	CCG (P): 30/33 CCA (P): 3/33	CCA (P): 34/34
INN	496 •	CCC (P)	CCC (P): 31/31	CCC (P): 32/32	CCC (P): 31/31	CCC (P): 33/33	CCC (P): 33/34 CCT (P): 1/34
INN	499 •	GTC (V)	GTC (V): 31/31	GTC (V): 32/32	GTC (V): 31/31	GTC (V): 33/33	GTC (V): 34/34
INN	531 •	AGG (R)	AGG (R): 31/31	AAG (K): 32/32	AGG (R): 19/31 AAG (K): 12/31	AGG (R): 31/33 AGA (R): 2/33	AGG (R): 34/34
INN	554 •	GGT (G)	GGC (G): 31/31	GGG (G): 21/32 GGA (G): 11/32	GGT (G): 31/31	GGT (G): 33/33	GGC (G): 34/34
INN	555 •	TAC (Y)	TAC (Y): 31/31	TAT (Y): 32/32	TAC (Y): 31/31	TAC (Y): 33/33	TAC (Y): 34/34
INN	556 •	AGC (S)	AGC (S): 31/31	AGC (S): 32/32	AGC (S): 31/31	AGC (S): 32/33 GGC (G): 1/33	AGC (S): 25/34 AGT (S): 6/34 GGC (G): 3/34
INN	558 •	GGA (G)	GGA (G): 31/31	GGA (G): 32/32	GGA (G): 31/31	GGA (G): 33/33	GGA (G): 34/34
INN	559 •	GAC (D)	GAC (D): 31/31	GAC (D): 32/32	GAC (D): 30/31 GAT (D): 1/31	GAC (D): 33/33	GAC (D): 34/34
INN	571 •	TGG (W)	TGG (W): 31/31	TGG (W): 32/32	TGG (W): 31/31	TGG (W): 33/33	TGG (W): 34/34

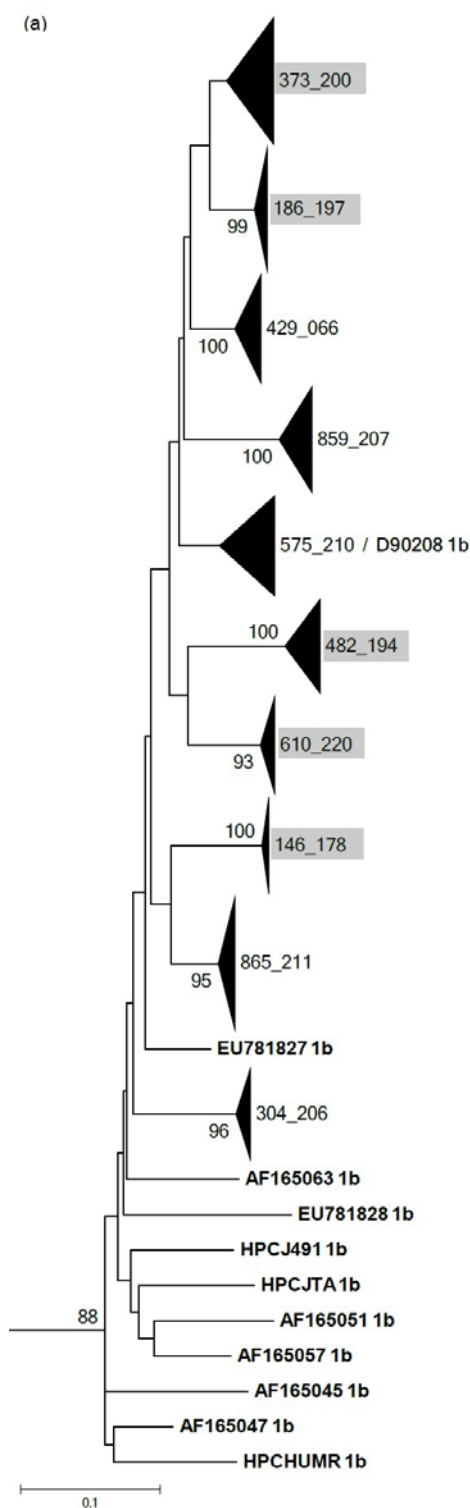
ANEXO XVI

Árbol filogenético por máxima verosimilitud de las regiones NS3 y NS5B concatenadas de los 60 aislados del VHC analizados junto a secuencias de referencia genotipo 1b del VHC. Las secuencias de los aislados del VHC se identifican con el número de seroteca, además los aislados de los pacientes inmunodeprimidos sombreados y las secuencias de referencia de los genotipos 1b se resaltan en negrita. Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,442). Se indican con un valor de bootstrap >70% (1000 replicados). La escala representa 0,1 sustituciones por posición nucleotídica.

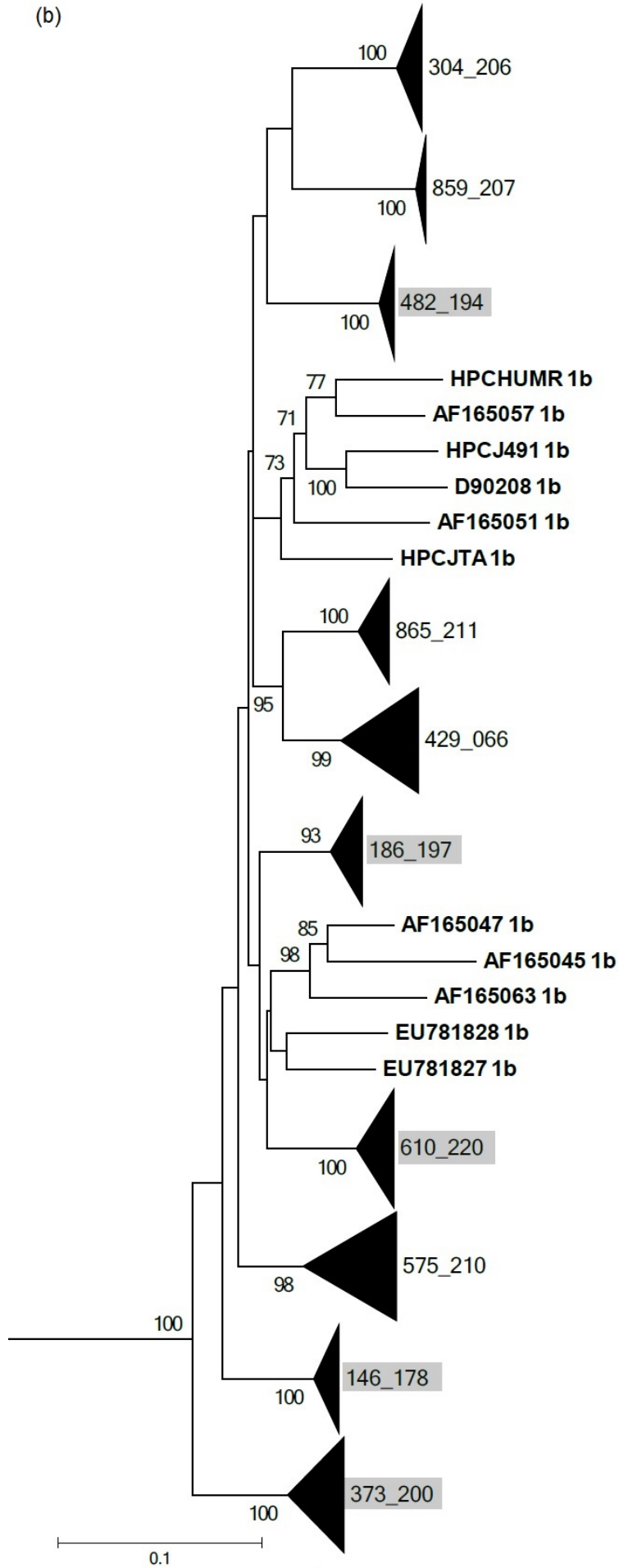


ANEXO XVII

Árbol filogenético por máxima verosimilitud de la región (a) NS3 y (b) NS5B de los clones moleculares de los 10 aislados seleccionados junto a secuencias de referencia genotipo 1b del VHC. Las secuencias de los clones moleculares se agrupan con cada aislado y se identifican con el número de seroteca, resaltando con sombra los aislados de pacientes inmunodeprimidos, y las secuencias de referencia de los genotipos 1b se resaltan en negrita. Modelo de sustitución: GTRGAMMA (α : 0,442). Se indican con un valor de bootstrap >70% (1000 replicados). La escala representa 0,1 sustituciones por posición nucleotídica.

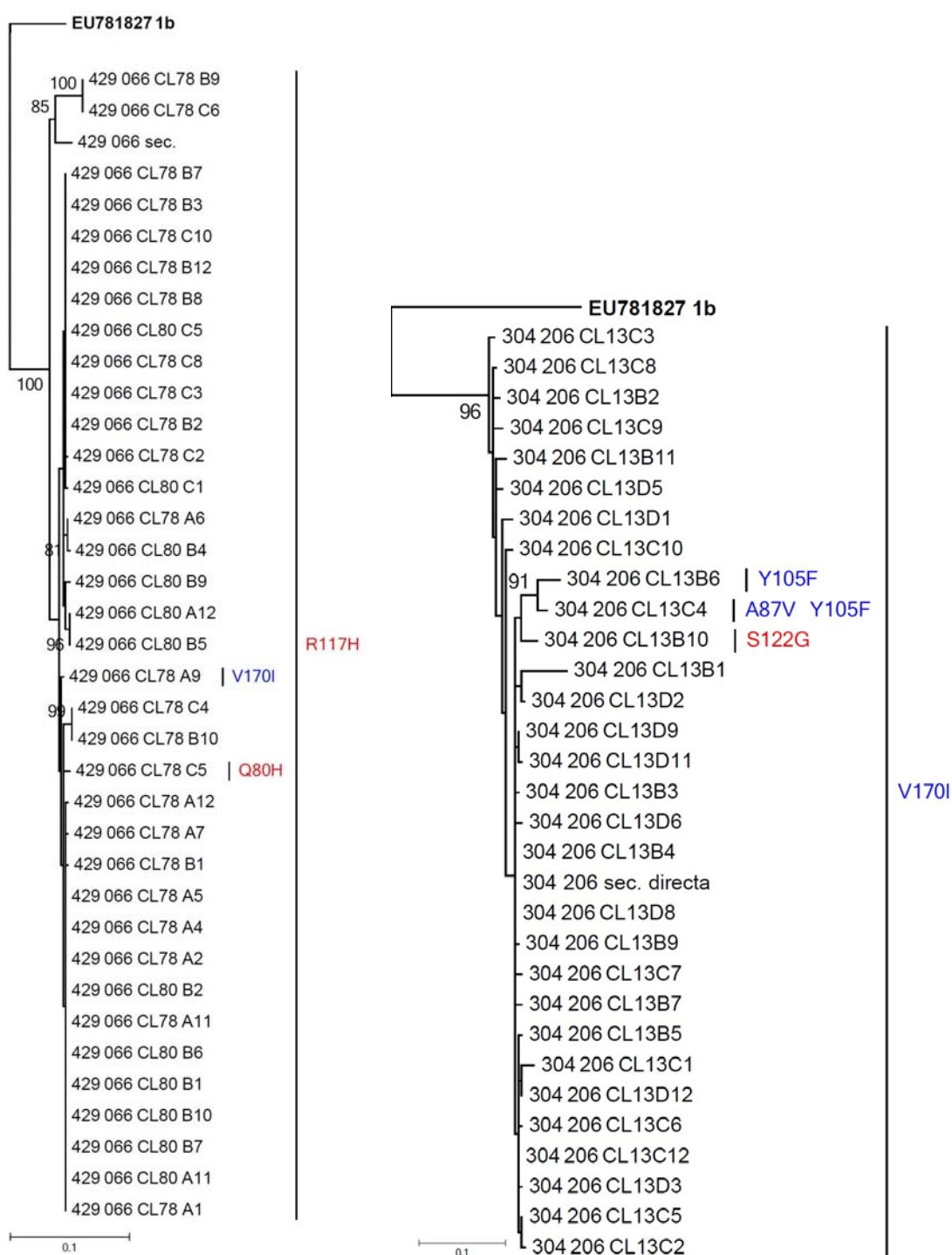


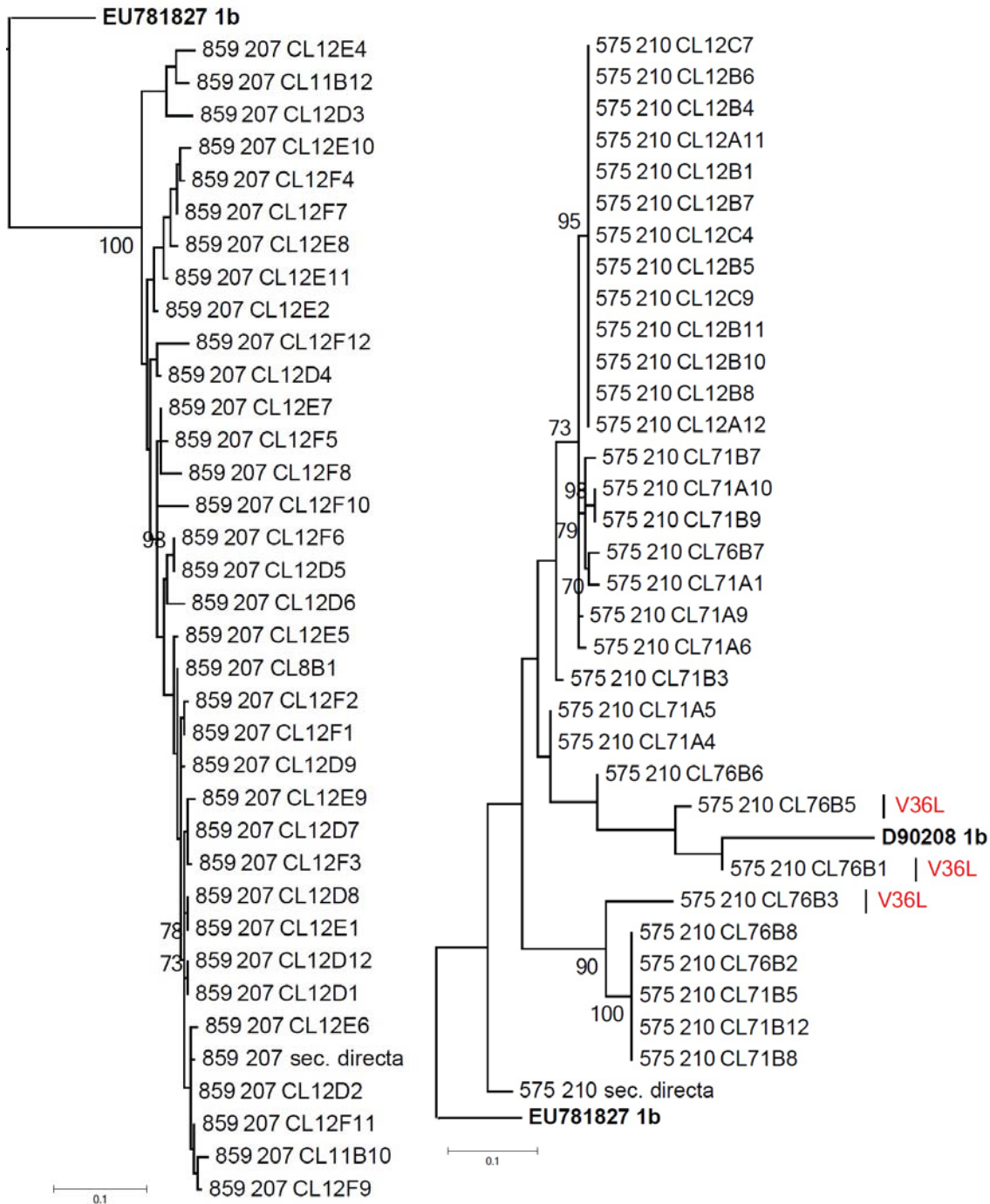
(b)

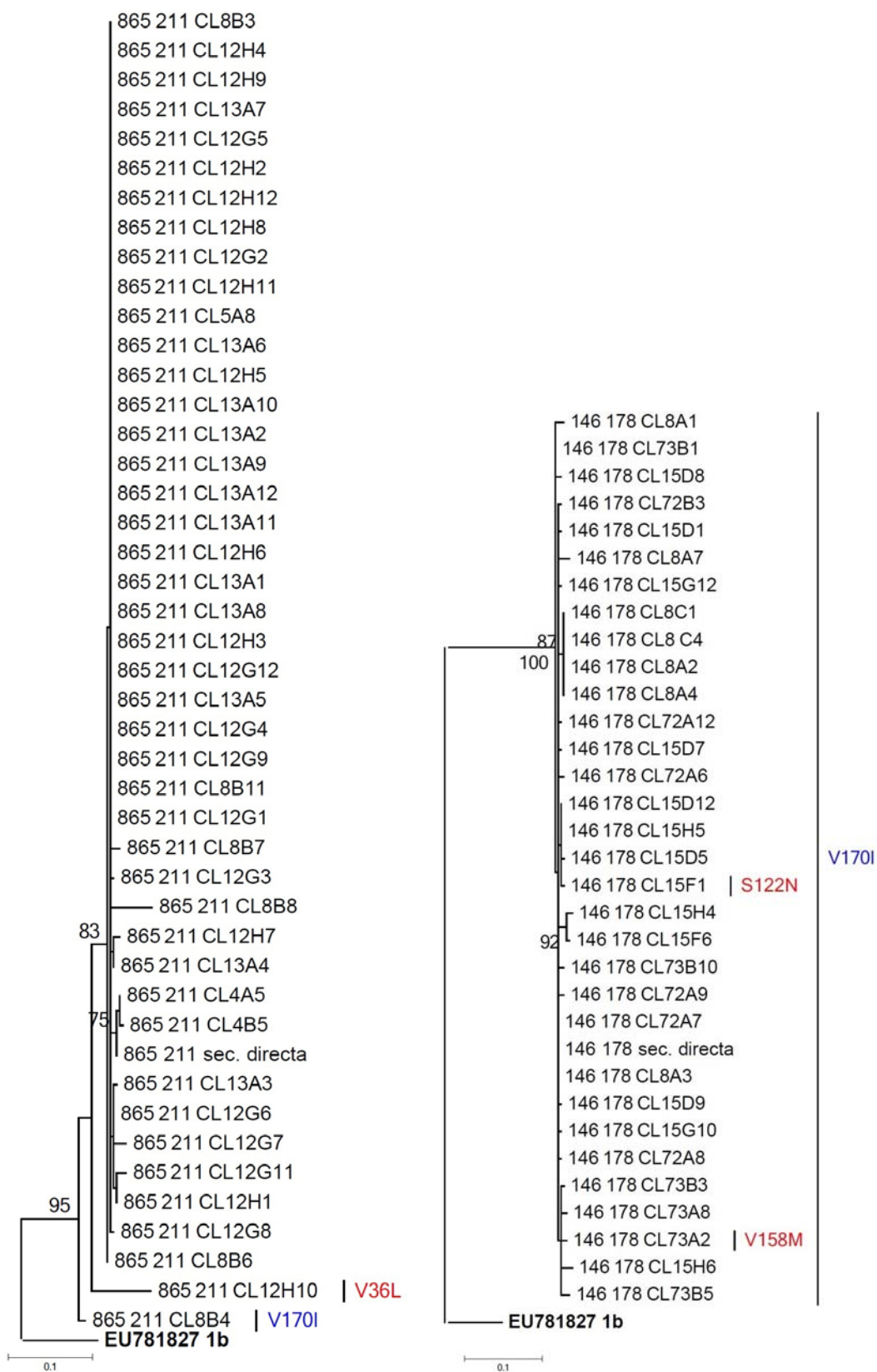


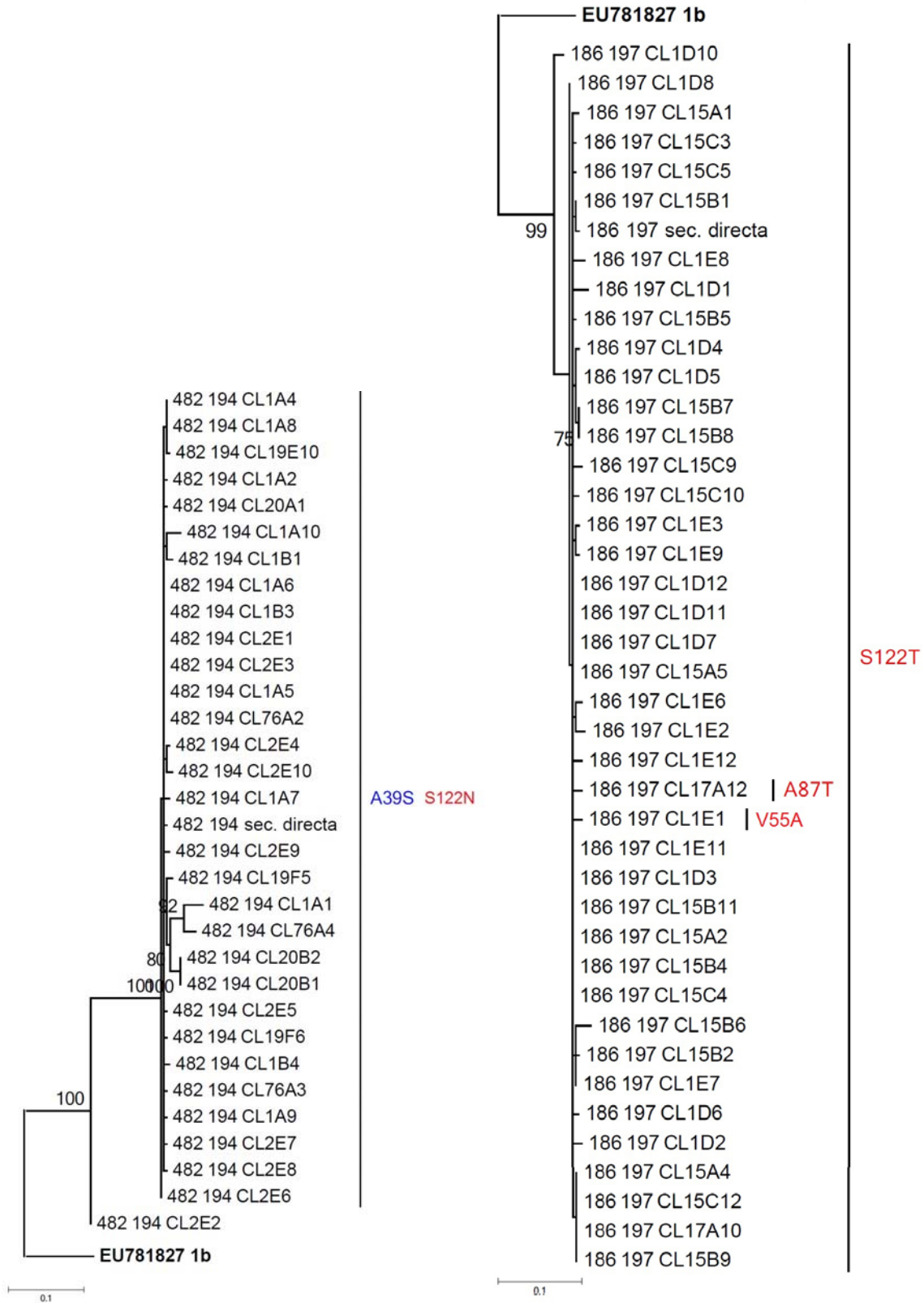
ANEXO XVIII

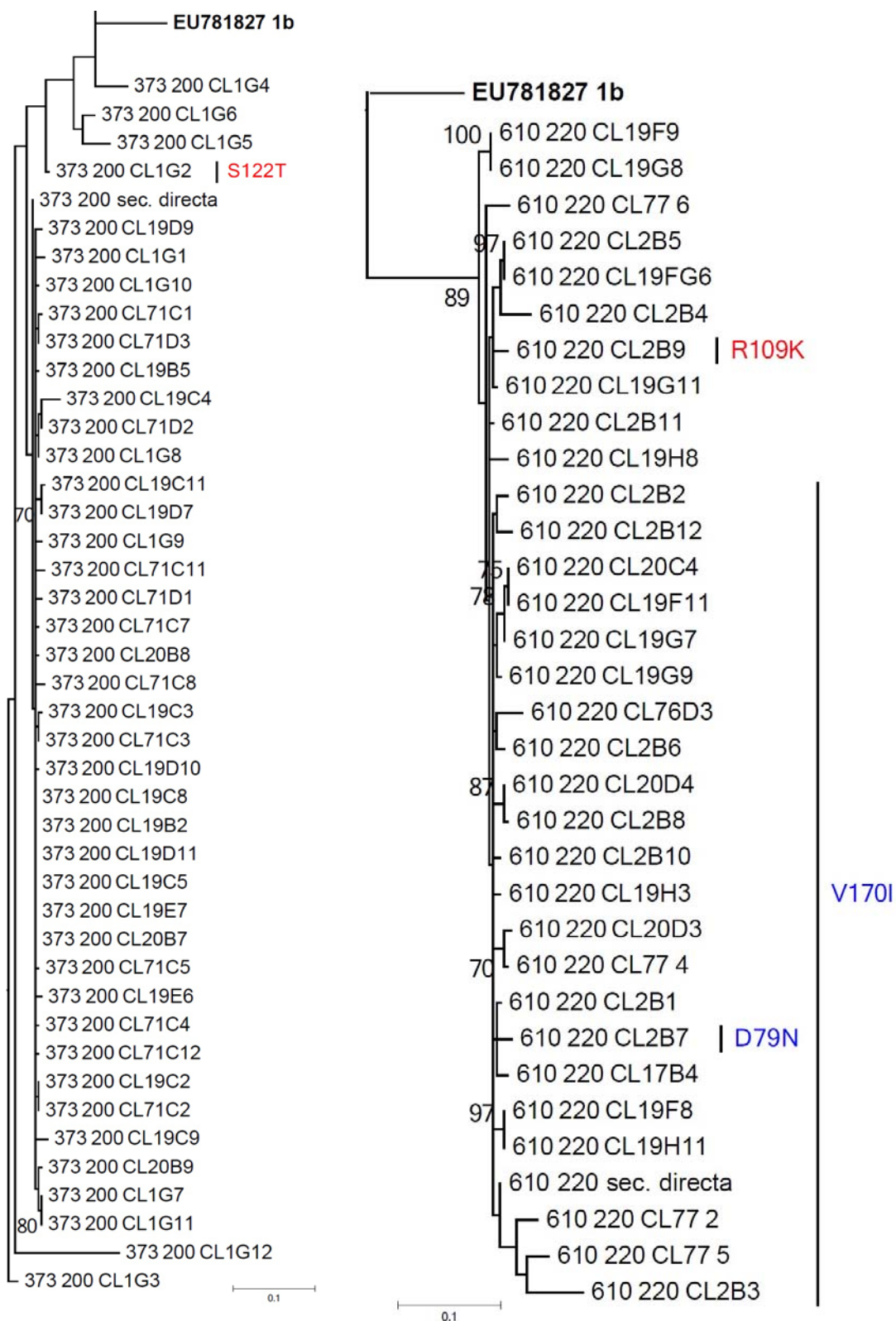
Árboles filogenéticos de las secuencias de los clones moleculares pertenecientes a cada paciente, región NS3 del VHC. Filogenias correspondientes a los aislados analizados en esta tesis, bajo el criterio de máxima verosimilitud con el programa RAxMLv7.2.6 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis A. 2006; 2008) con el modelo GTR (General Time-Reversible) de sustitución de nucleótidos, una aproximación de la tasa de heterogeneidad de la distribución gamma ($\alpha: 0,382$) y el soporte de bootstrap $>70\%$ por rama fue de 1000 réplicas. La escala representa 0,1 sustituciones por posición nucleotídica. Las secuencias de los clones moleculares de cada paciente de estudio se identifican en color negro y con el número de seroteca, se destaca en negrita la secuencia más cercana de referencia genotipo 1b del VHC. En cada árbol de la región NS3 se enfatiza en color rojo las mutaciones de resistencia a IP, y en color azul los polimorfismos encontrados.





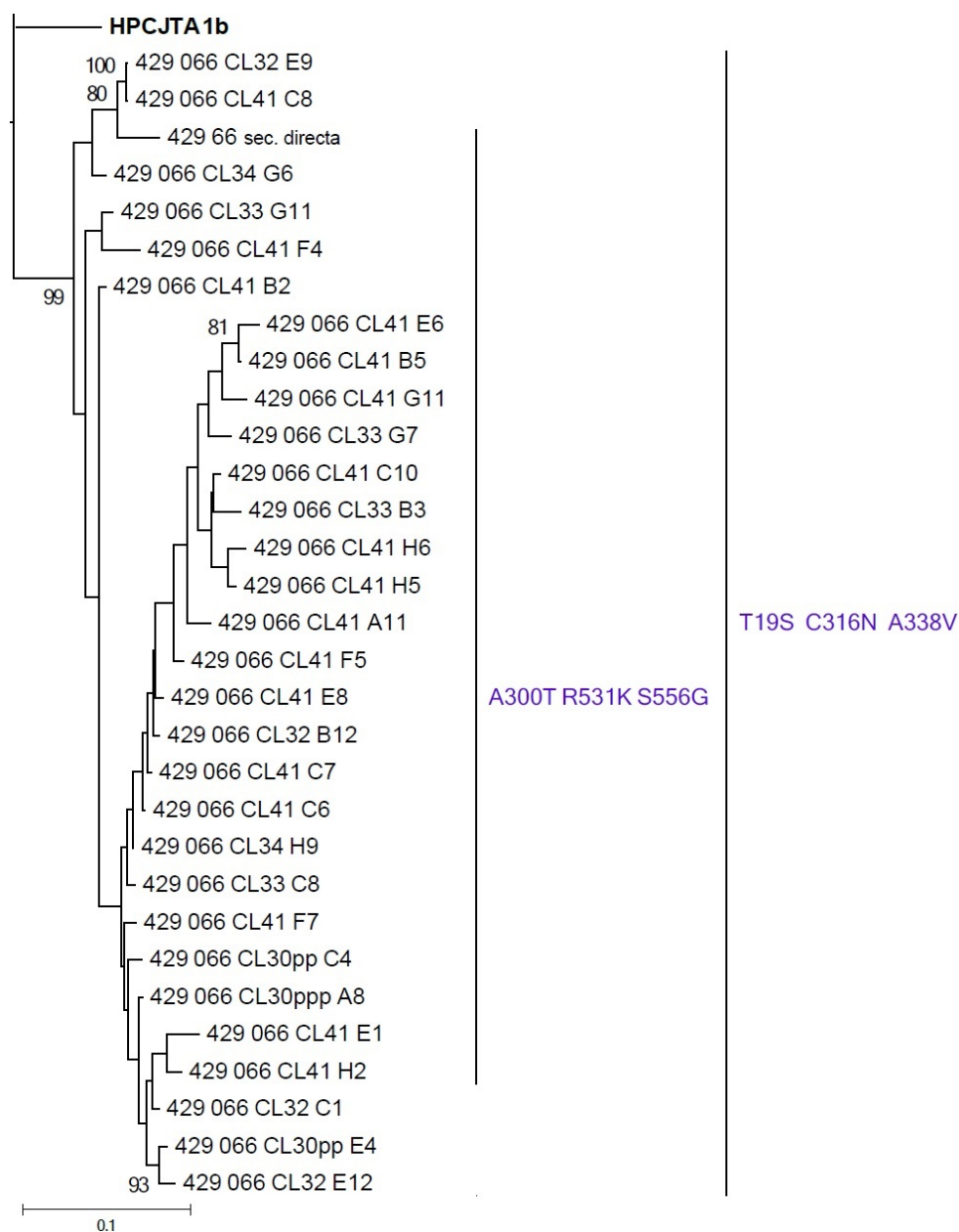


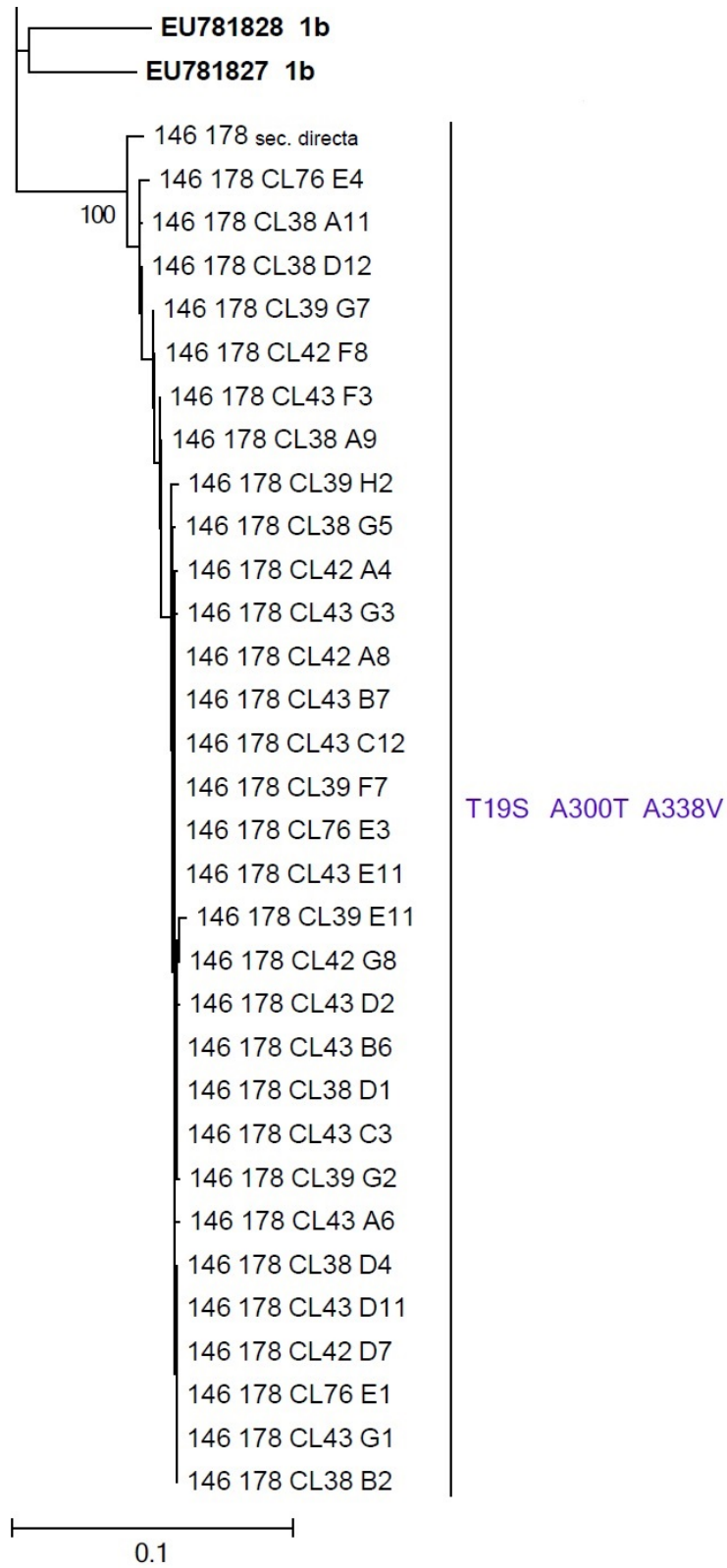


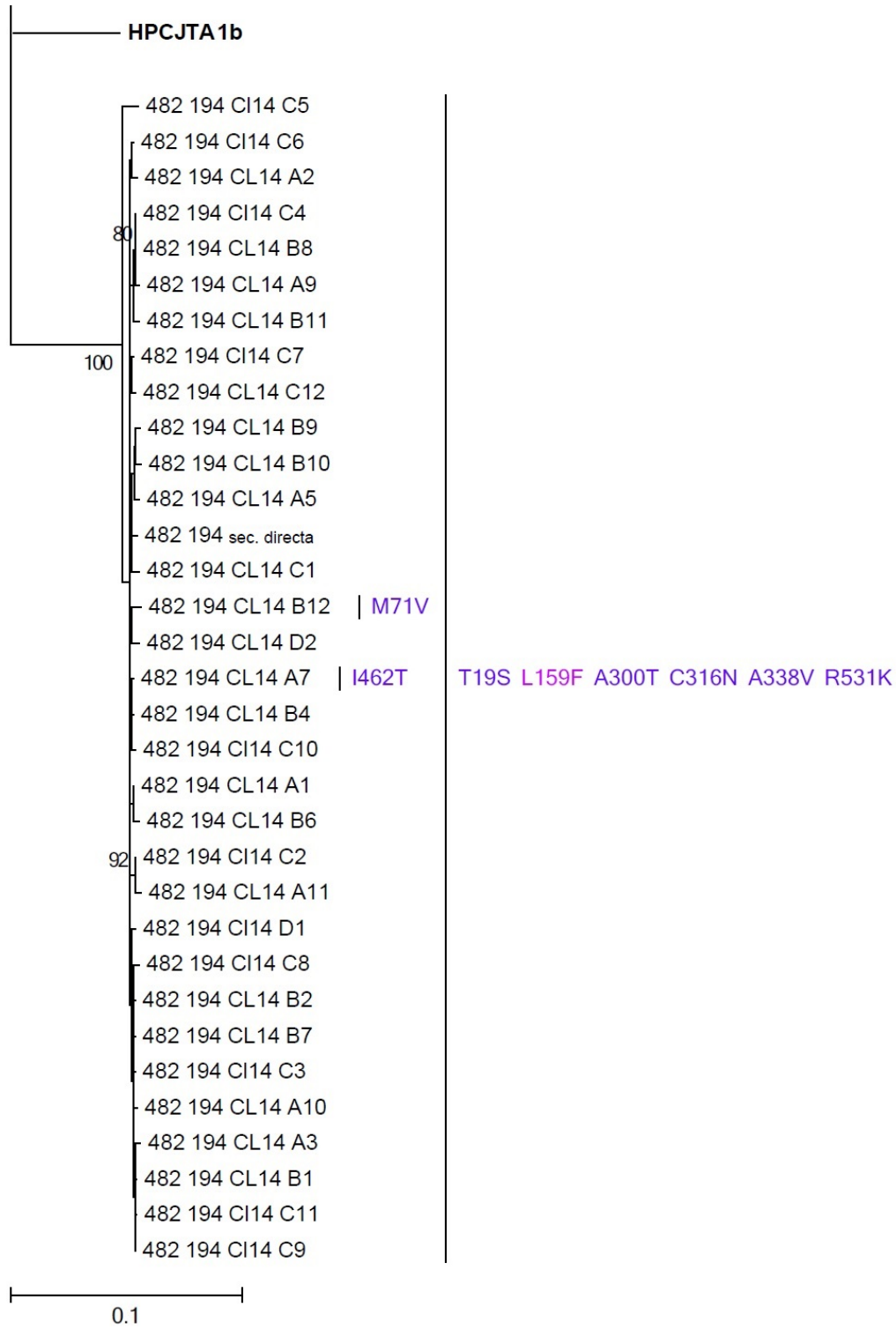


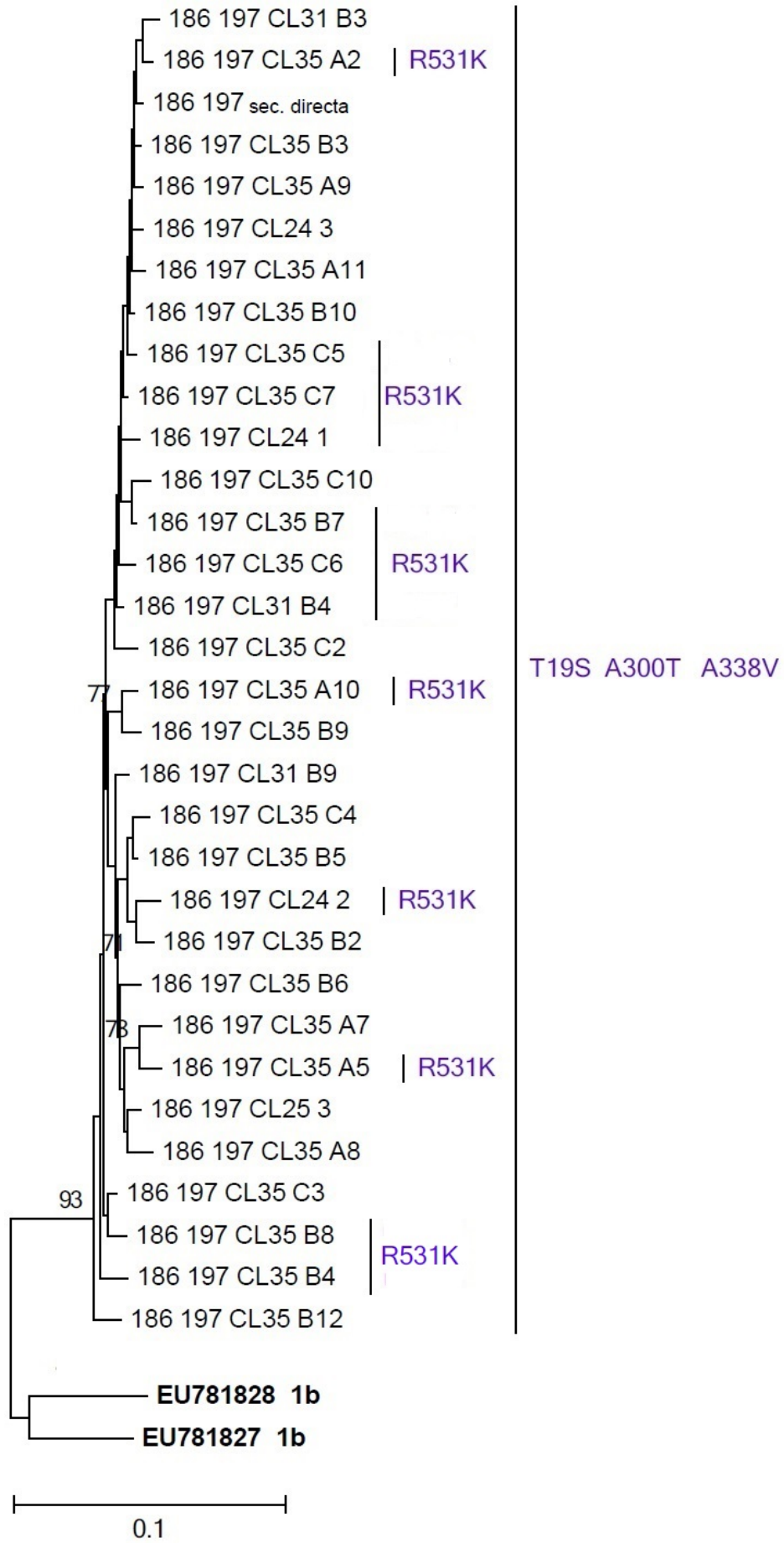
ANEXO XIX

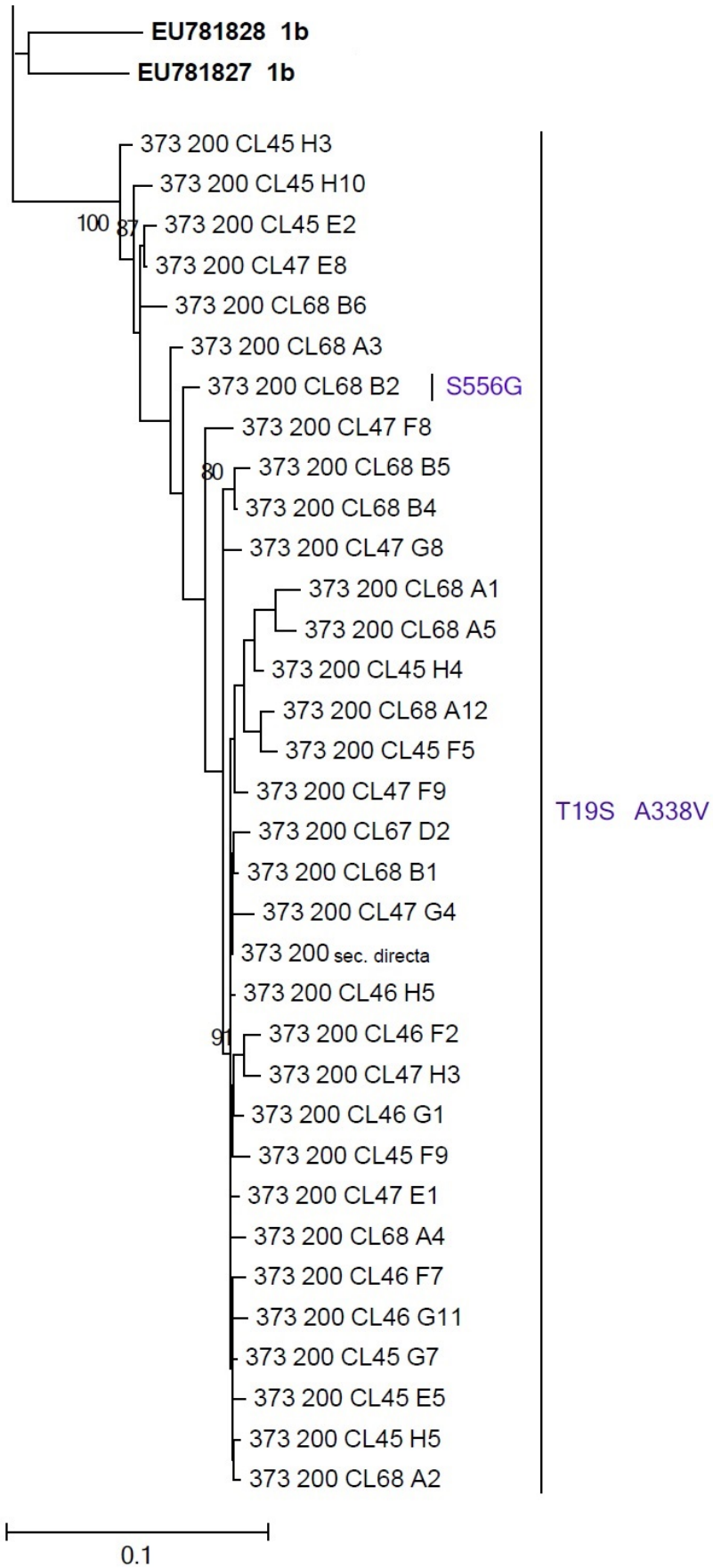
Árboles filogenéticos de las secuencias de los clones moleculares pertenecientes a cada paciente, región NS5B del VHC. Filogenias correspondientes a los aislados analizados en esta tesis, bajo el criterio de máxima verosimilitud con el programa RAxMLv7.2.6 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis A. 2006; 2008) con el modelo GTR (General Time-Reversible) de sustitución de nucleótidos, una aproximación de la tasa de heterogeneidad de la distribución gamma (α : 0,483) y el soporte de bootstrap >70% por rama fue de 1000 réplicas. La escala representa 0,1 sustituciones por posición nucleotídica. Las secuencias de los clones moleculares de cada paciente de estudio se identifican en color negro y con el número de seroteca, se destaca en negrita la secuencia más cercana de referencia genotipo 1b del VHC. En cada árbol de la región NS5B se enfatiza en color fucsia las mutaciones de resistencia a IAN, y en color lila las mutaciones de resistencias a INN encontrados.

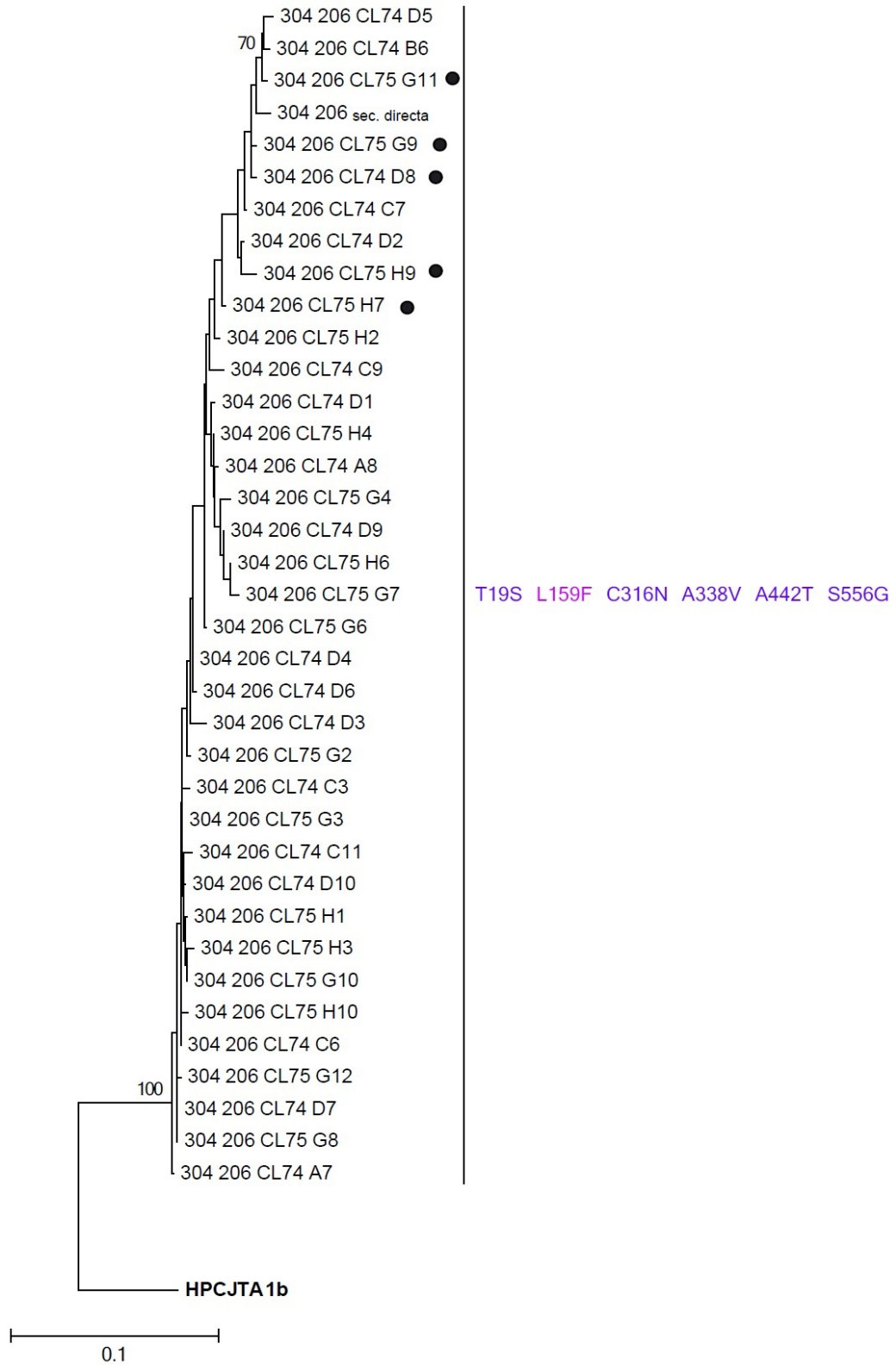




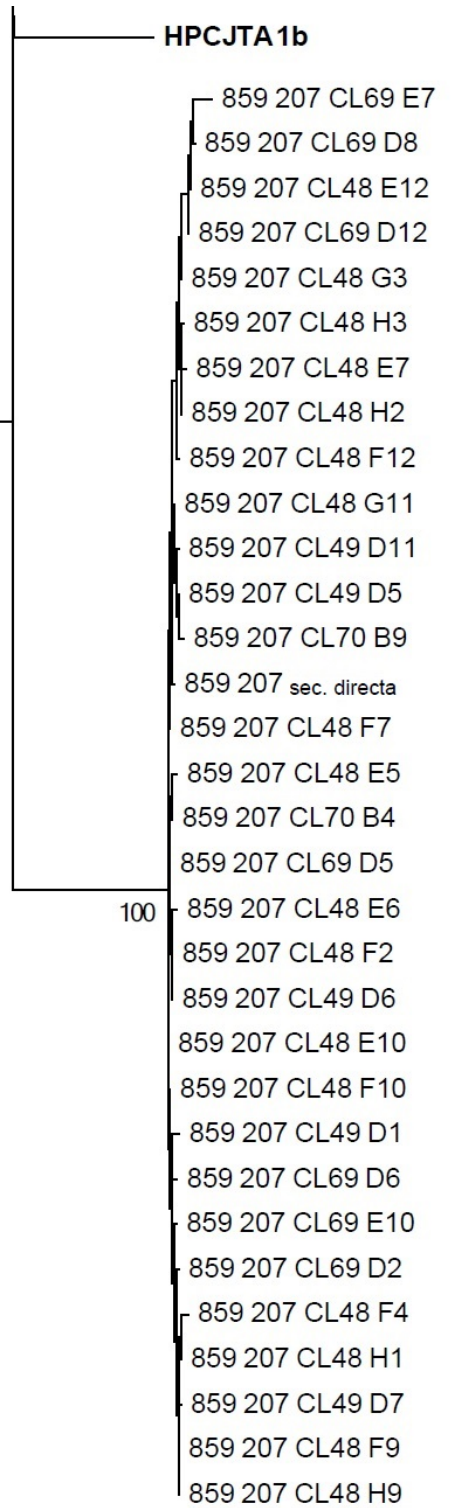






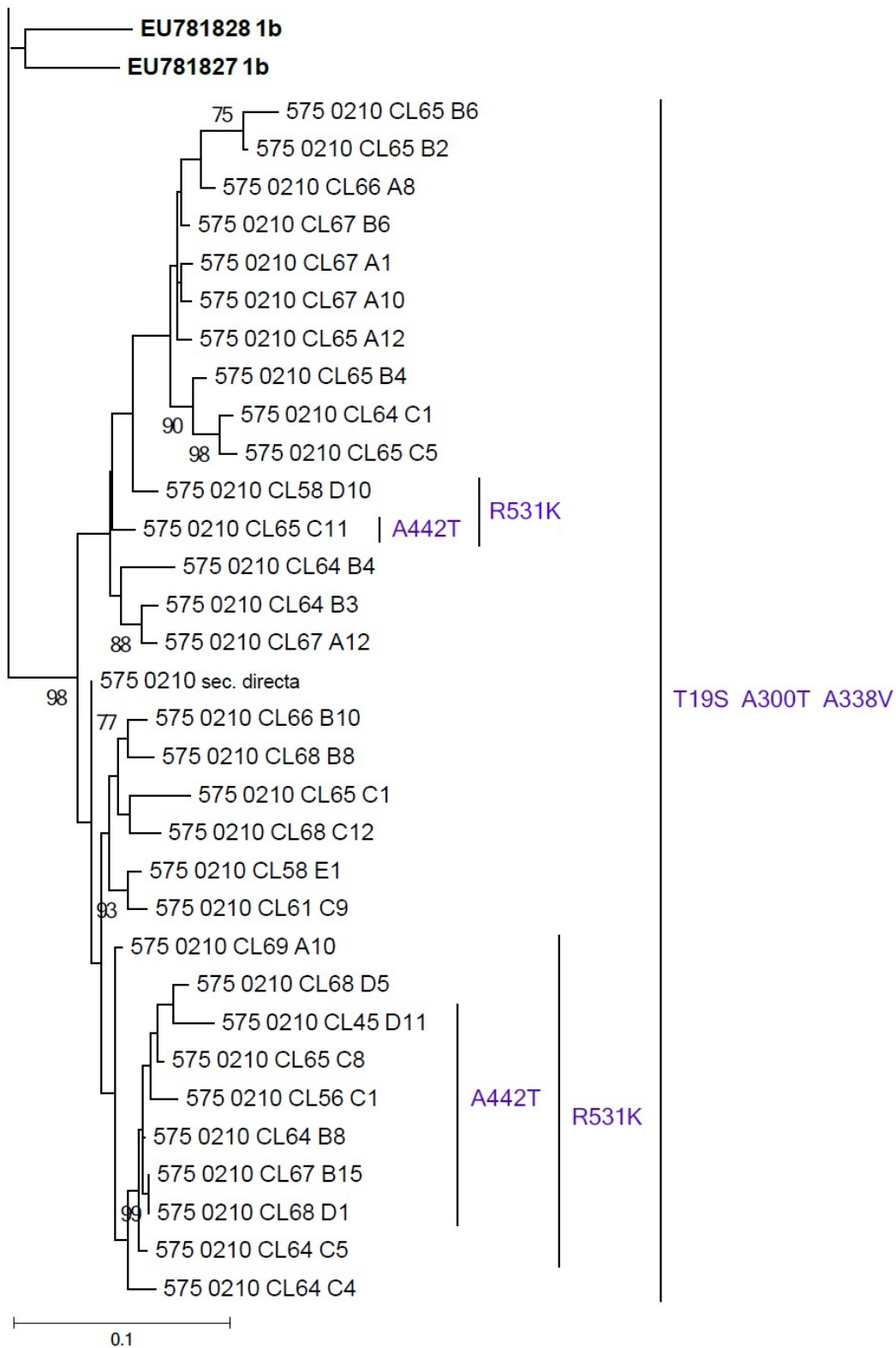


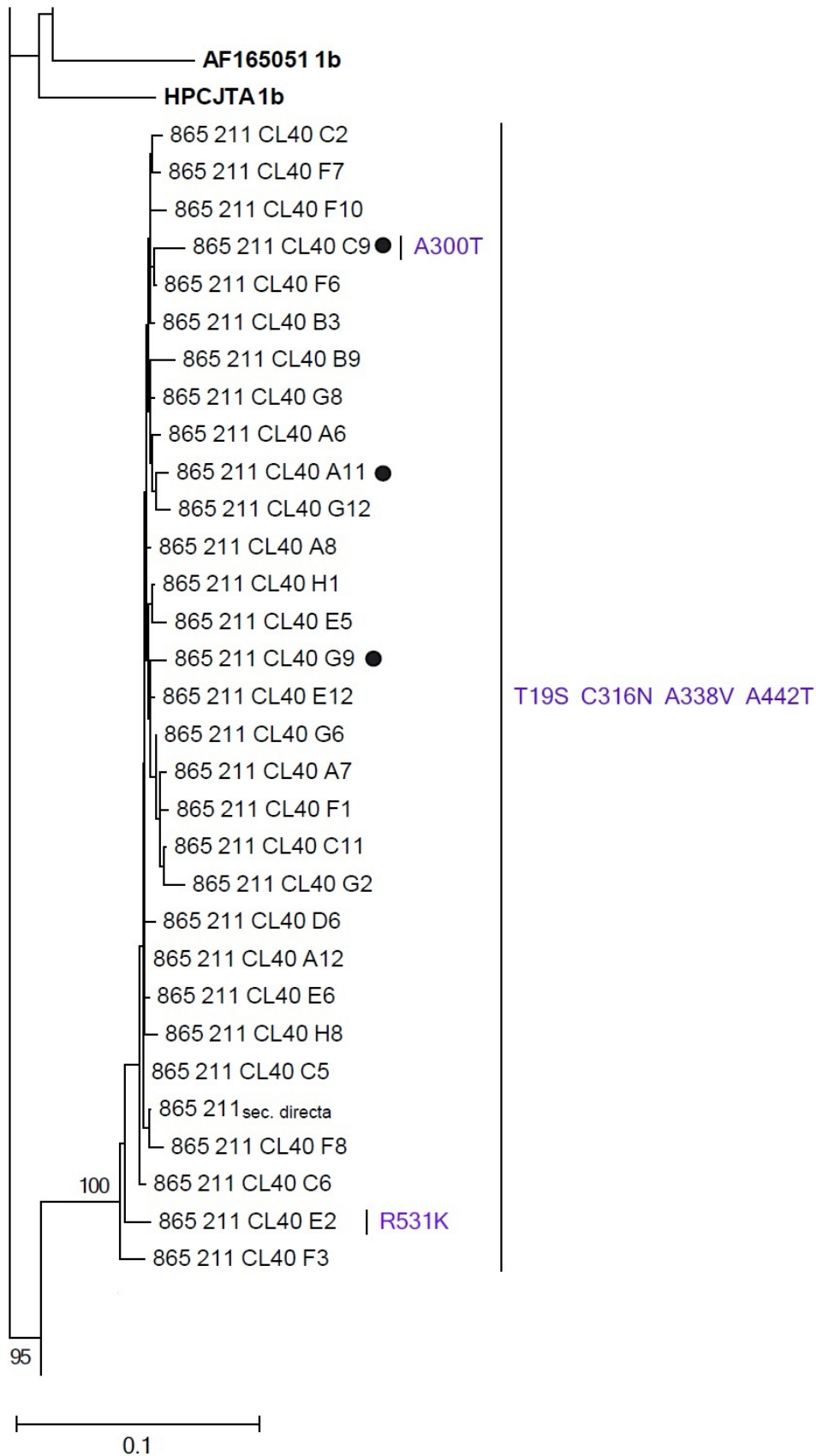
● secuencias que no poseen la mutación A442T



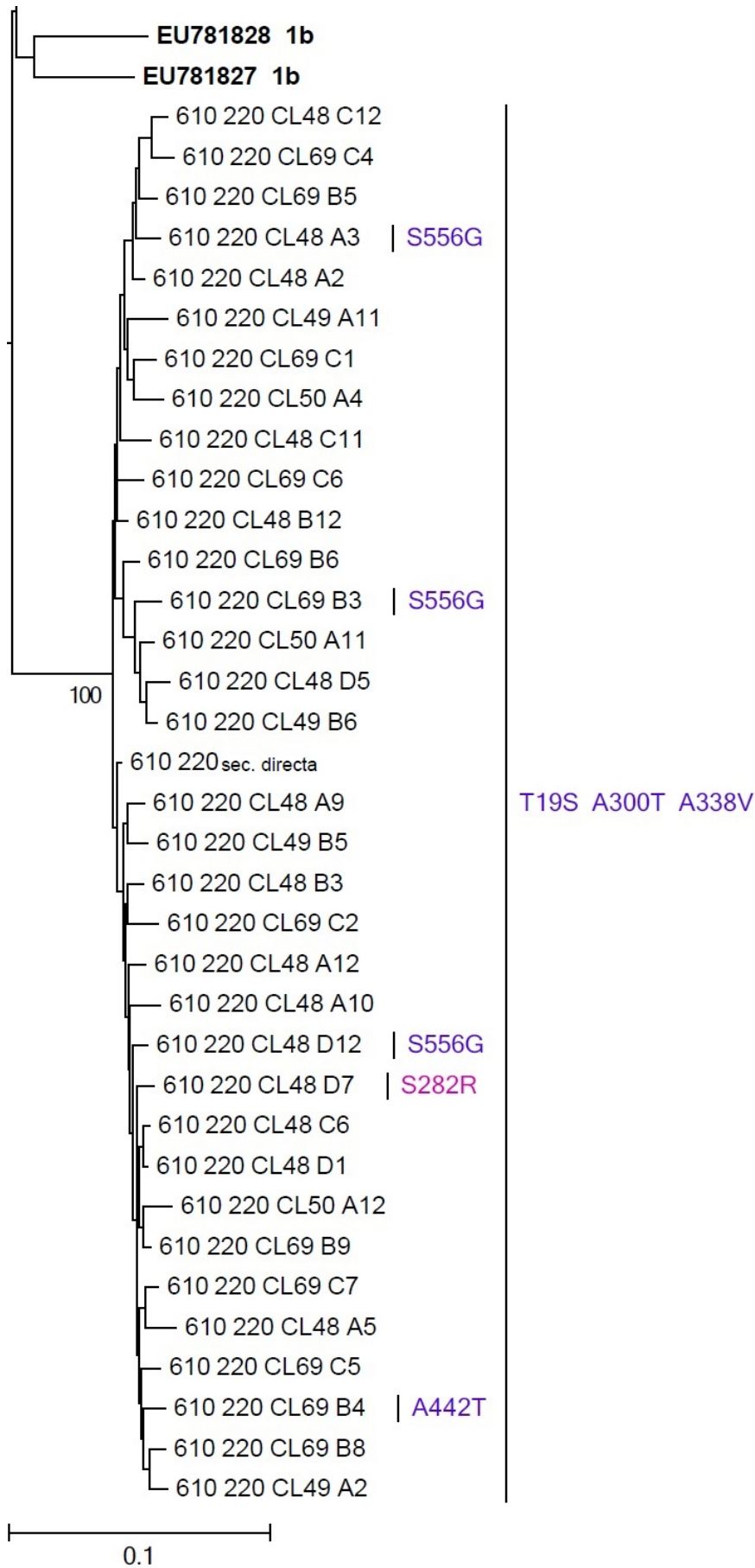
T19S L159F C316N A338V M426V V499A R531K S556G

0.1





● secuencias que no poseen la mutación T19S y A442T.



ANEXO XXTabla 8. *Análisis FEL para la región de la proteasa NS3. Codones bajo selección negativa*

<i>Proteasa NS3</i>					
<i>Codon</i>	<i>dS</i>	<i>dN</i>	<i>dN/dS</i>	<i>dN-dS</i> (normalizada)	<i>p-value</i>
1	1.930	0.068	0.035	-0.679	0.0001
2	1.661	0	0.000	-0.606	0.0000
3	0.912	0.044	0.049	-0.316	0.0010
4	1.215	0.109	0.090	-0.403	0.0053
5	0.686	0	0.000	-0.250	0.0017
6	2.389	0.062	0.026	-0.849	0.0000
7	1.473	0.345	0.234	-0.412	0.0156
8	1.391	0	0.000	-0.508	0.0001
9	1.540	0	0.000	-0.562	0.0009
10	2.352	0	0.000	-0.858	0.0000
11	2.280	0	0.000	-0.832	0.0000
12	0.695	0	0.000	-0.254	0.0038
13	0.989	0.225	0.227	-0.279	0.0130
14	0.908	0.164	0.181	-0.271	0.0040
15	1.357	0	0.000	-0.495	0.0001
16	1.119	0	0.000	-0.408	0.0000
17	0.337	0	0.000	-0.123	0.0129
19	1.257	0	0.000	-0.458	0.0000
20	0.956	0	0.000	-0.349	0.0003
21	0.881	0	0.000	-0.322	0.0002
22	0.245	0	0.000	-0.089	0.0293
23	0.698	0	0.000	-0.255	0.0037
24	1.295	0	0.000	-0.472	0.0002
25	0.524	0	0.000	-0.191	0.0086
27	0.777	0	0.000	-0.284	0.0008
28	0.743	0	0.000	-0.271	0.0193
29	2.033	0	0.000	-0.742	0.0000
30	0.351	0	0.000	-0.128	0.0663
31	1.873	0	0.000	-0.684	0.0000
32	0.710	0	0.000	-0.259	0.0095
33	0.678	0	0.000	-0.247	0.0001
34	1.825	0	0.000	-0.666	0.0000
35	0.560	0	0.000	-0.204	0.0073
36	4.043	0.055	0.014	-1.455	0.0000
37	0.917	0	0.000	-0.335	0.0001
38	0.839	0	0.000	-0.306	0.0002
39	1.612	0.069	0.043	-0.563	0.0000
40	1.286	0	0.000	-0.469	0.0000
41	0.301	0	0.000	-0.110	0.0655
42	0.779	0	0.000	-0.284	0.0000
43	0.168	0	0.000	-0.061	0.0760
44	0.910	0	0.000	-0.332	0.0001
45	1.514	0	0.000	-0.552	0.0000
47	2.816	0	0.000	-1.028	0.0000
50	0.857	0	0.000	-0.313	0.0013

51	1.290	0.110	0.086	-0.430	0.0044
52	1.215	0	0.000	-0.444	0.0000
54	0.436	0	0.000	-0.159	0.0014
55	0.900	0.055	0.061	-0.308	0.0014
56	2.082	0.871	0.418	-0.442	0.0461
57	0.557	0	0.000	-0.203	0.0012
58	5.728	0	0.000	-2.091	0.0000
59	1.367	0	0.000	-0.499	0.0000
60	0.315	0	0.000	-0.115	0.0454
61	1.955	0.541	0.277	-0.516	0.0034
63	0.906	0.108	0.120	-0.291	0.0081
64	2.190	0	0.000	-0.799	0.0000
65	0.849	0.068	0.080	-0.285	0.0065
66	0.688	0.091	0.133	-0.218	0.0431
67	1.386	0.063	0.046	-0.483	0.0000
68	12.619	0	0.000	-4.606	0.0000
69	20.753	0	0.000	-7.575	0.0000
70	1.446	0	0.000	-0.528	0.0000
71	1.225	0.352	0.287	-0.319	0.0422
73	1.948	0	0.000	-0.711	0.0000
75	0.757	0	0.000	-0.276	0.0010
76	0.309	0	0.000	-0.113	0.0204
78	3.118	0	0.000	-1.138	0.0000
80	4.193	0	0.000	-1.530	0.0000
81	0.343	0	0.000	-0.125	0.0322
84	1.090	0	0.000	-0.398	0.0004
86	3.156	1.064	0.337	-0.763	0.0633
87	1.274	0.208	0.163	-0.389	0.0235
88	1.289	0	0.000	-0.471	0.0000
89	4.095	0.329	0.080	-1.374	0.0000
90	0.562	0	0.000	-0.205	0.0178
92	1.231	0	0.000	-0.449	0.0000
93	2.260	0	0.000	-0.825	0.0000
94	2.276	0.224	0.098	-0.749	0.0000
95	0.762	0	0.000	-0.278	0.0001
96	1.531	0	0.000	-0.559	0.0000
98	1.752	0.054	0.031	-0.620	0.0000
99	0.752	0	0.000	-0.274	0.0011
102	2.437	0.054	0.022	-0.870	0.0000
103	1.257	0	0.000	-0.459	0.0001
104	0.995	0	0.000	-0.363	0.0000
105	2.476	0.061	0.025	-0.881	0.0000
106	0.603	0	0.000	-0.220	0.0013
107	0.667	0	0.000	-0.243	0.0009
108	0.278	0	0.000	-0.102	0.0565
109	2.489	0	0.000	-0.909	0.0000
110	0.599	0	0.000	-0.219	0.0009
111	1.400	0	0.000	-0.510	0.0000
112	0.596	0	0.000	-0.218	0.0012
113	1.757	0	0.000	-0.641	0.0000
114	2.198	0.089	0.041	-0.770	0.0000
115	3.999	0	0.000	-1.456	0.0000

116	0.278	0	0.000	-0.102	0.0576
118	1.019	0	0.000	-0.372	0.0010
119	0.517	0	0.000	-0.189	0.0193
120	1.721	0	0.000	-0.628	0.0000
121	1.244	0	0.000	-0.454	0.0001
123	2.008	0	0.000	-0.733	0.0000
124	1.753	0	0.000	-0.640	0.0000
125	2.075	0	0.000	-0.757	0.0000
126	2.792	0	0.000	-1.019	0.0000
127	0.865	0	0.000	-0.316	0.0002
128	0.315	0	0.000	-0.115	0.0195
130	0.609	0	0.000	-0.222	0.0088
131	1.753	0	0.000	-0.640	0.0000
133	1.767	0	0.000	-0.645	0.0000
134	2.451	0	0.000	-0.894	0.0000
135	1.381	0	0.000	-0.504	0.0000
136	3.195	0	0.000	-1.166	0.0000
137	0.683	0	0.000	-0.249	0.0040
138	0.458	0	0.000	-0.167	0.0011
139	0.570	0	0.000	-0.208	0.0070
140	0.663	0	0.000	-0.242	0.0013
141	1.201	0	0.000	-0.438	0.0000
142	2.900	0	0.000	-1.058	0.0000
143	1.030	0	0.000	-0.376	0.0000
144	2.158	0	0.000	-0.788	0.0095
146	0.868	0	0.000	-0.317	0.0004
148	2.217	0	0.000	-0.809	0.0000
149	3.268	0	0.000	-1.193	0.0000
150	0.742	0.208	0.280	-0.195	0.0430
151	3.152	0.168	0.053	-1.090	0.0000
152	0.318	0	0.000	-0.116	0.0446
153	0.701	0.181	0.259	-0.190	0.0740
154	0.347	0	0.000	-0.127	0.0118
155	1.037	0	0.000	-0.378	0.0010
156	0.765	0	0.000	-0.279	0.0002
157	1.131	0	0.000	-0.413	0.0000
158	2.975	0	0.000	-1.086	0.0000
160	0.672	0	0.000	-0.245	0.0009
161	0.792	0	0.000	-0.290	0.0040
162	1.181	0	0.000	-0.431	0.0007
163	0.668	0	0.000	-0.244	0.0001
164	5.759	0	0.000	-2.102	0.0000
165	2.475	0	0.000	-0.903	0.0000
166	1.466	0	0.000	-0.535	0.0000
167	0.587	0	0.000	-0.214	0.0067
168	1.162	0	0.000	-0.424	0.0002
169	2.558	0	0.000	-0.934	0.0000
170	2.824	0.500	0.177	-0.850	0.0001
171	0.326	0	0.000	-0.120	0.0247
172	0.284	0	0.000	-0.103	0.0101
173	0.343	0	0.000	-0.125	0.0680
174	0.862	0.054	0.062	-0.295	0.0002

176	0.817	0.075	0.092	-0.271	0.0092
177	1.344	0	0.000	-0.490	0.0000
178	2.783	0	0.000	-101.595	0.0000
181	1.084	0	0.000	-0.396	0.0000
183	1.690	0	0.000	-0.617	0.0000
184	1.760	0.044	0.025	-0.627	0.0000
185	1.972	0	0.000	-0.720	0.0000
186	2.913	0	0.000	-106.341	0.0000
187	1.622	0	0.000	-0.592	0.0000
188	1.063	0	0.000	-0.390	0.0000
189	2.539	0.107	0.042	-0.890	0.0000

Tabla 9. *Análisis FEL para la región NS5B. Codones bajo selección negativa*

Codon	Polimerasa NS5B				
	<i>dS</i>	<i>dN</i>	<i>dN/dS</i>	<i>dN-dS</i> (normalizada)	<i>p-value</i>
1	9.974	0	0.000	-556.139	0.0000
3	1.820	0.092	0.051	-0.963	0.0006
4	4.021	0.106	0.026	-21.829	0.0000
5	1.055	0	0.000	-0.590	0.0007
7	1.744	0	0.000	-0.973	0.0000
8	0.821	0	0.000	-0.457	0.0072
9	1.121	0	0.000	-0.625	0.0013
10	1.653	0	0.000	-0.922	0.0002
11	1.164	0.090	0.075	-0.600	0.0084
12	4.261	0	0.000	-2.376	0.0000
13	1.027	0	0.000	-0.572	0.0010
14	0.293	0	0.000	-0.163	0.0972
15	1.306	0	0.000	-0.728	0.0001
16	1.029	0	0.000	-0.574	0.0031
17	2.738	0	0.000	-1.527	0.0000
18	3.716	0	0.000	-2.072	0.0000
20	3.317	0.213	0.064	-1.730	0.0002
21	1.652	0	0.000	-0.921	0.0002
22	1.503	0	0.000	-0.840	0.0002
23	1.208	0	0.000	-0.674	0.0006
24	2.373	0	0.000	-1.323	0.0000
25	1.348	0.103	0.077	-0.694	0.0085
26	2.668	0	0.000	-1.488	0.0000
28	2.033	0	0.000	-1.133	0.0000
29	2.753	0	0.000	-1.535	0.0000
30	1.523	0	0.000	-0.849	0.0002
31	1.781	0	0.000	-0.993	0.0001
32	2.178	0	0.000	-1.215	0.0000
33	2.121	0.230	0.108	-1.055	0.0040
34	2.771	0.223	0.081	-1.420	0.0000
35	5.324	0	0.000	-2.969	0.0000
37	10.027	0.404	0.040	-5.365	0.0000
38	3.964	0	0.000	-2.210	0.0000
39	3.568	0.205	0.058	-1.875	0.0000

41	0.408	0	0.000	-0.228	0.0311
44	2.604	0	0.000	-1.452	0.0000
45	1.991	0	0.000	-1.110	0.0000
46	2.394	0.198	0.083	-1.224	0.0007
47	14.931	0.387	0.026	-8.109	0.0000
50	2.798	0	0.000	-1.560	0.0000
51	1.216	0	0.000	-0.680	0.0023
52	0.822	0	0.000	-0.460	0.0050
53	3.368	0	0.000	-1.878	0.0000
54	0.451	0	0.000	-0.251	0.0131
56	0.454	0	0.000	-0.253	0.0300
58	1.368	0	0.000	-0.763	0.0027
61	4.333	0	0.000	-2.416	0.0000
62	1.669	0.114	0.068	-0.870	0.0038
63	5.302	0	0.000	-2.956	0.0000
67	1.003	0	0.000	-0.560	0.0030
68	3.019	0	0.000	-1.683	0.0000
75	0.322	0	0.000	-0.180	0.0920
76	0.524	0	0.000	-0.292	0.0206
78	1.023	0	0.000	-0.570	0.0004
80	0.840	0	0.000	-0.468	0.0014
81	2.182	0.750	0.343	-0.800	0.0471
82	1.376	0	0.000	-0.767	0.0000
83	0.582	0	0.000	-0.325	0.0181
84	7.008	0.184	0.026	-3.804	0.0000
86	2.614	0	0.000	-1.458	0.0000
87	1.304	0.112	0.086	-0.664	0.0075
89	7.431	0	0.000	-4.143	0.0000
90	3.403	0.438	0.129	-1.653	0.0015
92	2.431	0	0.000	-1.355	0.0000
94	0.847	0.101	0.119	-0.416	0.0295
95	2.216	0	0.000	-1.236	0.0000
96	5.978	0	0.000	-3.333	0.0000
99	4.972	0	0.000	-2.772	0.0000
100	2.157	0.103	0.048	-1.145	0.0001
103	0.920	0	0.000	-0.513	0.0011
105	1.652	0	0.000	-0.921	0.0000
106	0.385	0	0.000	-0.215	0.0806
107	0.603	0	0.000	-0.336	0.0238
109	0.588	0	0.000	-0.328	0.0254
111	0.463	0	0.000	-0.258	0.0347
114	1.670	0.106	0.064	-0.872	0.0048
115	0.533	0	0.000	-0.297	0.0242
116	2.500	1.181	0.473	-0.735	0.0737
128	0.494	0	0.000	-0.275	0.0312
129	0.601	0	0.000	-0.335	0.0240
131	6.125	1.867	0.305	-2.374	0.0136
133	0.621	0	0.000	-0.346	0.0100
134	0.422	0	0.000	-0.235	0.0165
135	7.933	0.230	0.029	-4.295	0.0000
136	2.207	0	0.000	-1.230	0.0000
140	0.832	0	0.000	-0.464	0.0030

141	2.038	0	0.000	-1.137	0.0000
142	1.675	0.101	0.060	-0.880	0.0003
144	1.395	0	0.000	-0.778	0.0000
145	0.292	0	0.000	-0.163	0.0846
146	6.607	0	0.000	-3.684	0.0000
147	1.519	0.198	0.130	-0.737	0.0111
149	1.530	0	0.000	-0.853	0.0000
150	3.977	0	0.000	-2.218	0.0000
151	3.908	0.103	0.026	-2.122	0.0000
152	0.404	0	0.000	-0.225	0.0452
153	1.396	0	0.000	-0.778	0.0005
154	2.361	0.112	0.048	-1.254	0.0002
155	1.211	0	0.000	-0.675	0.0023
156	4.722	0.101	0.021	-2.577	0.0000
159	2.109	0.708	0.336	-0.781	0.0248
161	6.312	0	0.000	-3.519	0.0000
163	0.850	0	0.000	-0.474	0.0027
164	6.349	0	0.000	-3.540	0.0000
165	0.874	0	0.000	-0.487	0.0046
166	3.000	0	0.000	-1.673	0.0000
167	1.452	0	0.000	-0.810	0.0000
168	1.068	0	0.000	-0.596	0.0006
169	4.693	0	0.000	-2.617	0.0000
171	0.386	0	0.000	-0.215	0.0878
172	2.147	0	0.000	-1.197	0.0000
174	2.394	0	0.000	-1.335	0.0000
175	0.852	0	0.000	-0.475	0.0011
176	5.433	0	0.000	-3.029	0.0000
177	5.567	0	0.000	-3.104	0.0000
178	1.648	0.221	0.134	-0.796	0.0232
179	0.540	0	0.000	-0.301	0.0222
180	0.526	0	0.000	-0.293	0.0205
181	2.532	0.712	0.281	-1.015	0.0239
182	1.426	0	0.000	-0.795	0.0000
184	2.696	0.390	0.144	-1.286	0.0119
186	0.323	0	0.000	-0.180	0.0883
188	0.808	0	0.000	-0.451	0.0074
191	1.272	0	0.000	-0.709	0.0010
192	1.067	0	0.000	-0.595	0.0013
193	2.531	0	0.000	-1.411	0.0000
194	4.500	0	0.000	-2.509	0.0000
195	0.606	0	0.000	-0.338	0.0207
196	0.446	0	0.000	-0.248	0.0160
197	0.606	0	0.000	-0.338	0.0070
198	4.236	1.279	0.302	-1.649	0.0053
201	1.445	0	0.000	-0.806	0.0003
202	5.312	0	0.000	-2.962	0.0000
205	1.777	0	0.000	-0.991	0.0001
206	1.388	0.100	0.073	-0.718	0.0012
209	1.287	0.103	0.080	-0.660	0.0057
210	0.833	0.195	0.234	-0.356	0.0837
212	2.768	0	0.000	-1.543	0.0000

214	2.841	0	0.000	-1.584	0.0000
216	2.204	0	0.000	-1.229	0.0000
217	7.718	0	0.000	-4.303	0.0000
218	2.263	0.999	0.441	-0.705	0.0892
222	0.820	0	0.000	-0.457	0.0069
223	2.050	0	0.000	-1.143	0.0000
224	1.137	0	0.000	-0.634	0.0001
225	1.265	0	0.000	-0.705	0.0013
227	6.158	0	0.000	-3.434	0.0000
228	0.578	0	0.000	-0.322	0.0197
229	0.409	0	0.000	-0.228	0.0200
230	0.789	0	0.000	-0.440	0.0155
232	4.470	0	0.000	-2.493	0.0000
234	0.265	0	0.000	-0.148	0.0771
237	0.383	0	0.000	-0.213	0.0886
238	0.828	0	0.000	-0.461	0.0025
239	2.265	0.088	0.039	-1.214	0.0000
241	0.491	0	0.000	-0.274	0.0657
245	1.514	0	0.000	-0.844	0.0002
247	1.392	0	0.000	-0.776	0.0003
248	1.014	0	0.000	-0.566	0.0022
249	0.516	0	0.000	-0.288	0.0255
250	3.028	0.101	0.033	-1.632	0.0000
252	2.108	0.769	0.365	-0.746	0.0369
256	0.818	0	0.000	-0.456	0.0049
257	2.017	0	0.000	-1.125	0.0000
258	0.787	0	0.000	-0.439	0.0156
259	0.593	0	0.000	-0.330	0.0250
260	0.266	0	0.000	-0.148	0.0629
261	2.090	0	0.000	-1.165	0.0000
264	3.875	0	0.000	-2.161	0.0000
265	1.736	0	0.000	-0.968	0.0001
267	2.939	0.283	0.096	-1.481	0.0000
268	0.760	0	0.000	-0.424	0.0025
269	0.403	0	0.000	-0.225	0.0335
270	1.080	0.103	0.095	-0.545	0.0154
272	1.803	0	0.000	-1.005	0.0022
275	3.155	0	0.000	-1.760	0.0000
276	0.636	0	0.000	-0.355	0.0068
277	1.123	0	0.000	-0.626	0.0017
278	1.929	0	0.000	-1.075	0.0000
280	0.815	0	0.000	-0.454	0.0070
281	9.756	0	0.000	-5.440	0.0000
282	0.942	0	0.000	-0.525	0.0036
283	3.505	0	0.000	-1.954	0.0000
284	4.043	0	0.000	-2.254	0.0000
287	3.985	0	0.000	-2.222	0.0000
289	1.269	0	0.000	-0.708	0.0008
290	0.686	0	0.000	-0.382	0.0051
291	0.835	0	0.000	-0.465	0.0018
293	2.122	0	0.000	-1.183	0.0000
295	1.410	0	0.000	-0.786	0.0000

296	0.599	0	0.000	-0.334	0.0211
297	0.867	0	0.000	-0.483	0.0047
298	4.685	0	0.000	-2.612	0.0000
301	3.005	0	0.000	-1.676	0.0000
305	0.267	0	0.000	-0.149	0.0680
306	5.371	0	0.000	-2.995	0.0000
312	6.138	0	0.000	-3.423	0.0000
314	0.805	0	0.000	-0.449	0.0051
315	0.655	0	0.000	-0.365	0.0157
316	2.051	0.408	0.199	-0.916	0.0170
317	3.642	0	0.000	-2.031	0.0000
318	0.605	0	0.000	-0.337	0.0238
320	1.341	0	0.000	-0.748	0.0000
322	0.698	0	0.000	-0.389	0.0031
325	2.244	0	0.000	-1.251	0.0000
326	2.033	0	0.000	-1.133	0.0000
328	1.556	0	0.000	-0.867	0.0001
329	0.528	0	0.000	-0.294	0.0208
330	4.005	0	0.000	-2.233	0.0000
332	6.814	0	0.000	-3.799	0.0000
334	3.443	0	0.000	-1.920	0.0000
341	0.383	0	0.000	-0.214	0.0885
342	0.421	0	0.000	-0.234	0.0232
346	1.341	0	0.000	-0.748	0.0008
347	0.589	0	0.000	-0.328	0.0056
348	1.369	0	0.000	-0.763	0.0004
350	2.901	0	0.000	-1.617	0.0000
351	0.655	0	0.000	-0.365	0.0203
352	0.935	0	0.000	-0.521	0.0054
354	2.752	0	0.000	-1.534	0.0000
357	1.008	0.227	0.226	-0.435	0.0772
360	0.873	0.149	0.171	-0.403	0.0536
361	0.384	0	0.000	-0.214	0.0882
362	5.545	0	0.000	-3.092	0.0000
366	0.293	0	0.000	-0.163	0.0971
367	0.533	0	0.000	-0.297	0.0200
369	5.725	0	0.000	-3.192	0.0000
371	2.179	0	0.000	-1.215	0.0000
373	2.160	0	0.000	-1.204	0.0000
375	1.233	0	0.000	-0.687	0.0003
377	2.118	0.482	0.228	-0.912	0.0039
379	0.798	0	0.000	-0.445	0.0057
380	4.259	0	0.000	-2.375	0.0000
381	3.443	0	0.000	-1.920	0.0000
382	0.916	0	0.000	-0.511	0.0047
383	2.415	0	0.000	-1.346	0.0000
385	1.107	0	0.000	-0.617	0.0010
386	0.749	0	0.000	-0.417	0.0038
387	2.131	0.114	0.054	-1.125	0.0009
390	1.104	0	0.000	-0.616	0.0010
391	1.395	0	0.000	-0.778	0.0003
392	1.536	0.097	0.063	-0.803	0.0004

393	1.364	0.103	0.075	-0.703	0.0080
394	1.553	0	0.000	-0.866	0.0004
395	0.408	0	0.000	-0.227	0.0246
398	2.129	0	0.000	-1.187	0.0001
400	0.554	0	0.000	-0.309	0.0091
405	2.910	0.197	0.068	-1.512	0.0000
407	0.522	0	0.000	-0.291	0.0207
409	0.461	0	0.000	-0.257	0.0350
412	1.833	0	0.000	-1.022	0.0000
413	4.266	0	0.000	-2.380	0.0000
416	0.667	0	0.000	-0.372	0.0164
417	2.762	0	0.000	-1.540	0.0000
418	4.211	0.187	0.045	-2.243	0.0000
419	4.400	0.150	0.034	-2.371	0.0000
421	2.209	0.420	0.190	-0.998	0.0041
427	1.983	0.093	0.047	-1.054	0.0000
428	8.692	0	0.000	-4.847	0.0000
429	0.938	0	0.000	-0.523	0.0026
430	1.670	0	0.000	-0.931	0.0001
433	1.770	0	0.000	-0.986	0.0000
435	1.833	0.313	0.171	-0.847	0.0126
437	1.225	0	0.000	-0.683	0.0029
438	0.489	0	0.000	-0.273	0.0660
441	1.972	0.207	0.105	-0.984	0.0017
443	0.961	0	0.000	-0.536	0.0025
444	1.137	0.112	0.099	-0.571	0.0067
445	1.163	0.199	0.172	-0.537	0.0150
446	2.732	0.595	0.218	-1.192	0.0311
447	0.275	0	0.000	-0.153	0.0924
448	3.668	0.107	0.029	-1.986	0.0000
450	5.558	0	0.000	-3.100	0.0000
455	3.140	0	0.000	-1.751	0.0000
457	0.267	0	0.000	-0.149	0.0630
461	1.301	0	0.000	-0.725	0.0086
464	10.422	0.991	0.095	-5.260	0.0000
468	0.838	0	0.000	-0.467	0.0020
471	1.377	0	0.000	-0.768	0.0002
472	0.290	0	0.000	-0.162	0.0448
475	1.436	0	0.000	-0.801	0.0001
479	4.417	0	0.000	-2.463	0.0000
481	2.824	0	0.000	-1.575	0.0000
483	0.440	0	0.000	-0.245	0.0203
490	2.700	0	0.000	-1.504	0.0000
491	0.492	0	0.000	-0.274	0.0271
495	2.346	0	0.000	-1.308	0.0000
502	1.900	0	0.000	-1.058	0.0000
505	0.455	0	0.000	-0.254	0.0298
506	1.060	0.097	0.091	-0.537	0.0061
511	1.224	0	0.000	-0.683	0.0007
516	2.065	0	0.000	-1.151	0.0000
518	4.627	0	0.000	-2.580	0.0000
519	0.537	0	0.000	-0.299	0.0240

521	0.768	0	0.000	-0.428	0.0022
522	0.799	0	0.000	-0.444	0.0077
523	5.010	0.653	0.130	-2.430	0.0002
525	1.114	0	0.000	-0.621	0.0011
526	0.293	0	0.000	-0.163	0.0844
527	0.933	0	0.000	-0.520	0.0041
529	2.745	0	0.000	-1.531	0.0000
530	0.618	0.098	0.159	-0.290	0.0815
533	1.256	0	0.000	-0.701	0.0021
534	3.504	0	0.000	-1.954	0.0000
535	0.743	0.102	0.138	-0.357	0.0607
539	11.01	0	0.000	-6.139	0.0000
540	0.655	0	0.000	-0.365	0.0164
541	2.052	0.322	0.157	-0.964	0.0014
542	2.158	0	0.000	-1.203	0.0000
545	5.247	0.151	0.029	-2.841	0.0000
546	0.602	0	0.000	-0.336	0.0239
548	1.146	0	0.000	-0.639	0.0008
551	2.510	0	0.000	-1.400	0.0000
552	1.683	0.099	0.059	-0.883	0.0002
553	0.686	0	0.000	-0.382	0.0037
554	1.351	0	0.000	-0.753	0.0001
560	1.150	0	0.000	-0.641	0.0155
568	2.871	0	0.000	-1.601	0.0000
572	1.626	0.171	0.105	-0.811	0.0054
579	0.836	0	0.000	-0.466	0.0011
580	2.672	0	0.000	-1.490	0.0000
581	0.425	0	0.000	-0.237	0.0321
587	45.942	0	0.000	-25.616	0.0000
591	3.504	0	0.000	-1.954	0.0000

ANEXO XXI

CAPS: Co-Evolution Analysis using Protein Sequences

Author: Mario A. Fares

Code for Inter-protein co-evolution clustering: David McNally

Evolutionary Genetics and Bioinformatics Laboratory

Department of Genetics

Smurfit Institute of Genetics

University of Dublin, Trinity College

Mathematical Model: Fares and Travers, Genetics (2006)173: 9 - 23

Tabla 10. **Secuencia de Aminoácidos proteasa NS3 (Intra-molecular)**

INTRA-MOLECULAR CO-EVOLUTION ANALYSIS

Posición AA1	Posición AA2	Mean D	Mean D2	Correlación	Atom distance
7(7)	56(56)	83.2100	152.1344	0.2225	19.7859
7(7)	86(86)	83.2100	290.7823	0.3040	9999.0000
7(7)	89(89)	83.2100	376.4088	0.2484	9999.0000
7(7)	147(147)	83.2100	340.9753	0.5680	9999.0000
56(56)	86(86)	152.1344	290.7823	0.1507	9999.0000
56(56)	89(89)	152.1344	376.4088	0.1224	9999.0000
56(56)	117(117)	152.1344	72.5147	0.6497	9999.0000
86(86)	87(87)	290.7823	43.3786	0.2907	9999.0000
86(86)	147(147)	290.7823	340.9753	0.4450	9999.0000

Groups of Co-evolving amino acids (NS3):

G1: 7(7) 56(56) 86(86)

G2: 7(7) 56(56) 89(89)

G3: 7(7) 86(86) 147(147)

G4: 56(56) 117(117)

G5: 86(86) 87(87)

Tabla 11. **Secuencia de Aminoácidos NS5B (Intra-molecular)**

INTRA-MOLECULAR CO-EVOLUTION ANALYSIS

Mean random distance = 27.8530 (SE = 15.0604)

Posición AA1	Posición AA2	Mean D1	Mean D2	Correlación	Atom distance
57(57)	90(90)	0.2039	0.1917	0.5328	9999.0000
57(57)	113(113)	0.2039	0.5212	0.4472	9999.0000
57(57)	124(124)	0.2039	0.5128	0.1426	9999.0000
57(57)	184(184)	0.2039	0.1739	0.4330	9999.0000
81(81)	110(110)	0.3462	0.8690	0.1595	9999.0000
81(81)	131(131)	0.3462	0.8667	0.1825	9999.0000
81(81)	181(181)	0.3462	0.9600	0.2207	9999.0000
81(81)	300(300)	0.3462	0.6462	0.1863	9999.0000
90(90)	113(113)	0.1917	0.5212	0.1949	9999.0000
90(90)	184(184)	0.1917	0.1739	0.2285	9999.0000
90(90)	426(426)	0.1917	0.2817	0.2287	9999.0000
90(90)	541(541)	0.1917	0.1718	0.2912	9999.0000
110(110)	117(117)	0.8690	1.2277	0.1077	9999.0000
110(110)	181(181)	0.8690	0.9600	0.1821	9999.0000
110(110)	198(198)	0.8690	1.6960	0.1007	9999.0000
110(110)	300(300)	0.8690	0.6462	0.2840	9999.0000
110(110)	377(377)	0.8690	0.2446	0.2689	9999.0000
110(110)	520(520)	0.8690	1.0207	0.1224	9999.0000

Tabla 11 (continuación).

110(110)	549(549)	0.8690	1.4166	0.1207	9999.0000
110(110)	566(566)	0.8690	0.9837	0.1928	9999.0000
113(113)	181(181)	0.5212	0.9600	0.2175	9999.0000
113(113)	184(184)	0.5212	0.1739	0.4295	9999.0000
113(113)	267(267)	0.5212	0.3943	0.1260	9999.0000
113(113)	310(310)	0.5212	0.3425	0.1888	9999.0000
113(113)	377(377)	0.5212	0.2446	0.2045	9999.0000
113(113)	541(541)	0.5212	0.1718	0.4316	9999.0000
116(116)	117(117)	0.1271	1.2277	0.3435	9999.0000
116(116)	120(120)	0.1271	1.4874	0.2009	9999.0000
116(116)	300(300)	0.1271	0.6462	0.1518	9999.0000
117(117)	120(120)	1.2277	1.4874	0.1202	9999.0000
117(117)	124(124)	1.2277	0.5128	0.2879	9999.0000
117(117)	198(198)	1.2277	1.6960	0.1419	9999.0000
117(117)	267(267)	1.2277	0.3943	0.1336	9999.0000
117(117)	300(300)	1.2277	0.6462	0.2466	9999.0000
117(117)	566(566)	1.2277	0.9837	0.2323	9999.0000
120(120)	131(131)	1.4874	0.8667	0.1407	9999.0000
120(120)	181(181)	1.4874	0.9600	0.1258	9999.0000
120(120)	235(235)	1.4874	0.0892	0.1392	9999.0000
120(120)	300(300)	1.4874	0.6462	0.3439	9999.0000
124(124)	198(198)	0.5128	1.6960	0.1452	9999.0000
124(124)	213(213)	0.5128	4.1048	0.1555	9999.0000
124(124)	300(300)	0.5128	0.6462	0.1808	9999.0000
124(124)	441(441)	0.5128	0.1078	0.1546	9999.0000
124(124)	446(446)	0.5128	0.1962	0.2358	9999.0000
124(124)	451(451)	0.5128	4.2342	0.3661	9999.0000
124(124)	566(566)	0.5128	0.9837	0.2286	9999.0000
130(130)	333(333)	0.4107	0.2758	0.5136	9999.0000
131(131)	181(181)	0.8667	0.9600	0.2480	9999.0000
131(131)	235(235)	0.8667	0.0892	0.6359	9999.0000
131(131)	377(377)	0.8667	0.2446	0.1031	9999.0000
131(131)	451(451)	0.8667	4.2342	0.1233	9999.0000
181(181)	235(235)	0.9600	0.0892	0.2295	9999.0000
181(181)	310(310)	0.9600	0.3425	0.1015	9999.0000
181(181)	377(377)	0.9600	0.2446	0.3341	9999.0000
181(181)	543(543)	0.9600	0.3737	0.2554	9999.0000
198(198)	300(300)	1.6960	0.6462	0.2150	9999.0000
198(198)	355(355)	1.6960	0.3790	0.3141	9999.0000
198(198)	441(441)	1.6960	0.1078	0.4798	9999.0000
213(213)	300(300)	4.1048	0.6462	0.2076	9999.0000
213(213)	441(441)	4.1048	0.1078	0.1382	9999.0000
213(213)	549(549)	4.1048	1.4166	0.3216	9999.0000
300(300)	451(451)	0.6462	4.2342	0.1159	9999.0000
300(300)	520(520)	0.6462	1.0207	0.2642	9999.0000
355(355)	441(441)	0.3790	0.1078	0.5383	9999.0000
355(355)	566(566)	0.3790	0.9837	0.2181	9999.0000
451(451)	541(541)	4.2342	0.1718	0.2145	9999.0000
520(520)	566(566)	1.0207	0.9837	0.1895	9999.0000
566(566)	567(567)	0.9837	0.1536	0.1265	9999.0000

Groups of Co-evolving amino acids (NS5B):

G1: 57(57) 90(90) 113(113) 184(184)

G2: 57(57) 124(124)

G3: 81(81) 110(110) 300(300)

G4: 81(81) 131(131) 181(181)

G5: 90(90) 426(426)

G6: 90(90) 113(113) 541(541)

G7: 110(110) 117(117) 198(198) 300(300)

G8: 110(110) 181(181) 377(377)

G9: 110(110) 520(520) 566(566)

G10: 110(110) 549(549)

G11: 113(113) 181(181) 310(310)

G12: 113(113) 267(267)
 G13: 113(113) 377(377)
 G14: 116(116) 117(117) 120(120) 300(300)
 G15: 117(117) 124(124) 198(198)
 G16: 117(117) 267(267)
 G17: 117(117) 124(124) 566(566)
 G18: 120(120) 131(131) 181(181) 235(235)
 G19: 124(124) 213(213) 300(300)
 G20: 124(124) 213(213) 441(441)
 G21: 124(124) 446(446)
 G22: 124(124) 300(300) 451(451)
 G23: 130(130) 333(333)
 G24: 131(131) 377(377)
 G25: 131(131) 451(451)
 G26: 181(181) 543(543)
 G27: 198(198) 355(355) 441(441)
 G28: 213(213) 549(549)
 G29: 300(300) 520(520)
 G30: 355(355) 566(566)
 G31: 451(451) 541(541)
 G32: 566(566) 567(567)

Tabla 12. **Secuencia de Aminoácidos proteasa NS3 vs NS5B (Inter-molecular)**

INTER-MOLECULAR CO-EVOLUTION ANALYSIS

Posición AA1	Posición AA2	Mean D1	Mean D2	Correlación
-----	-----	-----	-----	-----
4(4)	117(117)	31.8640	1.2277	0.1890
4(4)	181(181)	31.8640	0.9600	-0.0952
4(4)	267(267)	31.8640	0.3943	0.7030
4(4)	117(117)	31.8640	64.1534	0.1890
4(4)	181(181)	31.8640	0.0000	-0.0952
7(7)	81(81)	75.8280	0.3462	0.1120
7(7)	116(116)	75.8280	0.1271	0.1323
7(7)	181(181)	75.8280	0.9600	0.2562
7(7)	267(267)	75.8280	0.3943	-0.1493
7(7)	327(327)	75.8280	0.1756	-0.1619
7(7)	333(333)	75.8280	0.2758	-0.1436
7(7)	355(355)	75.8280	0.3790	0.1871
7(7)	441(441)	75.8280	0.1078	-0.1074
7(7)	446(446)	75.8280	0.1962	-0.1001
7(7)	451(451)	75.8280	4.2342	-0.1742
13(13)	113(113)	30.8012	0.5212	-0.0944
13(13)	117(117)	30.8012	1.2277	-0.0988
13(13)	181(181)	30.8012	0.9600	-0.1215
13(13)	198(198)	30.8012	1.6960	-0.1009
13(13)	213(213)	30.8012	4.1048	0.1463
13(13)	300(300)	30.8012	0.6462	-0.1349
13(13)	327(327)	30.8012	0.1756	0.6819
13(13)	418(418)	30.8012	0.2760	0.3810
13(13)	441(441)	30.8012	0.1078	0.3493
49(49)	113(113)	57.8533	0.5212	0.1768
49(49)	300(300)	57.8533	0.6462	-0.1286
49(49)	327(327)	57.8533	0.1756	0.3677
49(49)	418(418)	57.8533	0.2760	0.2049
49(49)	441(441)	57.8533	0.1078	0.1807
49(49)	451(451)	57.8533	4.2342	-0.0994
49(49)	543(543)	57.8533	0.3737	0.5299
49(49)	556(556)	57.8533	0.5384	0.1647

Tabla 12 (continuación).

56(56)	113(113)	134.6058	0.5212	-0.1406
56(56)	300(300)	134.6058	0.6462	0.1778
56(56)	333(333)	134.6058	0.2758	-0.1123
56(56)	451(451)	134.6058	4.2342	0.1880
56(56)	520(520)	134.6058	1.0207	0.3121
56(56)	541(541)	134.6058	0.1718	-0.0988
61(61)	117(117)	89.5323	1.2277	0.1411
61(61)	130(130)	89.5323	0.4107	-0.0972
61(61)	131(131)	89.5323	0.8667	-0.0976
61(61)	267(267)	89.5323	0.3943	0.7613
61(61)	327(327)	89.5323	0.1756	0.2528
61(61)	333(333)	89.5323	0.2758	-0.1247
61(61)	377(377)	89.5323	0.2446	0.3417
61(61)	418(418)	89.5323	0.2760	0.1953
61(61)	441(441)	89.5323	0.1078	0.2384
61(61)	520(520)	89.5323	1.0207	-0.1226
61(61)	541(541)	89.5323	0.1718	-0.1247
61(61)	549(549)	89.5323	1.4166	-0.1371
86(86)	110(110)	272.1653	0.8690	0.1076
86(86)	117(117)	272.1653	1.2277	0.2342
86(86)	124(124)	272.1653	0.5128	0.1657
86(86)	131(131)	272.1653	0.8667	-0.1060
86(86)	267(267)	272.1653	0.3943	-0.1261
86(86)	300(300)	272.1653	0.6462	0.1459
86(86)	327(327)	272.1653	0.1756	0.1121
86(86)	333(333)	272.1653	0.2758	-0.1233
86(86)	418(418)	272.1653	0.2760	0.1042
86(86)	451(451)	272.1653	4.2342	-0.1296
86(86)	541(541)	272.1653	0.1718	-0.1172
87(87)	46(46)	39.0648	0.0914	0.1549
87(87)	113(113)	39.0648	0.5212	0.1779
87(87)	130(130)	39.0648	0.4107	0.2162
87(87)	181(181)	39.0648	0.9600	0.1205
87(87)	46(46)	39.0648	32.4547	0.1549
87(87)	113(113)	39.0648	0.0000	0.1779
87(87)	130(130)	39.0648	0.0000	0.2162
89(89)	110(110)	327.5449	0.8690	0.1968
89(89)	300(300)	327.5449	0.6462	0.1516
89(89)	310(310)	327.5449	0.3425	0.1297
89(89)	543(543)	327.5449	0.3737	0.1252
89(89)	556(556)	327.5449	0.5384	0.1426
89(89)	110(110)	327.5449	0.0000	0.1968
89(89)	300(300)	327.5449		0.1516
89(89)	310(310)	327.5449		0.1297
89(89)	543(543)	327.5449		0.1252
94(94)	57(57)	10.3632	0.2039	0.6510
94(94)	90(90)	10.3632	0.1917	0.5055
94(94)	110(110)	10.3632	0.8690	-0.1127
94(94)	113(113)	10.3632	0.5212	0.2503
94(94)	117(117)	10.3632	1.2277	-0.1160
94(94)	131(131)	10.3632	0.8667	0.1810
94(94)	181(181)	10.3632	0.9600	-0.1550
94(94)	184(184)	10.3632	0.1739	0.2934
94(94)	198(198)	10.3632	1.6960	-0.1154
94(94)	213(213)	10.3632	4.1048	-0.1311
94(94)	300(300)	10.3632	0.6462	-0.1301
94(94)	541(541)	10.3632	0.1718	0.5424
94(94)	549(549)	10.3632	1.4166	-0.1112
94(94)	556(556)	10.3632	0.5384	-0.1098
117(117)	300(300)	64.1534	0.6462	0.1567
117(117)	426(426)	64.1534	0.2817	0.1370
117(117)	451(451)	64.1534	4.2342	0.1525
117(117)	520(520)	64.1534	1.0207	0.4961
117(117)	556(556)	64.1534	0.5384	0.1841
117(117)	300(300)	64.1534		0.1567
117(117)	426(426)	64.1534		0.1370
117(117)	451(451)	64.1534		0.1525
117(117)	520(520)	64.1534		0.4961
122(122)	46(46)	52.5666	0.0914	0.1220
122(122)	110(110)	52.5666	0.8690	0.2276

Tabla 12 (continuación).

122(122)	213(213)	52.5666	4.1048	0.1477
122(122)	310(310)	52.5666	0.3425	0.1023
122(122)	377(377)	52.5666	0.2446	0.1145
122(122)	426(426)	52.5666	0.2817	0.1780
122(122)	549(549)	52.5666	1.4166	0.3656
147(147)	110(110)	314.8267	0.8690	0.1789
147(147)	113(113)	314.8267	0.5212	-0.0953
147(147)	116(116)	314.8267	0.1271	0.2138
147(147)	117(117)	314.8267	1.2277	0.2031
147(147)	198(198)	314.8267	1.6960	0.1194
147(147)	267(267)	314.8267	0.3943	-0.1137
147(147)	300(300)	314.8267	0.6462	0.2567
147(147)	327(327)	314.8267	0.1756	-0.1078
147(147)	333(333)	314.8267	0.2758	-0.1076
147(147)	418(418)	314.8267	0.2760	0.1465
147(147)	426(426)	314.8267	0.2817	0.1577
147(147)	446(446)	314.8267	0.1962	-0.1080
147(147)	451(451)	314.8267	4.2342	-0.1811
147(147)	567(567)	314.8267	0.1536	0.1044
147(147)	572(572)	314.8267	0.1730	0.1227
170(170)	113(113)	19.8714	0.5212	-0.0979
170(170)	181(181)	19.8714	0.9600	-0.0988
170(170)	213(213)	19.8714	4.1048	0.1688
170(170)	327(327)	19.8714	0.1756	0.6755
170(170)	418(418)	19.8714	0.2760	0.4124
170(170)	441(441)	19.8714	0.1078	0.3452
170(170)	451(451)	19.8714	4.2342	-0.1087

Groups of inter-molecular Co-evolving amino acids (NS3_ NS5B):

89(89) [110(110) 543(543) 310(310)]
4(4) [181(181) 117(117)]
87(87) [130(130) 46(46) 113(113)]
89(89) 117(117) [300(300)]
117(117) [451(451) 426(426)]