

# CARACTERIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA RECURRENCIA POSTRASPLANTE

Presentada por: Lic. Marcela Viaut Piedrabuena

Director: Dr. Diego Flichman

Lugar: Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,  
Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires 2015

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL.....	1
1.2. EVOLUCIÓN.....	5
1.2. TAXONOMÍA .....	5
1.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	6
1.4. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR HCV .....	8
1.5. HISTORIA NATURAL DE LA COINFECCIÓN HCV Y HIV .....	9
1.6. TRASPLANTE HEPÁTICO.....	10
1.7. TRASPLANTE HEPÁTICO EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR HIV .....	12
1.8. HISTORIA NATURAL DE LA RECURRENCIA DE LA HEPATITIS C POSTRASPLANTE HEPÁTICO .....	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA</b> .....	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>17</b>
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>5. PACIENTES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
5.1. PACIENTES.....	18
5.2. MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	19
5.3. MARCADORES SEROLÓGICOS.....	19
5.4. MARCADORES VIROLÓGICOS.....	20
5.5. AMPLIFICACIÓN DEL HCV-ARN .....	20
5.6. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN.....	21
5.7. GENOTIPIFICACIÓN.....	21
5.8. CLONADO.....	22
5.9. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	22
5.10. ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	22
5.11. DIVERSIDAD GENÉTICA.....	23
5.12. COMPLEJIDAD GENÉTICA.....	23

<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
6.1. GENOTIPIFICACIÓN.....	24
6.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN NS5B .....	25
6.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN E2 .....	27
6.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN CORE.....	30
6.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS DIFERENTES REGIONES VIRALES .....	33
6.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS CLONES.....	35
6.6.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN NS5B.....	36
6.6.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN E2 .....	36
6.7. DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS CLONES.....	37
6.8. COMPLEJIDAD GENÉTICA DE LOS CLONES.....	40
<b>7. DISCUSION .....</b>	<b>41</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>50</b>
<b>10. APENDICES .....</b>	<b>60</b>
10.1. PERFIL BIOQUÍMICO Y VIROLÓGICO DE LOS PACIENTES .....	60
10.2. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN NS5B.....	63
10.3. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN E2.....	74
10.4. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN CORE .....	84

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características epidemiológicas de los pacientes y temporalidad de las muestras analizadas respecto del trasplante.	18
Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de regiones correspondientes a las proteínas Core, E2 y NS5B.	21
Tabla 3. Análisis de sustituciones nucleotídicas en la región NS5B.	25
Tabla 4. Análisis de sustituciones nucleotídicas en la región E2.	27
Tabla 5. Análisis de sustituciones nucleotídicas en la Core.	31
Tabla 6. Clones de las regiones NS5B y E2 de pacientes infectados con el sg3a.	35
Tabla 7. Distancia genética entre los clones de cada muestra y región.	37
Tabla 8. Entropía normalizada de Shannon entre los clones de cada muestra y región.	40
Figura 1. Organización genómica y función de las proteínas del HCV.	2
Figura 2. Genotipos del HCV.	6
Figura 3. Seroprevalencia mundial del HCV.	7
Figura 4. Trasplantes hepáticos.	11
Figura 5. Esquema temporal de las muestras analizadas.	19
Figura 6. Genotipificación de los pacientes.	24
Figura 7. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región NS5B.	26
Figura 8. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región E2.	28
Figura 9. Cladogramas de la región E2.	29
Figura 10: Sustituciones nucleotídicas E2 en función del tiempo de seguimiento de cada paciente.	30
Figura 11. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región Core.	32
Figura 12: Análisis comparativo del número de sustituciones en cada paciente para cada región.	34
Figura 13: Análisis comparativo por región del total de sustituciones y la relación de sustituciones sinónimas y no sinónimas.	35
Figura 14. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región NS5B en los clones.	38
Figura 15. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región E2 en los clones.	39

## ABREVIATURAS

aa: Aminoácido

ALT: Alanino amino transferasa

HCC: Carcinoma hepatocelular

HCV: Virus de la Hepatitis C

HLA: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés: *Human Leucocyte Antigen*)

HVR: Región Hipervariable

KDa: Kilodalton

nm: Nanómetro

nt: Nucleótido

UTR: Región no codificante

SSCP: Polimorfismo de conformación de cadena simple

-

## 1. INTRODUCCIÓN

El virus de la Hepatitis C (HCV) ha sido, hasta su identificación y caracterización molecular a fines de la década de los años 80' [1], el principal agente causal de la hepatitis no-A no-B, ya sea por vía postransfusional o en modo esporádico [2].

La infección por HCV es considerada un problema de salud mundial; en la actualidad se estima que hay 150-180 millones de individuos infectados, lo cual corresponde al 2,05-2,47% de la población mundial [3,4], con una tasa anual de incidencia de 3-4 millones y 46.000 muertes en igual período [5,7]. La infección crónica por HCV causa una reacción inflamatoria persistente del parénquima hepático; la intensidad, localización y capacidad para progresar de estas lesiones, es variable. Por ello, el espectro histopatológico de la enfermedad es amplio y comprende desde alteraciones mínimas hasta cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC); siendo la infección por HCV la principal causa de trasplante hepático. No obstante, la recurrencia de la infección viral es prácticamente universal ya que sucede en la amplia mayoría de los pacientes.

### 1.1. Estructura y organización del genoma viral

El HCV es un virus pequeño, de 55-65 nm. Su genoma está compuesto por una única hebra de ARN de polaridad positiva de alrededor de 9.600 bases de longitud. En sus extremos 5' y 3' contiene regiones no codificantes que flanquean un marco de lectura abierto, el cual codifica una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. La proteína viral es procesada por proteasas virales y celulares, para dar lugar a cuatro proteínas estructurales (Core, E1, E2 y p7) y seis proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) [8,9] (Figura 1).

La región no codificante del extremo 5' está formada por aproximadamente 341 nucleótidos y contiene 4 dominios estructurales altamente conservados. Estos dominios

constituyen un sitio de entrada del ribosoma a partir del cual se inicia la traducción de la poliproteína en forma Cap-independiente [10,11].

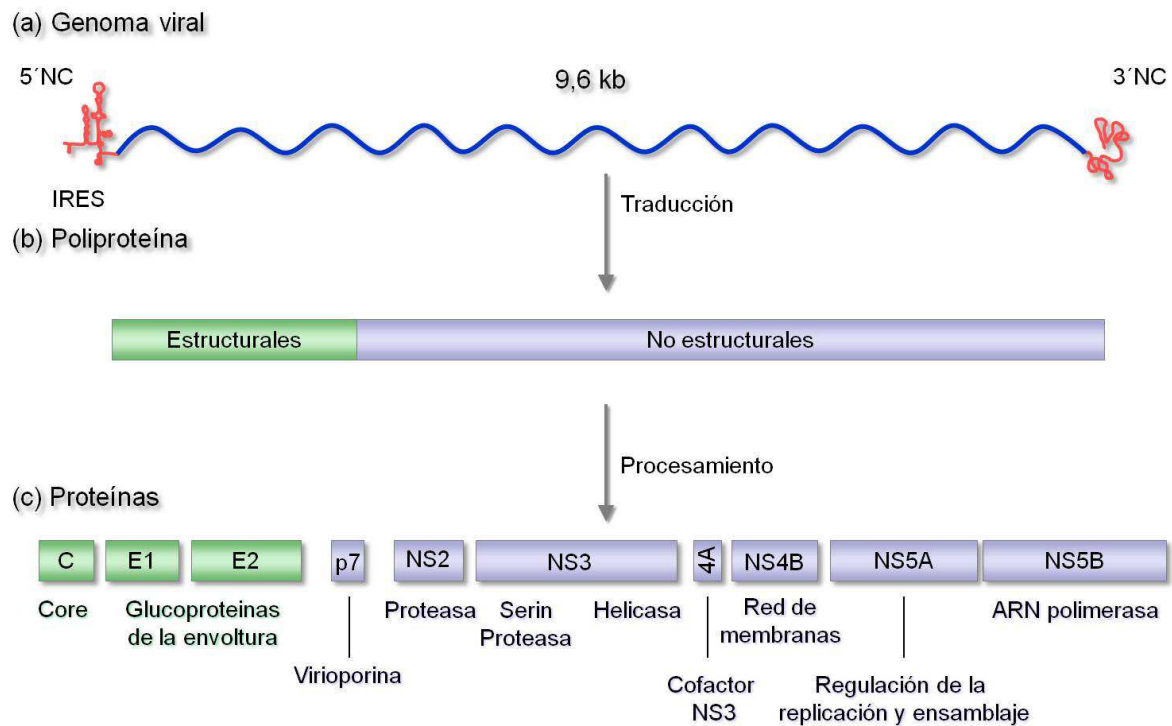


Figura 1. Organización genómica y función de las proteínas del HCV. a) Representación lineal del genoma viral: el marco de lectura abierto (azul) y las regiones no traducidas 5' y 3' (rojo). b) Organización de las proteínas en el precursor poliproteico: proteínas estructurales (verde) y no estructurales (lila). Los triángulos negros indican los sitios de corte de las peptidasas celulares para dar lugar a las proteínas estructurales. Los triángulos blancos se refieren a los sitios de corte de las proteasas virales para dar lugar a las proteínas no estructurales. c) Proteínas virales y su función. Adaptado de Koutsoudakis 2013 [12].

La proteína Core forma la nucleocápside viral. Contiene un dominio de unión a ARN, que también está involucrado en la homo-oligomerización de Core [13] y un dominio de

asociación con *lipid droplets*. Esta asociación de Core con *lipid droplets* y su interacción con NS5A participan en el ensamblaje de la nucleocápside [14,15]. Asimismo, se le han atribuido una gran variedad de funciones, entre ellas la modulación de la transcripción de genes, la proliferación celular, la inducción de esteatosis y la modulación de la apoptosis

[16-18]. Además, se ha reportado la existencia de un marco de lectura superpuesto al de la proteína Core, designado como F [19].

Las glicoproteínas de envoltura E1 y E2 participan en diferentes etapas del ciclo de replicación viral, incluyendo el proceso de adsorción y entrada, la fusión con la membrana endosomal y el ensamblaje de las partículas infecciosas [20].

Dentro de la glicoproteína E2 se han descrito tres regiones hipervariables (HVR), que difieren hasta en un 80% entre los distintos genotipos del HCV; esta variabilidad antigénica facilita la evasión a la respuesta inmune humoral. La HVR1 comprende los primeros 27 aminoácidos del extremo amino de la glicoproteína E2 (residuos 384 a 410). A pesar de la hipervariabilidad, se ha observado que esta región constituye un segmento básico, cuyos residuos con carga positiva se localizan en posiciones específicas que determinan un patrón [21]. La HVR2, de 7 aminoácidos de longitud (residuos 474 a 482), está ubicada río abajo de HVR1. Por último, la HVR3 se posiciona entre HVR1 y HVR2 (residuos 431 a 466). De acuerdo al modelo actual de la glicoproteína E2, estas regiones estarían involucradas en la interacción con los receptores celulares que median la adsorción y la entrada del virus, y están sujetas a presión selectiva por parte del sistema inmunitario [22,23].

El polipéptido p7 es una proteína intrínseca de membrana, de 63 aa de largo, la cual no es necesaria para la replicación *in vitro*, pero es esencial para el ensamblaje y la liberación de virus infeccioso *in vitro*, así como para la infección productiva *in vivo* [24].

Las funciones de las proteínas restantes radican principalmente en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral.

La proteína NS2, de carácter hidrofóbico, y el dominio amino terminal de la proteína NS3, con actividad serina proteasa, forman una proteasa dependiente de zinc que participa en el clivaje entre NS2 y NS3 [25].



La proteína NS3 tiene aproximadamente 70 KDa y es una proteína multifuncional. Participa en el clivaje del resto de las proteínas no estructurales en los sitios NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B. Además de la actividad serina proteasa en su extremo amino terminal posee, en el extremo carboxilo terminal, un dominio helicasa/ATPasa [26].

La NS4A es la proteína no estructural más pequeña, conformada por 54 aa; es requerida como cofactor para la actividad serina proteasa de NS3 y constituye el anclaje de la NS3 a la membrana intracelular [27,28].

La NS4B es una proteína integral de membrana de 27 kDa cuya función principal es la inducción y organización de la “red membranosa” [29], una alteración específica de las membranas internas que constituye el andamiaje para el complejo de replicación del HCV [30].

La fosfoproteína NS5A participa en la modulación de la replicación del ARN viral y en el ensamblaje del virión. Se presenta en dos formas con diferente grado de fosforilación; se postula que el estado de fosforilación de NS5A regula la transición de la etapa de replicación a la etapa de ensamblaje del HCV [31]. Se ha demostrado que NS5A se une al genoma viral, y se propone que ejercería una función protectora de la acción de ribonucleasas celulares o del reconocimiento por parte de los mecanismos de defensa antiviral inducidos por ARN de doble cadena [32].

La proteína NS5B constituye la enzima clave responsable de la replicación del genoma del HCV, debido a su actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN [33]. Su estructura y su funcionalidad han sido ampliamente caracterizadas [34]. Participa en la formación de la red membranosa y conduce la síntesis de ARN genómico de polaridad negativa y los pasos subsiguientes de la replicación genómica [35].

Por último, la región 3'UTR consiste en una secuencia variable de 40 nt y un poli U interno, seguido de una secuencia de 98 nt, altamente conservada entre los diferentes genotipos del HCV, que establece varias estructuras secundarias en forma de bucles [36,37]. Se considera que la 3'UTR participaría en la iniciación de la replicación del genoma viral [38,39], así como también en la regulación de la traducción de la poliproteína del virus [40,41].

## 1.2. Evolución

El HCV presenta, como otros ARN virus, una elevada tasa de sustitución ( $\sim 10^{-4}$  nucleótidos sustituidos/sitio/año) entre diferentes aislamientos, esto se debe: - al tamaño de la población viral ( $\sim 10^5$  copias/ml), el *turn over* ( $10^9$  partículas virales /día) y la ausencia de actividad de edición de copia (*proof reading*) de la polimerasa viral. Esto hace que en el individuo infectado por el HCV se hallen presentes un conjunto de variantes virales genéticamente relacionadas conocido como cuasiespecies, las cuales presentan un nivel de heterogeneidad del 1 a 2%.

De acuerdo con el modelo de cuasiespecies el virus no se halla presente como una especie molecular única, sino como un conjunto de variantes genómicas relacionadas. En este modelo, cuando las subespecies predominantes están bajo determinada presión, se selecciona una subespecie coexistente, capaz de evadir esta presión, deviniendo en la subespecie predominante. Esta selección genera un nuevo equilibrio de subpoblaciones pero ahora con capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedador.

## 1.2. Taxonomía

El HCV es miembro del género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae* y está evolutivamente relacionado a los *Flavivirus* y *Pestivirus*, los cuales son transmitidos por vectores.

El análisis filogenético de diferentes aislamientos estableció la existencia de 7 genotipos del HCV que difieren entre el 31 y 34% de su genoma y más de 90 subtipos que difieren entre el 20 y 23% [42,43] (Figura 2).

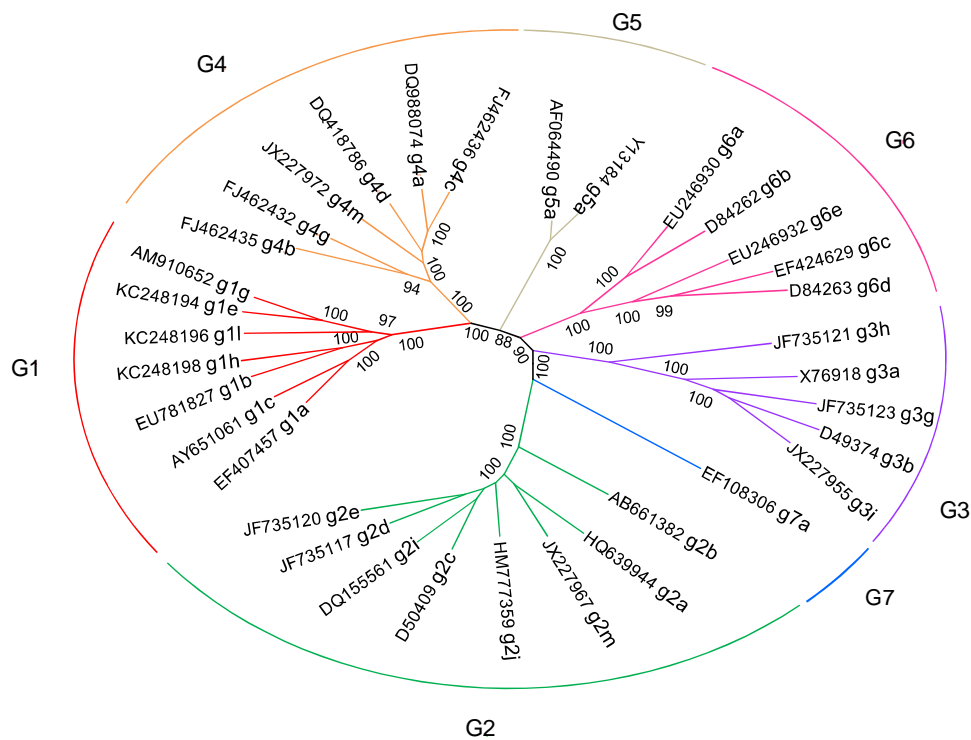


Figura 2. Genotipos del HCV. Árbol de máxima verosimilitud (ML) de 34 secuencias de genoma completo representativas de los distintos genotipos del HCV. El número en cada nodo corresponde a valores de *bootstrap* obtenidos a partir de 1.000 réplicas.

El genotipo 1, subtipos a y b, es el predominante en la Argentina [44-46]. En un estudio retrospectivo sobre 243 pacientes, el 53% de las muestras correspondieron al genotipo 1, el 23% al genotipo 2, el 8,6% al genotipo 3 y el 14,8% presentaron infecciones mixtas [46].

### 1.3. Epidemiología

En la actualidad se estima que hay 150-180 millones de individuos infectados, lo cual corresponde al 2,05-2,47 % de la población mundial, con una tasa anual de incidencia de 3-4 millones y 46.000 muertes en igual período. La prevalencia de la infección en los diferentes países varía entre menos del 1 y más del 2,9% [47] (Figura 3).

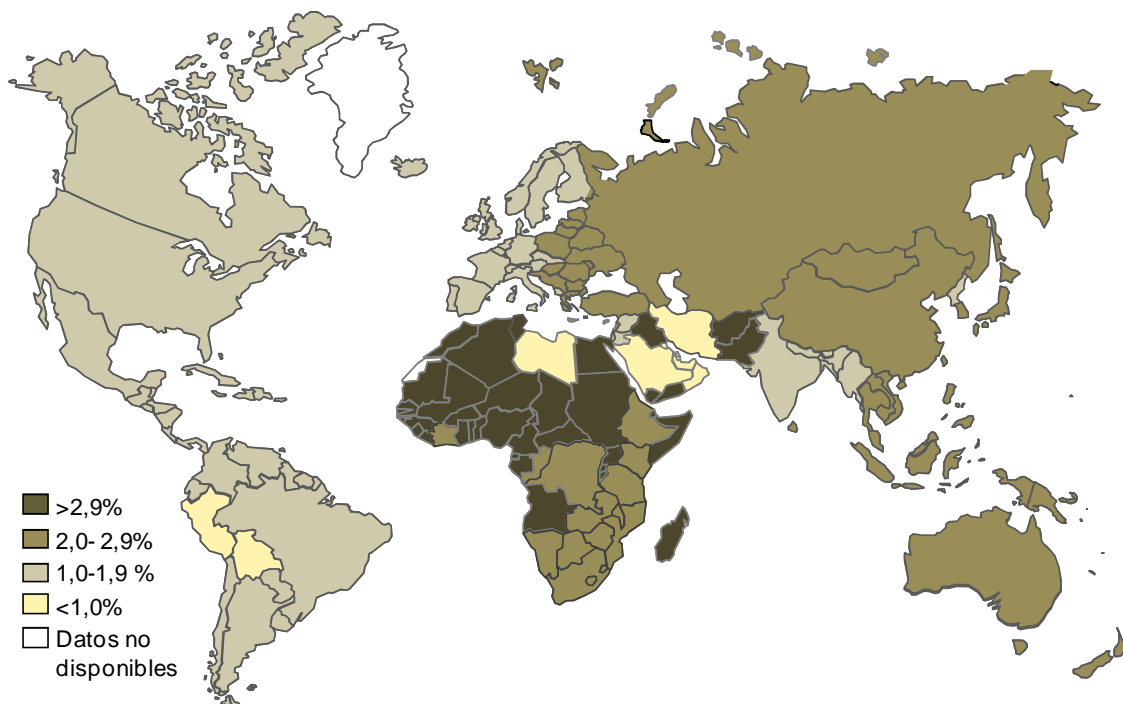


Figura 3. Seroprevalencia mundial del HCV. Adaptado de Alter 2007 [48].

En Argentina los datos de prevalencia de anticuerpos antiHCV en Bancos de Sangre muestran cifras que oscilan entre 0,32 y 0,46% [45,49]. Un significativo número de individuos desconoce su condición de infectado debido al curso subclínico de la infección.

El HCV se disemina principalmente mediante el contacto con sangre infectada. El modo más eficiente de transmisión del HCV es mediante exposiciones prolongadas o repetidas a sangre infectada (transfusiones, trasplantes de donantes infectados o intercambio de agujas entre usuarios de drogas intravenosas) y en menor medida por transmisión sexual, exposición de mucosas a sangre infectada o fluidos derivados de suero o transmisión vertical [50-52].

#### 1.4. Historia natural de la infección por HCV

La infección aguda por HCV es frecuentemente subclínica, en el 70 a 80 % de los casos el período agudo de la enfermedad transcurre en forma inadvertida. La resolución espontánea de la infección solo se observa en el 25-35% de los casos [53]. En el 65-75% de los casos restantes el ARN del virus persiste en sangre más allá de seis meses de ocurrida la infección [54,55]. La evolución de la infección a la cronicidad ha sido asociada a factores del hospedador como: edad [56], sexo [53], polimorfismos genéticos (SNP IL28B) [57], coinfecciones [58,59], así como al genotipo viral [56,60,61].

La infección crónica causa una reacción inflamatoria persistente del parénquima hepático; la intensidad, localización y capacidad para progresar de estas lesiones, es variable. Por ello, el espectro histopatológico de la enfermedad es amplio y comprende desde alteraciones mínimas hasta cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC) [5,7].

Diferentes estudios prospectivos mostraron una elevada tasa de morbi-mortalidad debida a la hepatitis crónica [62]. Aproximadamente el 70% de los infectados desarrolla una infección crónica por el HCV, y están en riesgo para el desarrollo de manifestaciones extrahepáticas, cirrosis compensada y descompensada, y HCC.

El 10-15% de las personas infectadas por HCV presenta signos de cirrosis en un periodo de 15 años desde el episodio de la infección aguda [63,64]. La supervivencia de un paciente con cirrosis compensada es mayor al 85% durante los 10 primeros años tras el diagnóstico; sin embargo, ésta disminuye significativamente en caso de ocurrir una descompensación clínica o de diagnosticarse HCC [65]. La probabilidad acumulada de ocurrencia de descompensación clínica en los casos de cirrosis hepática oscila entre el 10-20% a los 5 años. Las descompensaciones más frecuentes son la aparición de HCC (~20%) y el desarrollo de ascitis (17%). Los factores asociados con un mayor riesgo de descompensación son el consumo de alcohol, la función hepatocelular en el momento

del diagnóstico (niveles de albúmina, tiempo de protrombina, niveles de transaminasas) y la edad [66]. El riesgo de desarrollo de un HCC oscila entre el 0,7 y el 1,3% [65, 66].

El HCC, con una incidencia anual estimada en un millón de nuevos casos por año [67], es la sexta causa de cáncer en el mundo y la segunda causal de muertes relacionadas detrás del cáncer de pulmón y de estómago [68].

En nuestro país, el programa GLOBOCAN2012 reportó una incidencia de 4,4 y 2,5/100.000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente [69].

La relación que existe entre la cirrosis y el HCC está bien establecida, coexistiendo hasta en 80-90% de los casos [70]. La etiología de la cirrosis también juega un papel importante en el desarrollo de HCC. En términos generales, el mayor riesgo existe en pacientes con cirrosis asociada a HCV, virus de la hepatitis B (HBV) e ingesta de alcohol. Además, el sexo masculino y la edad son factores importantes para el desarrollo de HCC; la mayor frecuencia se encuentra entre los 50 y 70 años de edad excepto en áreas en donde la infección por HBV es endémica [71].

La tasa de mortalidad de la infección por HCV es del 1,35 al 3,75%. Aproximadamente un tercio de las muertes son secundarias a la aparición de un HCC. Asimismo, el estadio terminal de la infección crónica por HCV es la principal indicación de trasplante hepático en adultos [72,73].

### 1.5. Historia natural de la coinfección HCV y HIV

En pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) la coinfección con HCV es un hallazgo frecuente en virtud de las similares vías de transmisión que estos agentes presentan [74,75]. Aproximadamente el 10-15% de los 35 millones de personas infectadas por el HIV en todo el mundo están coinfectados por el HCV, mientras que alrededor del 3% de los 180 millones de personas infectadas por el

HCV están coinfectados por el HIV. En total, se estima que 4 millones de personas están infectados por ambos patógenos.

En Argentina la coinfección HCV/HIV se ha evidenciado en el 15-30% de las infecciones por HIV [76], observándose en estos pacientes un incremento de la tasa de cronicidad respecto de los individuos mono infectados con HCV [77].

La coinfección con HIV modifica el curso natural de la infección por el HCV, observándose una mayor tendencia a desarrollar fibrosis, mayor progresión a insuficiencia hepática y HCC. Asimismo, la tasa de respuesta al tratamiento antiviral es menor que en los pacientes mono infectados por HCV [78-80].

La prevalencia de cirrosis hepática en pacientes infectados con el HIV es de 8%, siendo el HCV la etiología más frecuente [81]. Al momento del diagnóstico de cirrosis, la duración de la infección por HCV se estima en 23,2 años para los mono infectados y en 6,9 años para los coinfectados. Algo similar sucede al momento del diagnóstico de HCC, con una duración de la infección por HCV de 28 años para los mono infectados y de 17,8 años para los coinfectados [59,82,83].

## 1.6 Trasplante hepático

El trasplante hepático constituye la opción terapéutica de elección para aquellos pacientes que han llegado a estadios terminales de cirrosis o que han desarrollado HCC. Dicho procedimiento ha conseguido mejorar la supervivencia de los pacientes cirróticos de forma significativa.

En la actualidad se realizan anualmente a nivel mundial más de 15.000 trasplantes de hígado [84]. En la Argentina se ha evidenciado un incremento de trasplantes hepáticos en los últimos años, alcanzándose en 2012 una tasa de 10,48 trasplantes por millón de habitantes [85] (Figura 4).

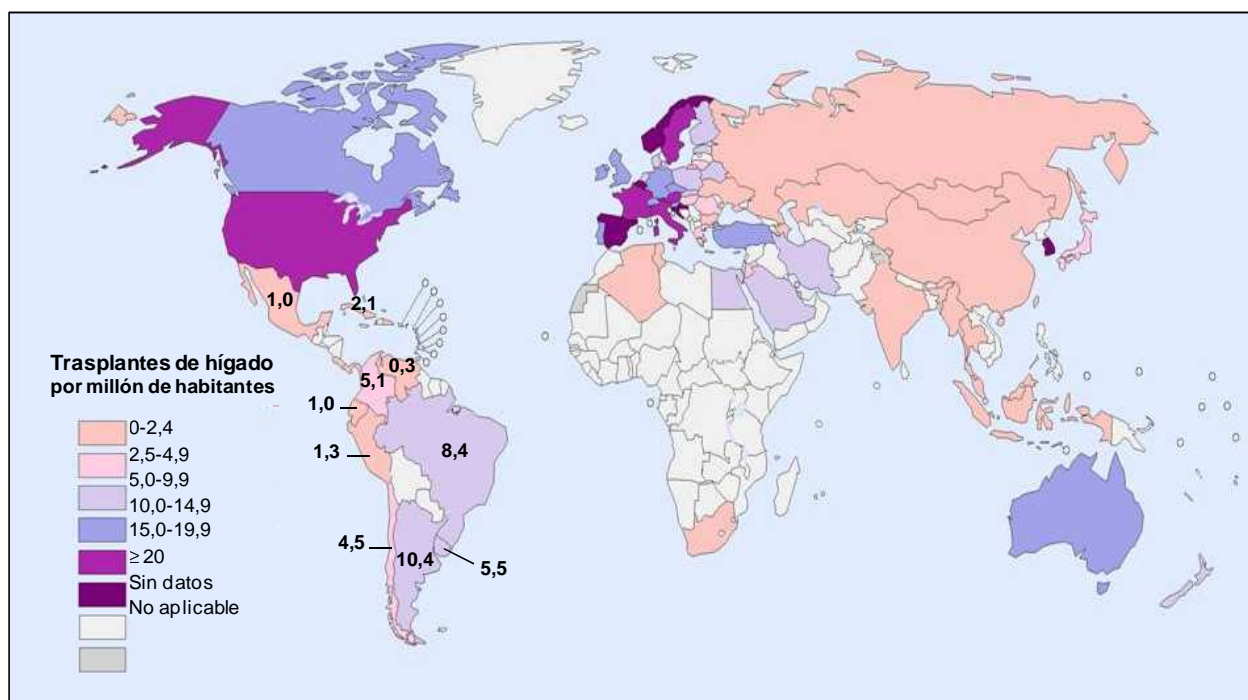


Figura 4. Trasplantes hepáticos realizados en 2012. Se indican las tasas de trasplante por millón de habitantes en países de Latinoamérica. Adaptado de Salvalaggio PR 2014 [85].

El primer trasplante hepático humano lo realizó el doctor TE Starzl en 1963 en Denver. Los resultados de los trasplantes realizados a lo largo de las décadas de 1960 y 1970 fueron insatisfactorios. Sin embargo, a partir de la utilización de la ciclosporina a finales de la década de 1970, estos resultados mejoraron de forma evidente. En la actualidad se estima que la supervivencia de los pacientes trasplantados es del 87% al año del trasplante, del 79% a los tres años y del 73% a los 5 años [86].

La infección por HCV constituye la causa más frecuente para la indicación de trasplante; representa entre el 40 y 50% de los individuos en lista de espera y de los que ya han recibido trasplante [87-88]. Esta frecuencia ha ido aumentando de forma progresiva en los últimos años debido en parte, a la ausencia de una vacuna protectora contra la infección por el HCV, así como a la falta de tratamiento antiviral eficaz. Por todo ello, se ha producido un aumento del número de pacientes infectados por el HCV que están en riesgo de progresión. Datos publicados recientemente en el Registro Nacional de Trasplante Hepático (INCUCAI-Sociedad Argentina de Trasplantes), muestran que en



nuestro país, sobre 2093 candidatos inscriptos en lista de espera en categoría MELD en el período 2005-2011, la cirrosis por HCV constituía con el 23% la primera indicación de trasplante hepático, seguida por la cirrosis alcohólica (17%) y la criptogénica (10%). Un estudio realizado en Argentina entre Julio 2005 y Abril 2009 sobre 1773 trasplantes de hígado, permitió identificar al HCV como la principal causa de trasplante hepático en nuestro país [89].

### 1.7 Trasplante hepático en pacientes con infección por HIV

Hasta la introducción del tratamiento antirretroviral de gran actividad (HAART) la infección por HIV era una contraindicación para la realización de cualquier tipo de trasplante. El pronóstico vital de estos pacientes y el temor a que la inmunosupresión asociada al trasplante pudiera acelerar la progresión a SIDA o incrementar el riesgo de infecciones oportunistas, hacían desestimar este procedimiento.

El advenimiento de esta terapia antiviral ha cambiado la situación de los pacientes infectados por HIV, disminuyendo drásticamente la morbilidad por procesos oportunistas y la mortalidad global de los pacientes infectados por HIV. Este hecho a su vez ha condicionado que haya tiempo suficiente para que procesos crónicos evolucionen a una situación de fallo terminal (hepático, renal, cardíaco), cuyo único abordaje posible es el trasplante, convirtiendo a las infecciones crónicas por HBV y HCV en una de las causas más importantes de morbi-mortalidad en estos pacientes [90,91]. Esto ha llevado a la creciente indicación de trasplante hepático en esta población [92,93].

La tasa supervivencia postrasplante de pacientes infectados por HIV a corto y mediano plazo es similar a la observada en pacientes trasplantados sin infección por HIV, con tasas de alrededor del 80-100%. Estos valores se mantienen a largo plazo en pacientes con infección por HIV trasplantados por enfermedades hepáticas de etiología

distinta al HCV [94,95]. En cambio, la supervivencia a largo plazo en pacientes trasplantados por hepatopatías asociadas al HCV decrece sustancialmente, siendo de alrededor del 50% a los 3-5 años [96,97]. En estos casos la causa de mortalidad más frecuente es la recurrencia de la infección por HCV.

En nuestro país, durante el período 2005-2010, ingresaron en lista de espera para trasplante hepático 52 candidatos HIV positivos, de los cuales el 77% eran coinfectados HIV-HCV. La tasa de mortalidad en lista de espera, así como la sobrevida postrasplante fue significativamente menor en pacientes HIV/HCV coinfectados que en pacientes HCV mono infectados [93].

En Argentina, el Registro Nacional de Trasplante Hepático reveló que entre Julio de 2005 y Julio de 2011, fueron trasplantados 22 receptores HIV positivos, de los cuales el 73% eran coinfectados HIV-HCV, y 967 receptores HIV negativos.

En los receptores HIV positivos, la sobrevida postrasplante del paciente/injerto a 3 años fue del 50/42% respectivamente, mientras que en los receptores HIV negativos la sobrevida fue significativamente mayor (72/67%) [98].

En la mayoría de las cohortes la menor sobrevida postrasplante se debe a la recurrencia HCV más agresiva y no a la progresión de la infección HIV [99,100]. En estos pacientes se verifica mayor frecuencia de hepatitis colestásica [101], progresión de la fibrosis [99-101] e incidencia de rechazo celular [102].

#### 1.8. Historia natural de la recurrencia de la hepatitis C postrasplante hepático

La cirrosis en la infección por HCV, como se mencionó anteriormente, se ha convertido en la primera indicación de trasplante hepático [72,103]. La recurrencia de la infección viral es prácticamente universal ya que sucede en la amplia mayoría de los pacientes [104,105], ocurre en forma inmediata tras la cirugía y se asocia con

incrementos significativos de la viremia. Sin embargo, la historia natural de la recurrencia de la hepatitis C postrasplante hepático es variable [72].

Se han descrito factores que pueden influir en la gravedad de la recurrencia y condicionar mayor grado de fibrosis; sin embargo, algunos estudios han sido contradictorios y no existe evidencia concluyente sobre la relevancia de cada uno de ellos [72]. A continuación se mencionan los más importantes:

a. Factores relacionados con el virus: algunos estudios han sugerido que el genotipo 1b y las cargas virales elevadas (pretrasplante y postrasplante precoz), se asocian a una mayor severidad en la recurrencia de la infección, con mayor fibrosis del injerto y una disminución de la supervivencia a 5 años [106,107]; sin embargo, estos resultados no han sido confirmados en otros estudios.

b. Factores relacionados con el donante: la histocompatibilidad HLA-B entre el donante y el receptor y la edad avanzada (>50 años) del donante se han sugerido como factores adicionales en la severidad de la recurrencia, pero la evidencia no es concluyente y existe un número reducido de estudios [108,109]. Asimismo, se ha descrito la asociación del trasplante de donante vivo con una mayor agresividad en la recurrencia de la infección y disminución de la supervivencia del injerto y del paciente. La mayor susceptibilidad a la infección del hígado en regeneración, se postula como uno de los factores determinantes [110].

c. Factores del receptor: los pacientes de raza negra y asiática tienen una recurrencia más grave de la infección postrasplante.

d. Factores relacionados con la cirugía: el tiempo de isquemia prolongado se ha asociado con recurrencia grave y precoz [72,111].

e. Factores relacionados con la inmunosupresión: la mayoría de los estudios coinciden en demostrar la asociación del número de episodios de rechazo, la utilización

de bolus de corticoides y de anticuerpo monoclonal anti-CD3 con el desarrollo de una forma severa de reinfección, con fibrosis significativa del injerto en el postrasplante [103,106]. Aunque los mecanismos por los que se produce no están claros, se postula que el aumento de la replicación viral puede tener un efecto citopático.

La hepatopatía por el HCV tras el trasplante progresa más rápidamente en los sujetos inmunocompetentes, de manera que a los 5 años del trasplante un porcentaje significativo de los pacientes (entre el 10-30%) desarrollan cirrosis hepática [112]. Una vez confirmada la presencia de cirrosis sobre el injerto hepático, el intervalo de tiempo que transcurre hasta la primera descompensación clínica es menor que en los sujetos no trasplantados. El desarrollo de una cirrosis descompensada tras el trasplante hepático marca un punto en el tiempo a partir del cual la expectativa de vida del paciente disminuye de forma dramática (supervivencia al año del 50%) [113]. Como consecuencia de la progresión acelerada de la fibrosis relacionada con el HCV tras el trasplante hepático, la supervivencia a largo plazo de los pacientes trasplantados por esta indicación es significativamente menor que la de los trasplantados por otras etiologías [114]. El uso de agentes inmunosupresores más potentes y la utilización de órganos procedentes de donantes de mayor edad se señalan como las principales causas del incremento en la gravedad de la recurrencia de la infección por el HCV [102, 115]. Todo ello hace que la recurrencia grave de la infección por el HCV, se haya convertido en la primera causa de retrasplante tardío [116]. Sin embargo, la supervivencia tras el retrasplante de los sujetos infectados por el HCV es menor que cuando éste se lleva a cabo por otras indicaciones [117]. La posibilidad de que la evolución de la infección por el HCV tras el retrasplante sea aún más agresiva, unido a la escasez de órganos, han motivado que muchos grupos de trasplante consideren la recurrencia grave y precoz de la infección por el HCV como una contraindicación para el retrasplante [118].

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

En la última década se han verificado avances significativos en la prevención y tratamiento de las infecciones por HCV, lo cual redujo considerablemente la morbi-mortalidad de los pacientes infectados, a pesar de ello la infección por HCV es aún considerada un problema de salud mundial, siendo junto con el HBV y el HIV uno de los tres agentes virales con mayor tasa de mortalidad [119].

Asimismo, la infección por HCV es la principal causa de indicación de trasplante hepático [103], con el agravante de que la recurrencia de la infección viral es prácticamente universal ya que sucede en la amplia mayoría de los pacientes [104,105].

El trasplante hepático es una oportunidad única para estudiar la evolución genética del HCV, ya que las cuasiespecies circulantes que están en equilibrio dinámico, requieren de una rápida adaptación a una situación derivada de la eliminación de la principal fuente de producción de virus (el parénquima hepático) y la implantación de un órgano no infectado. El estudio de la evolución genética en este contexto es complejo, ya que la infección se produce en un marco de fuerte inmunosupresión, así como en presencia de una respuesta inmune previamente establecida [120].

La influencia de la evolución de las cuasiespecies en el progreso de la recurrencia en la infección por el HCV es controversial. Las diferencias en la evolución de las cuasiespecies de los pacientes reflejan la complejidad de la presión inmune y podría ser un marcador de los diferentes grados de daño hepático.

Por tal motivo, la caracterización de las poblaciones virales pre y postrasplante en pacientes mono infectados con HCV o coinfectados con HCV/HIV, con recurrencia leve y severa, permitiría contribuir al avance en el conocimiento de los mecanismos virales involucrados en la recurrencia viral y podría ser de gran interés, ya sea desde el punto de vista de la biología del virus como así también por el impacto en la práctica médica.

### 3. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

El objetivo general de este proyecto es caracterizar la evolución de diferentes regiones del virus de la hepatitis C en pacientes que recibieron trasplante hepático.

#### 3.1. Objetivos específicos

- a- Evaluar la implicancia del trasplante hepático en la evolución viral, a través de la caracterización de la diversidad y complejidad de las poblaciones virales pre y postrasplante en pacientes mono infectados por HCV y coinfectados con HIV.
- b- Determinar el patrón de sustituciones y caracterizar las presiones positivas y negativas mediante la identificación de cambios sinónimos y no sinónimos en diferentes regiones del genoma viral.
- c- Correlacionar la evolución viral con la severidad de la recurrencia de la infección.

### 4. HIPÓTESIS

Si la heterogeneidad viral es un factor que influye en la progresión de la recurrencia viral postrasplante, entonces se observará un patrón diferencial en la evolución del virus de la hepatitis C en pacientes con diferente grado de recurrencia.

## 5. PACIENTES Y MÉTODOS

### 5.1. Pacientes

En colaboración con el grupo de profesionales del Servicio de Hepatología del Hospital Italiano de Buenos Aires, se analizaron en forma retrospectiva muestras de plasma de 9 pacientes infectados en forma crónica por HCV recolectadas durante el periodo 2008-2011, (Tabla 1). Se caracterizaron 1 a 2 muestras pretrasplante y 1 a 3 muestras postrasplante de cada paciente (Figura 5).

Paciente	Edad (años)	Sexo	Coinfección HIV	Tipo de recurrencia	Tiempo de recurrencia (días)	Muestras Pre-trasplante (días)		Muestras Pos-trasplante (días)		
						M1	M2	M3	M4	M5
A	45	M	Si	Severa	33	-53	-7	6	48	
B	56	F	No	Severa	135		-527	11	163	312
C	52	M	Si	Moderada	10	-186	-15	470	604	
D	51	M	No	Moderada	222		-86	39	58	415
E	45	M	Si	Severa	488		-17	624		
F	52	M	No	Moderada	100		-579	8	31	413
G	41	M	Si	Moderada	30		-74	263	635	
H	38	M	Si	Severa	191		-3	1	64	
I	57	M	No	Severa	64		-593	33	54	

Tabla 1. Características epidemiológicas de los pacientes y temporalidad de las muestras analizadas respecto del trasplante. Se analizaron 2 a 4 muestras de cada paciente, previas y posteriores al trasplante. (En rojo las muestras posteriores a la recurrencia).

Cuatro pacientes estaban monoinfectados con HCV y los cinco restantes presentaban coinfección con HIV.

La recurrencia se consideró severa cuando los pacientes presentaban fibrosis en puente o cirrosis (F3 o F4) y moderada cuando existía ausencia de fibrosis o fibrosis restringida al tracto portal. Cuatro pacientes presentaron recurrencia moderada, mientras que en los cinco restantes se observó una recurrencia severa. La recurrencia de la infección se observó en un amplio rango de tiempo, entre 10 y 488 días postrasplante.

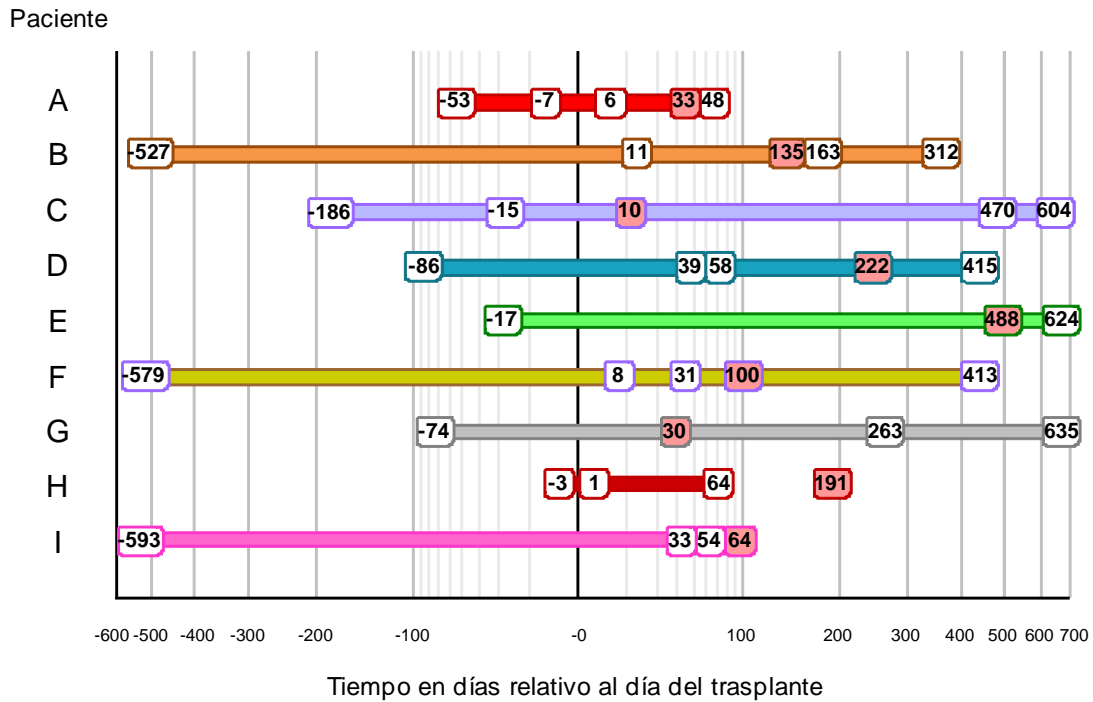


Figura 5. Esquema temporal de las muestras analizadas. Los recuadros indican los días de la muestra respecto a la fecha del trasplante. Los recuadros en rojo indican los días de la recurrencia respecto a la fecha del trasplante.

### 5.2. Marcadores bioquímicos

La funcionalidad hepática fue determinada mediante la evaluación de alanina amino-transferasa, aspartato amino-transferasa, gamma- glutamil transpeptidasa, fosfatasa alcalina, albúmina, globulinas, bilirrubina total, tiempo de protrombina y alfa feto proteína.

### 5.3. Marcadores serológicos

El diagnóstico de la infección se realizó mediante el test de EIA (*Enzyme Immuno Assay*) de tercera generación para detección de anticuerpos anti-HCV, y test suplementario de *recombinant immunoblotting* (RIBA) de tercera generación (Chiron RIBA HCV 3.0 SIA, Chiron Corp., Emeryville, CA, USA), sensibilizado con proteínas recombinantes para las regiones Core, NS3, NS4 y NS5.



#### 5.4. Marcadores virológicos

Los niveles del HCV-ARN en plasma fueron cuantificados por el método COBAS®AmpliPrep/COBAS®TaqMan ®HCV Test (Sistema Diagnóstico Inc. Roche, Mannheim, Alemania). Esta técnica posee una sensibilidad de  $1.50E+01$  UI de ARN del HCV/ml y un rango lineal entre  $4.30E+01$  y  $6.90E+07$  UI de ARN del HCV /ml.

#### 5.5. Amplificación del HCV-ARN

El ARN de 200  $\mu$ l de plasma se purificó mediante la utilización de TRIZOL (*GibcoBRL*), posteriormente el ARN se desnaturalizó 5 min a  $80^{\circ}\text{C}$ , y fue retrotranscrito a ADNc en 20  $\mu$ l de reacción en las siguientes condiciones, Tris-HCl 5 mM pH 8.3, KCl 70 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, 0.25 mM de cada dNTP, 0.9 U/ $\mu$ l de Inhibidor de RNasa, 5 U/ $\mu$ l de M-MLV transcriptasa reversa y 210 pmoles de *random primers*, se incubó 90 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , finalmente se inactivó la transcriptasa reversa 5 min a  $95^{\circ}\text{C}$ .

Los 20  $\mu$ l de ADNc fueron utilizados para la amplificación de regiones correspondientes a los genes Core, E2 y NS5B. Las condiciones de reacción y ciclado para las tres regiones fueron las mismas: Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2.7 mM, 0.04 mM de cada dNTP, 0.4  $\mu$ M de cada cebador (Tabla 2) y 30 mU/ $\mu$ l de Taq polimerasa.

El programa térmico de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 5 min a  $94^{\circ}\text{C}$ , 40 ciclos de 30 seg de desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 seg de *annealing* a  $55^{\circ}\text{C}$  y 45 seg de extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  y 1 ciclo de 10 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Se realizó una segunda ronda de amplificación de 25 ciclos en las mismas condiciones de reacción y con el mismo programa térmico de amplificación de la primera ronda, excepto para la región NS5B, para la cual sólo se realizó una primera ronda de amplificación.

Región	Cebador	Posición*	Tm (°C)	Secuencia (5'→3')
Core	HCV 101	275-294	54.0	CGA AAG GCC TTG TGG TAC TG
	HCV 102	1327-1307	50.3	GAC CAR TTC ATC ATC ATR TCC
	HCV 103	280-301	55.0	TTG TGG TAC TGC CTG ATA GGG T
	HCV 104	876-855	53.0	GGA AGA TAG ARA ARG AGC AAC C
E2	HCV 201	1305-1325	50.0	TGG GAT AGA TGA TGA ACT GGT
	HCV 202	2110-2093	51.5	RAA RCA RTG CGT GGG GCA
	HCV 203	1423-1442	58.0	TCC ATG GTG GGG AAC TGG GC
	HCV 204	2014-1995	52.0	AAC CCC GTG TAG TTC ATC CA
NS5B	HCV 501	8364-8383	54.0	GAT ACC CGC TGC TTT GAC TC
	HCV 502	8721-8751	56.0	CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de regiones correspondientes a las proteínas Core, E2 y NS5B. \*La posición indicada corresponde a la secuencia de referencia H77.

Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y visualizados por transiluminación ultravioleta por tñido con bromuro de etidio 0.5 µg/ml.

### 5.6. Purificación y Secuenciación

Los amplicones obtenidos fueron purificados mediante columnas comerciales (QIAGEN, QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen, Hilden, Germany) y luego secuenciados en ambos sentidos. La secuenciación se llevó a cabo en secuenciadores automáticos de capilares (Unidad de Genómica, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Argentina).

### 5.7. Genotipificación

El genotipo de las muestras fue determinado mediante análisis filogenético; las secuencias nucleotídicas de la región NS5B se alinearon con el programa *ClustalX* v1.83 [121] y los alineamientos fueron editados con el programa BioEdit versión 7.1.3.0 [122].

Se utilizaron como referencia secuencias del GenBank representativas de los genotipos 1-6 (Número de acceso al Genbank. subgenotipo 1a: AF271632, AF011751, AF009606;.subgenotipo 1b: AF139594, AB049088, D90208, AF356827; subgenotipo 1c: D14853, Y051292; genotipo 2: D10988, AF238486, AB030907, AY23730, Q155561, D50409, AB031663, AB047641, D00944, AF169004, AB047639; genotipo 3: D17763, AF046866, D28917, D63821, D49374; genotipo 4: Y11604; genotipo 5: Y13184, AF064490; genotipo 6: D84265, D84264, Y12083, D84262, DD84263, D63822).

### 5.8. Clonado

Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pGEM-T y con ellos se transformaron células competentes *Escherichia coli* TOP 10. A partir de las colonias obtenidas se realizaron entre 13 y 22 secuencias de las regiones NS5B y E2.

### 5.9. Alineamiento de secuencias

Se utilizó el programa BioEdit versión 7.1.3.0 [122] para la visualización de los electroferogramas y la edición de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de cada producto de amplificación. Para cada amplicón se ensambló una secuencia consenso a partir de las lecturas llevadas a cabo con cada iniciador. En todos los casos, se eliminaron las secuencias correspondientes a los iniciadores. De esta manera, las secuencias directas de las regiones parciales Core, E2 y NS5B tuvieron una longitud final de 574, 571 y 337 bases, respectivamente. Los alineamientos múltiples de las secuencias de nucleótidos se realizaron mediante la utilización del programa *ClustalX* v1.83 [121].

### 5.10. Análisis Filogenético

Las secuencias directas de los distintos pacientes se agruparon por región y por subgenotipo. Se agregaron secuencias obtenidas del GenBank mediante búsqueda BLAST y se incorporaron secuencias de referencia de distintos subgenotipos como

grupo externo. Las secuencias de clones se analizaron por región, y se agregaron secuencias de referencia del mismo subgenotipo. En todos los casos, se obtuvieron los alineamientos múltiples con el programa ClustalX v1.83 [123] y se editaron con BioEdit 7.1.3.0 [122]. Se estimó el modelo de sustitución nucleotídica que más se ajustara a los datos mediante el criterio de Akaike implementado en el programa jModelTest v2.1.3 [124]. Se obtuvo el árbol filogenético de máxima verosimilitud mediante el programa PhyML v3.0 [125], y el soporte de rama se evaluó mediante bootstrapping no paramétrico utilizando 1000 réplicas.

#### 5.11. Diversidad genética

La diversidad dentro de cada grupo de secuencias provenientes de clones de una misma muestra, se estimó mediante el cálculo de la distancia nucleotídica media, utilizando el modelo de *Maximum Composite Likelihood* incorporado en el *software* MEGA v6. Los errores estándar se calcularon con 200 réplicas de *bootstrap*.

#### 5.12. Complejidad genética

La complejidad genética (número de variantes diferentes dentro de cada muestra) se calculó sobre las secuencias aminoacídicas de cada grupo de secuencias provenientes de clones de una muestra, y se expresó como la entropía normalizada de Shannon (SN), según:

$$S = - \sum_i (p_i \times \ln p_i) \quad S_N = \frac{S}{\ln N}$$

Donde,  $p_i$ : es la frecuencia de cada variante, definida como el número de veces que aparece una variante sobre el total de variantes y  $N$ : es el número total de variantes. Los valores de SN varían teóricamente entre 0 (existe una única variante) y 1 (complejidad máxima de cuasiespecies).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Genotipificación

El análisis filogenético de las secuencias parciales de la región NS5B (nt 8384-8720) permitió determinar el genotipo en las muestras de los pacientes incluidos en este estudio. Tres pacientes (A, E y H) resultaron infectados con el subgenotipo 1a, cuatro pacientes (B, C, F e I) con el subgenotipo 1b y dos pacientes (D y G) con el subgenotipo 3a (Figura 6).

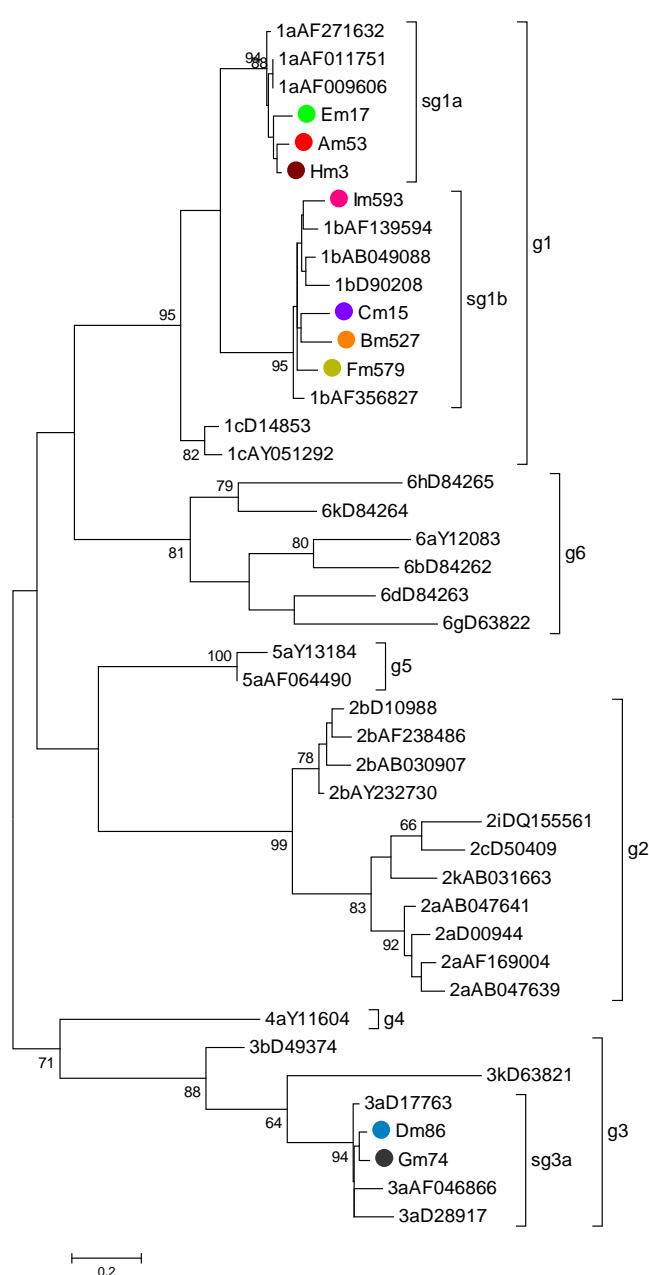


Figura 6. Genotipificación. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las secuencias nucleotídicas de la región NS5B (nt 8384-8720). Se incluyó una muestra de cada paciente y secuencias de referencia de los genotipos 1-6 del HCV. El número en cada nodo corresponde a valores porcentuales de bootstrap obtenidos a partir de 1.000 réplicas (los valores menores a 60% no se muestran). Las secuencias están indicadas con el código del paciente (A-I) y los días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante.

## 6.2. Análisis filogenético de la región NS5B

Con el objetivo de caracterizar la implicancia del trasplante hepático en la evolución del HCV se determinó la secuencia parcial del gen NS5B (nt 8384-8720) en 30 muestras correspondientes a 9 pacientes (2-4 muestras por paciente).

Las secuencias de cada paciente formaron clados monofiléticos, con valores significativos de *bootstrap*, excepto en el caso de las muestras del paciente G, en el cual la muestra pretrasplante (Gm74) no agrupó con las muestras postrasplante (G263 y G635) (Figura 7). En un paciente (H) la secuencia se mantuvo invariable durante el seguimiento, mientras que en las secuencias de los restantes 8 pacientes se observaron entre 1 y 10 cambios en la secuencia nucleotídica en función del tiempo de seguimiento; la mayoría de estos cambios fueron sinónimos y solo en un paciente (G) se observaron cambios no sinónimos (Tabla 3).

Paciente	Genotipo	Tiempo (meses)	Cambios		dN/dS	dN(%)	
			Totales	No Sinónimos			
A	1a	3,3	1	0	1	0,0	0
E	1a	21,2	1	0	1	0,0	0
H	1a	2,2	0	0	0	-	0
B	1b	27,7	1	0	1	0,0	0
C	1b	26,1	1	0	1	0,0	0
F	1b	32,7	2	0	2	0,0	0
I	1b	21,4	4	0	4	0,0	0
D	3a	16,5	3	0	3	0,0	0
G	3a	23,4	10	4	6	0,7	40,0
Total			23	4	19	0,21	17,3

Tabla 3. Análisis de sustituciones nucleotídicas en la región NS5B (nt 8384-8720). Se determinó el número de sustituciones nucleotídicas sinónimas y no sinónimas entre las muestras de cada paciente. En la tercera columna se indica el periodo de tiempo entre la primera y última muestra de cada paciente. El fragmento analizado tiene una longitud de 337 nucleótidos.

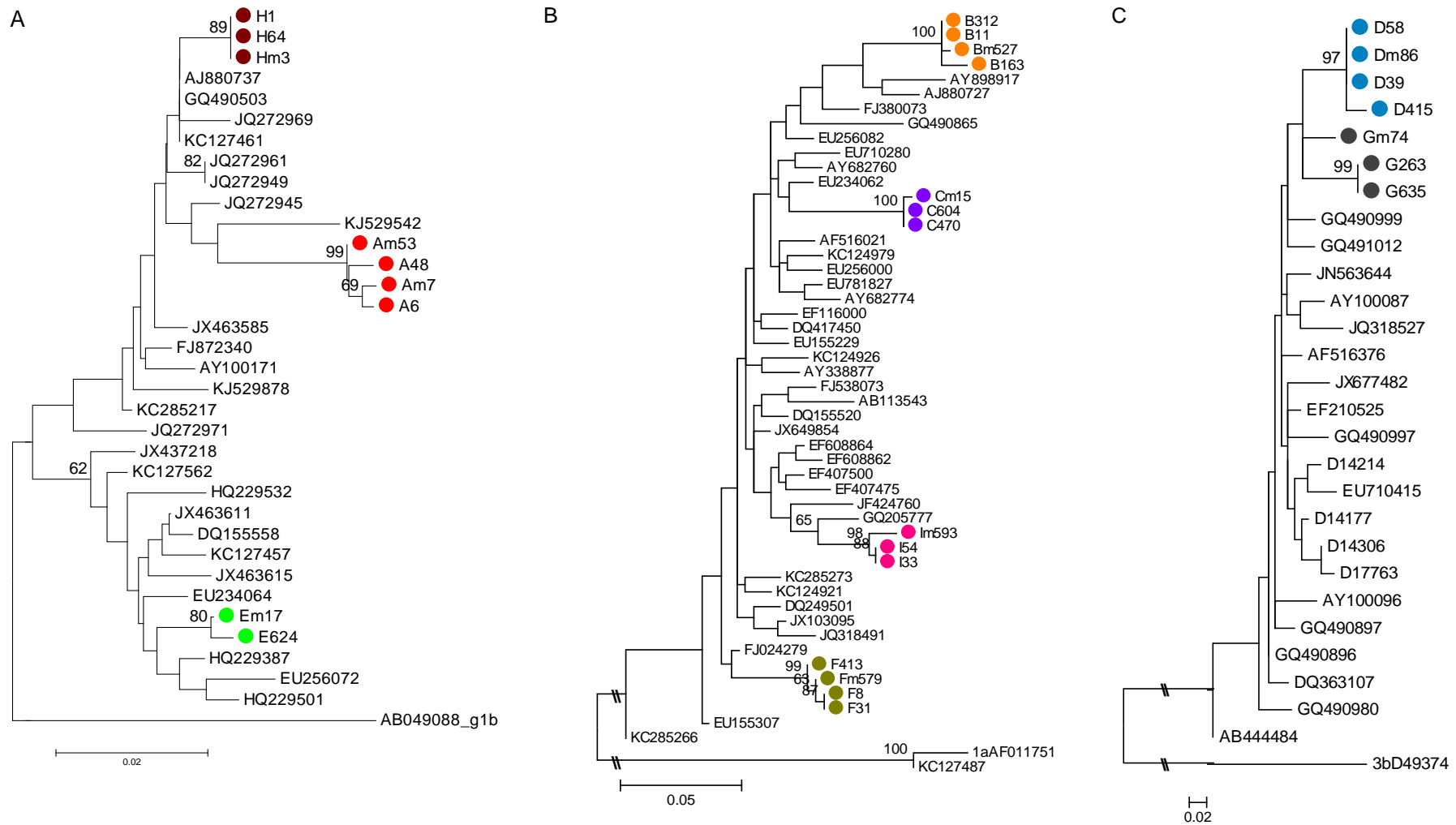


Figura 7. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de la región NS5B (nt 8384-8720) de las muestras de cada paciente. Árbol de máxima verosimilitud (ML) de muestras correspondientes a los 9 pacientes (A-I). Panel A: pacientes infectados con el sg1a (A, E y H), Panel B: pacientes infectados con el sg1b (B, C, F e I), Panel C: pacientes infectados con el sg3a (D y G). El número en cada nodo corresponde a valores porcentuales de bootstrap obtenidos a partir de 1.000 réplicas (los valores menores a 60% no se muestran). Las secuencias están indicadas con el código del paciente (A-I) y los días respecto a la fecha del trasplante. m: previo al trasplante.

### 6.3. Análisis filogenético de la región E2

Se determinó la secuencia parcial del gen E2 (nt 1443-2013) en 30 muestras correspondientes a los 9 pacientes (2-4 muestras por paciente).

Así como en la región NS5B, las secuencias de cada paciente formaron clados monofiléticos, con valores significativos de *bootstrap*, con excepción del paciente G (Figura 8). En un paciente (A) la secuencia se mantuvo invariable durante el seguimiento, mientras que en las secuencias de los restantes 8 pacientes se observaron entre 2 y 58 cambios en la secuencia nucleotídica en función del tiempo de seguimiento. En dos de ellos (D y H) estos cambios fueron sinónimos, mientras que en los cinco restantes se observó una frecuencia de sustituciones no sinónimas que osciló entre 37,5 y 71,4% (Tabla 4). La mayoría de las sustituciones se observaron en la HVR1 (Apéndice, Figura A4 y A5).

Paciente	Genotipo	Tiempo (meses)	Cambios		dN/dS	dN (%)
			Totales	No Sinónimos		
A	1a	3,3	0	0	-	-
E	1a	21,2	12	5	0,71	41,6
H	1a	2,2	2	0	0,00	0,0
B	1b	27,7	8	3	0,60	37,5
C	1b	26,1	12	8	2,00	66,7
F	1b	32,7	14	10	2,50	71,4
I	1b	21,4	23	11	0,92	47,8
D	3a	16,5	12	0	0,00	0,0
G	3a	23,4	58	25	0,76	43,1
Total			141	62	0,78	43,9

Tabla 4. Análisis de sustituciones nucleotídicas en la región E2 (nt 1443-2013). Se determinó el número de sustituciones nucleotídicas sinónimas y no sinónimas entre las muestras de cada paciente. En la tercera columna se indica el periodo de tiempo entre la primer y última muestra de cada paciente. El fragmento analizado tiene una longitud de 571 nucleótidos.



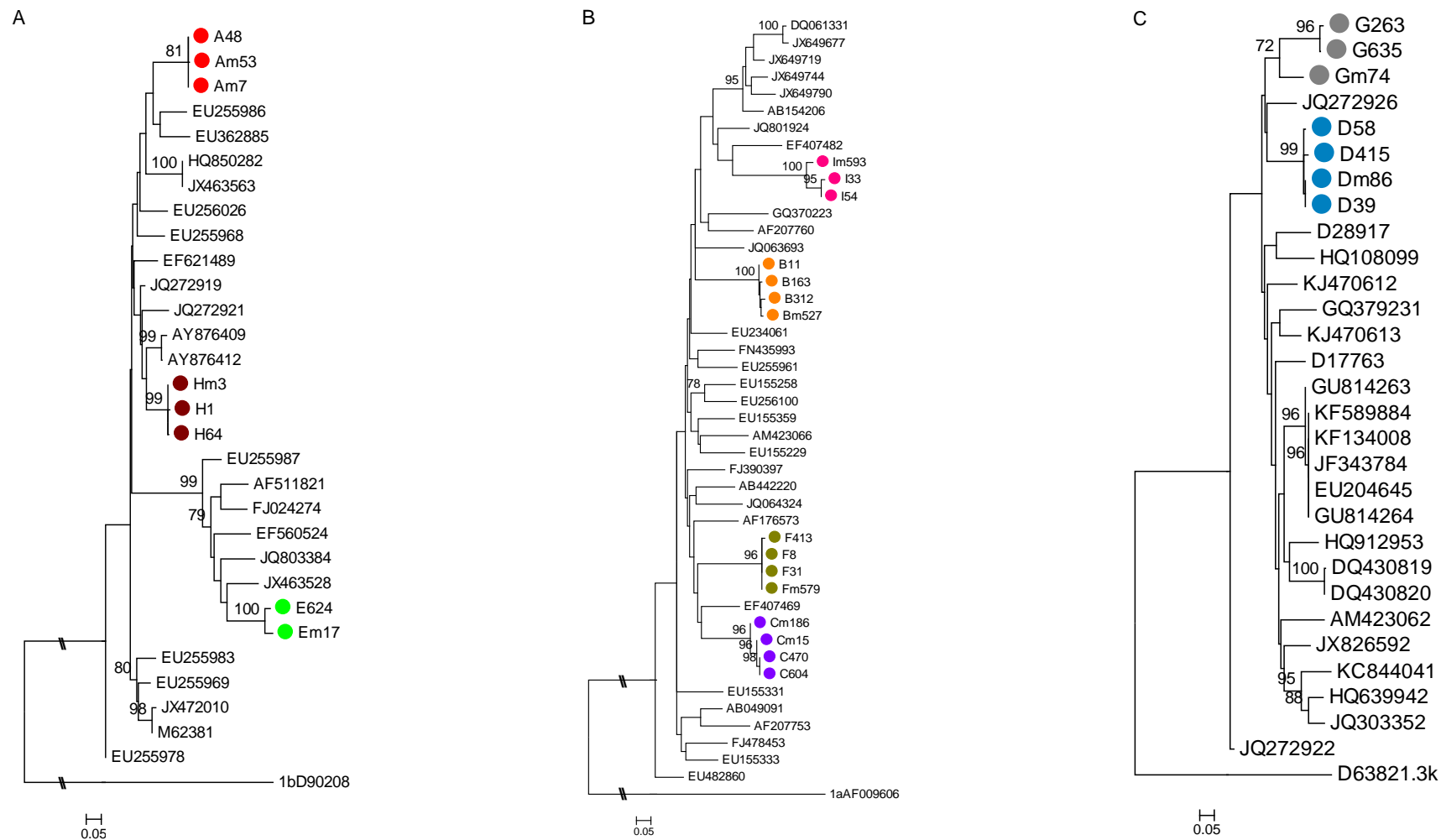


Figura 8. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región E2 (nt 1443-2013) de las muestras de cada paciente. Árbol de máxima verosimilitud (ML) de muestras correspondientes a los 9 pacientes (A-I). Panel A: pacientes infectados con el sg1a (A, E y H), Panel B: pacientes infectados con el sg1b (B, C, F e I), Panel C: pacientes infectados con el sg3a (D y G). El número en cada nodo corresponde a valores porcentuales de bootstrap obtenidos a partir de 1.000 réplicas (los valores menores a 60% no se muestran). Las secuencias están indicadas con el código del paciente (A-I) y los días respecto a la fecha del trasplante. m: previo al trasplante.

En las secuencias de los pacientes B, C, G e I se observaron agrupamientos internos con valores significativos de soporte de la topología. Observándose en C, G e I que las secuencias pretrasplante se agruparon separadamente de las secuencias postrasplante (Figura 9). Este resultado sugiere que en estos últimos tres pacientes, el trasplante podría haber ejercido una presión selectiva sobre las poblaciones virales presentes antes del trasplante. En los otros cuatro pacientes (H, A, D y F), en los que se analizaron más de dos muestras, no se observó un agrupamiento diferencial entre las secuencias pre y postrasplante.

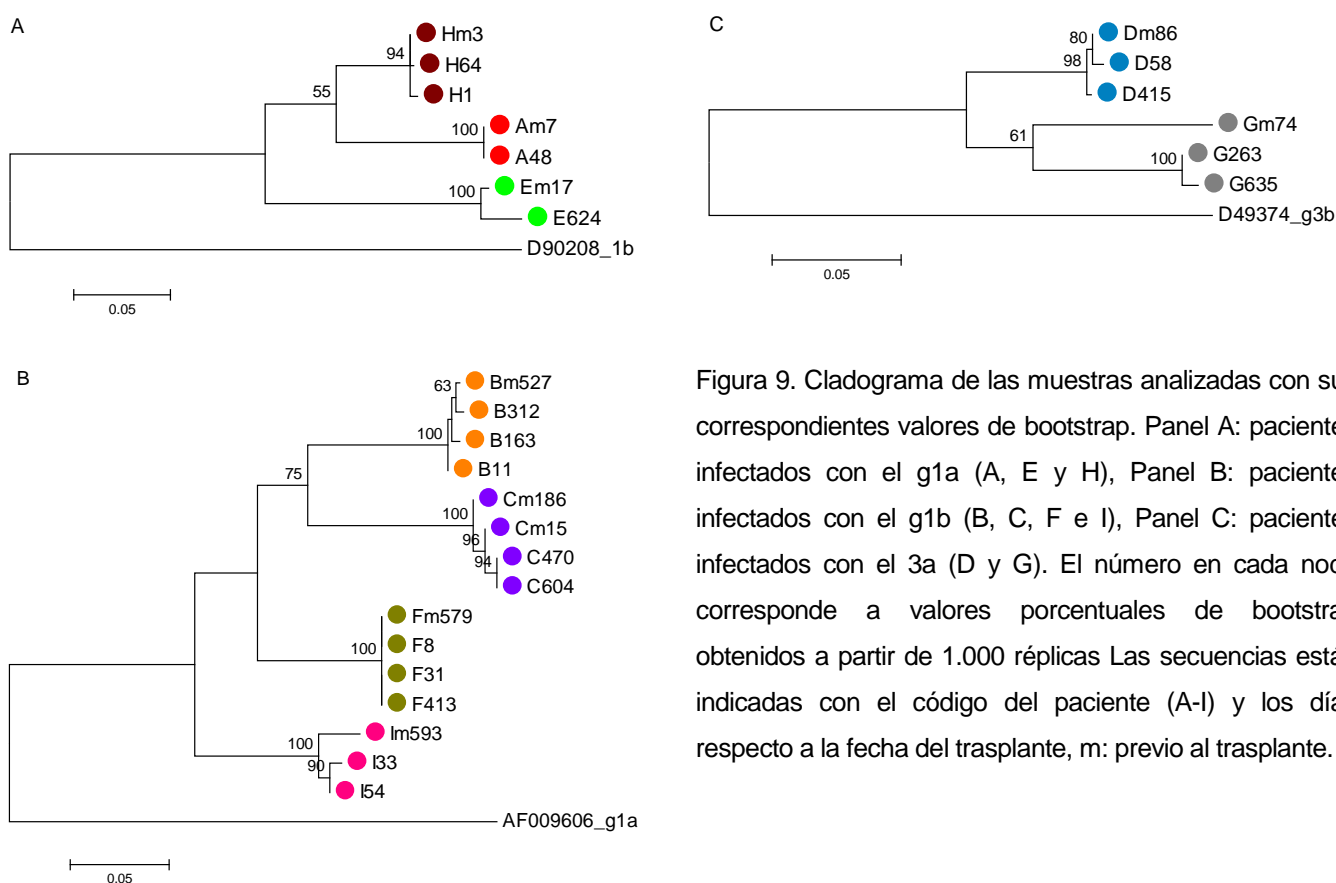


Figura 9. Cladograma de las muestras analizadas con sus correspondientes valores de bootstrap. Panel A: pacientes infectados con el g1a (A, E y H), Panel B: pacientes infectados con el g1b (B, C, F e I), Panel C: pacientes infectados con el 3a (D y G). El número en cada nodo corresponde a valores porcentuales de bootstrap obtenidos a partir de 1.000 réplicas. Las secuencias están indicadas con el código del paciente (A-I) y los días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante.

El análisis de las sustituciones en la región E2, considerando el intervalo de tiempo entre muestras, permitió observar en todos los casos excepto en el paciente G, un patrón de sustituciones secuencial y acumulativo en función del tiempo (Figura 10). Este resultado sugiere un constante mecanismo de adaptación del virus a la presión ejercida por el hospedador.

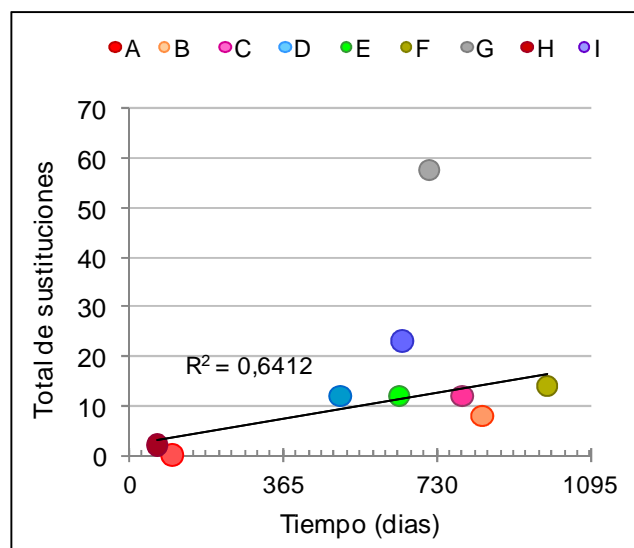


Figura 10: Sustituciones nucleotídicas en la región E2 en función del tiempo de seguimiento de cada paciente. El valor obtenido en las muestras del paciente G fue exceptuado en el cálculo del coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

#### 6.4. Análisis filogenético de la región Core

Se determinó la secuencia parcial del gen Core (nt 302-875) en 25 muestras correspondientes a 7 pacientes (A-D, F, G, I). Las secuencias de cada paciente formaron clados monofiléticos, con valores significativos de *bootstrap* (Figura 11).

En un paciente (A) la secuencia se mantuvo invariable durante el seguimiento, mientras que en las secuencias de los restantes 6 pacientes se observaron entre 3 y 7 cambios en la secuencia nucleotídica. En dos de ellos (B y F) estos cambios fueron sinónimos, mientras que en los cuatro restantes se observó una frecuencia de sustituciones no sinónimas que osciló entre 20,0 y 66,7%. (Tabla 5).

Paciente	Genotipo	Tiempo (meses)	Cambios			dN/dS	dN (%)
			Totales	No Sinónimos	Sinónimos		
A	1a	3,3	0	0	0	-	-
B	1b	21,2	3	0	3	0,00	0,0
C	1b	2,2	3	2	1	2,00	66,7
F	1b	27,7	3	0	3	0,00	0,0
I	1b	26,1	5	3	2	1,50	60,0
D	3a	32,7	5	1	4	0,25	20,0
G	3a	21,4	7	2	5	0,40	28,5
Total			26	8	18	0,44	30,7

Tabla 5. Análisis de sustituciones nucleotídicas en la región Core (nt 302-875). Se determinó el número de sustituciones nucleotídicas sinónimas y no sinónimas entre las muestras de cada paciente. En la tercera columna se indica el periodo de tiempo entre la primer y última muestra de cada paciente. El fragmento analizado tiene una longitud de 574 nucleótidos.

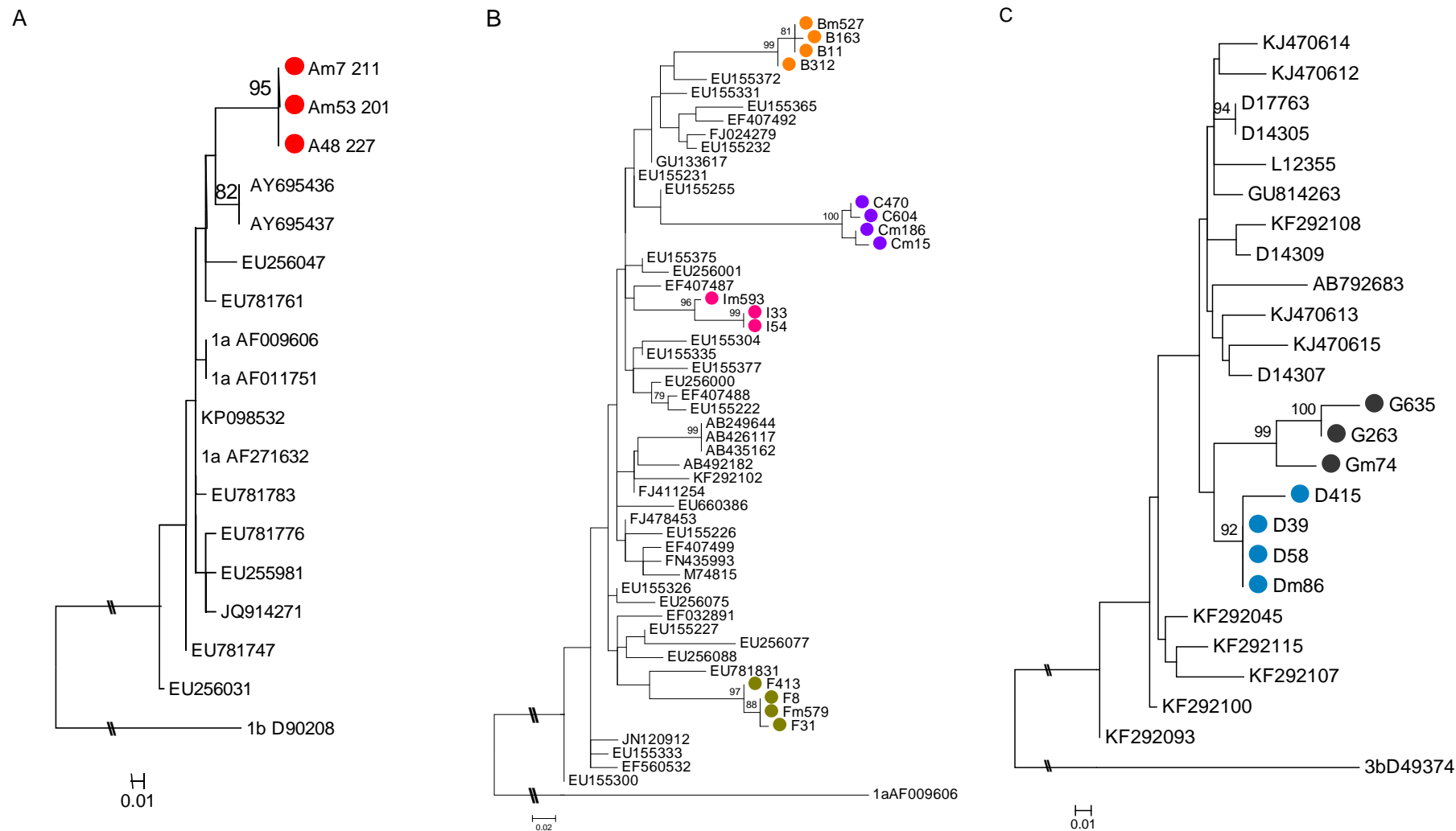


Figura 11. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región Core (nt 302-875) de muestras de cada paciente. Árbol de máxima verosimilitud (ML) de 25 muestras correspondientes a 7 pacientes (A-D, F, G, I). Panel A: paciente infectado con el sg1a (A), Panel B: pacientes infectados con el sg1b (B, C, F e I), Panel C: pacientes infectados con el sg3a (D y G). El número en cada nodo corresponde a valores porcentuales de bootstrap obtenidos a partir de 1.000 réplicas (los valores menores a 60% no se muestran). Las secuencias están indicadas con el código del paciente (A-I) y los días respecto a la fecha del trasplante. m: previo al trasplante.

### 6.5. Análisis comparativo de la evolución de las diferentes regiones virales

Las regiones estudiadas presentaron diferentes grados de variabilidad nucleotídica (E2>Core>NS5B), lo cual se correlaciona con el papel biológico que desempeña cada una de estas.

En la región NS5B, considerando las sustituciones nucleotídicas entre las muestras de cada paciente, se observó un total de 23 cambios ( $2,6 \pm 3,0$  por paciente, la mayoría de los cuales 19/23 (82,6%) fueron sinónimos; lo cual se correlacionaría con la función ARN polimerasa dependiente de ARN de la proteína NS5B y su implicancia en el ciclo de replicación del HCV (Figura 12).

Asimismo, en la región E2 se observaron 141 sustituciones ( $15,7 \pm 17,2$  por paciente) entre todas las muestras de los 9 pacientes, siendo no sinónimas en el 62/141 (43.9%) de los casos. La variabilidad en la región E2 se halló concentrada principalmente en la HVR1, lo cual refleja la presión selectiva por parte del sistema inmunitario a la que está sujeta esta región.

Por último, la región Core mostró un nivel de sustituciones similar a la región NS5B (n=26) ( $3,7 \pm 2,2$  por paciente); sin embargo, en esta región la frecuencia de sustituciones no sinónimas fue mayor 8/26 (30,7%).

El análisis comparativo por región del total de sustituciones por paciente, permite observar una tasa significativamente mayor en la región E2, respecto a las regiones NS5B y Core. Mientras que en el análisis de la relación de sustituciones sinónimas y no sinónimas, se observa mayores tasas en la región E2, intermedia en la región Core y menor en la región NS5B (Figura 13).

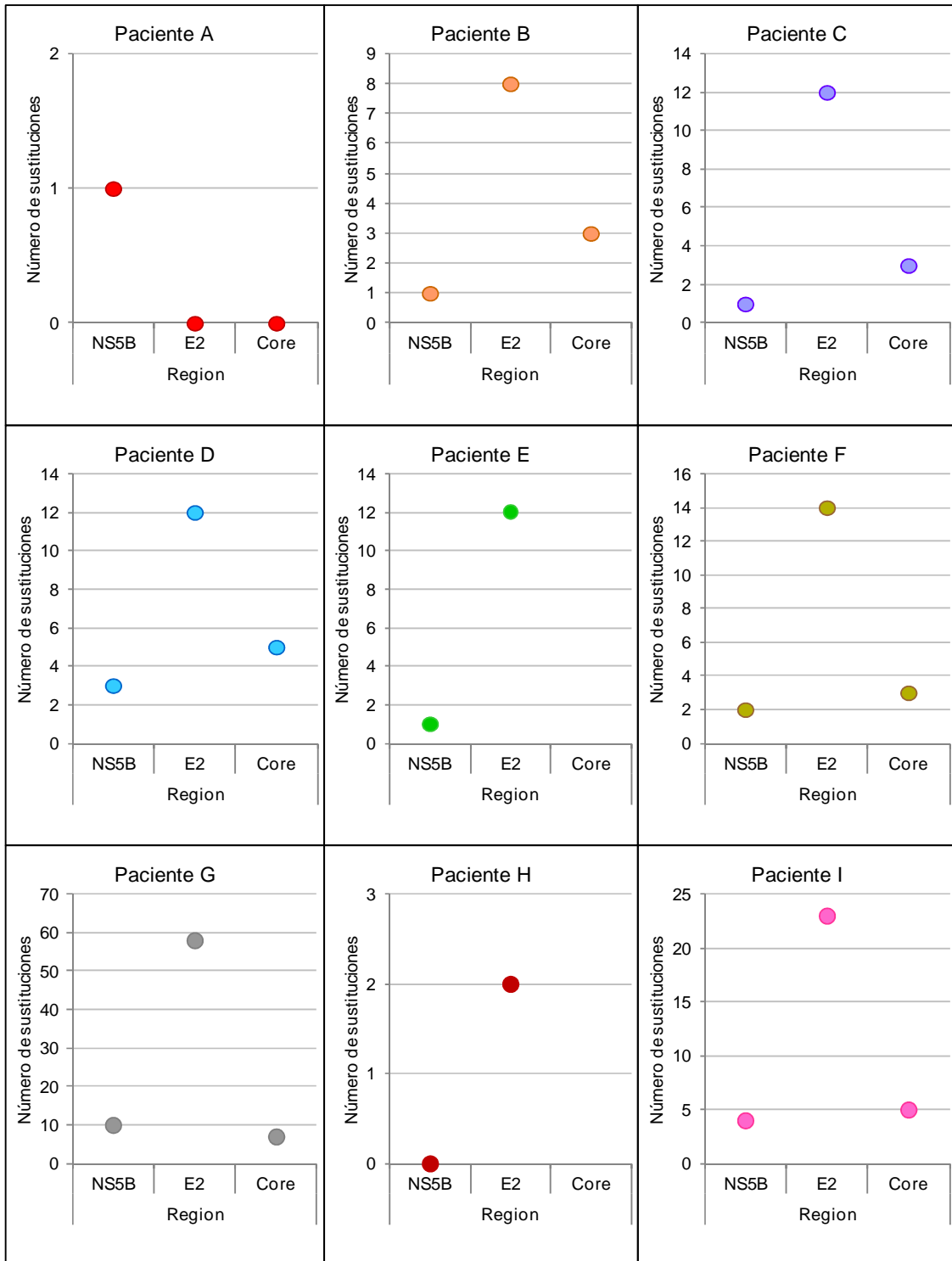


Figura 12: Análisis comparativo del número de sustituciones en cada paciente para cada región.

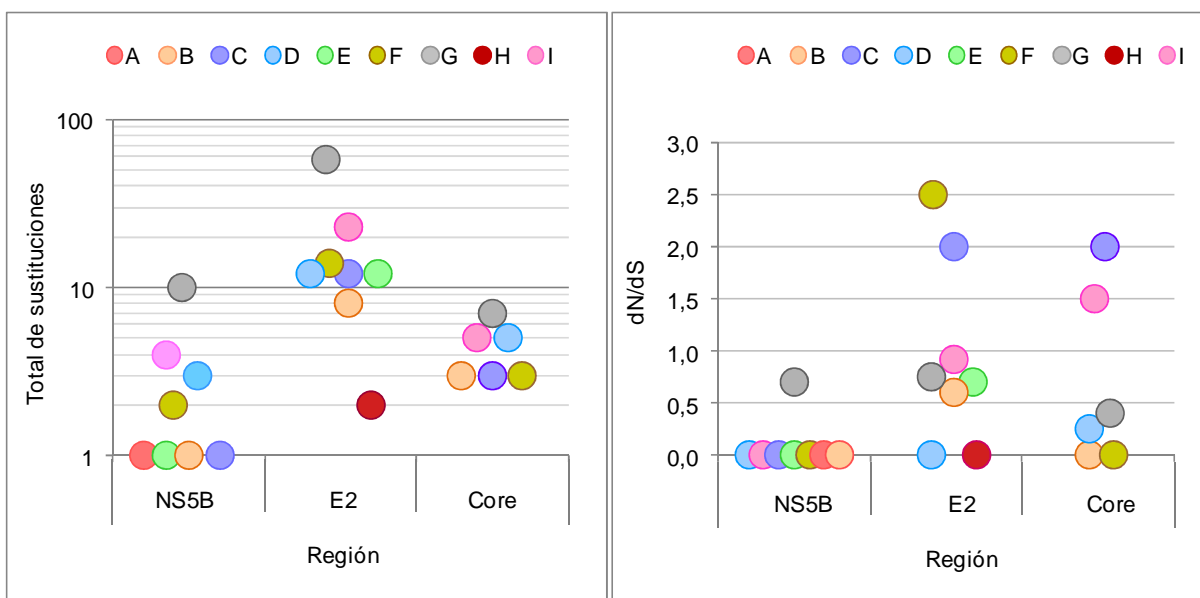


Figura 13: Análisis comparativo por región del total de sustituciones y la relación de sustituciones sinónimas y no sinónimas. No se graficaron aquellos casos en los que no se observaron sustituciones.

#### 6.6. Análisis filogenético de los clones

Las diferencias observadas en el patrón evolutivo entre los dos pacientes infectados con el genotipo 3a (D y G) nos condujo a realizar, una caracterización de las poblaciones virales pre y postrasplante, mediante el análisis de clones.

La regiones E2 y NS5B de una muestra pretrasplante y una muestra postrasplante de los pacientes infectados con el subgenotipo 3a (D y G) fueron clonadas. Se secuenciaron entre 13 y 23 clones de cada muestra y región (Tabla 6).

Paciente	Muestra	Región	
		NS5B	E2
D	m86	20	16
	58	20	13
G	m74	22	21
	263	18	22

Tabla 6. Clones de las regiones NS5B y E2 de pacientes infectados con el sg3a (DyG). m: previo al trasplante.



### 6.6.1. Análisis filogenético de la región NS5B

Se determinó la secuencia parcial directa del gene NS5B (nt 8384-8720) en 80 clones correspondientes a los 2 pacientes infectados con el subgenotipo 3a (D y G).

Los clones de las dos muestras del paciente D formaron un clado monofilético con un valor significativo de *bootstrap*; sin embargo, aquellos provenientes de la muestra pretrasplante (Dm86) se entremezclaron con los de la muestra postrasplante (D58) (Figura 14). Este resultado sugiere que el trasplante no implicó una presión selectiva en esta región sobre las poblaciones presentes previas al trasplante. Asimismo, debe considerarse que esta región presenta una señal filogenética limitada debido a su grado de conservación.

En cuanto respecta a los clones de las muestras del pacientes G, en la topología del árbol filogenético se observan dos clados sin soporte de *bootstrap*, en uno de los clados se hallan la mayoría de los clones provenientes de la muestra pretrasplante (n=16, 72,7%), mientras que en el otro clado se encuentran la mayoría de los clones de la muestra postrasplante (n=17, 94.4%). En este caso podría especularse que el trasplante se comportó como un “cuello de botella” favoreciendo la selección de una población minoritaria presente previamente al trasplante.

### 6.6.2. Análisis filogenético de la región E2

Se determinaron las secuencias parciales directas del gene E2 en 72 clones correspondientes a los 2 pacientes infectados con el genotipo 3a (D y G).

Los clones de las dos muestras del paciente D formaron un clado monofilético con un valor significativo de *bootstrap* (Figura 15).

La topología del árbol muestra agrupamientos internos, sin valores significativos de soporte, que contienen exclusivamente secuencias de la muestra pretrasplante (Dm86) o

de la muestra postrasplante (D58). Por otra parte, junto con los clones de la muestra pretrasplante se agrupan 3 clones de la muestra postrasplante.

En modo similar, los clones del paciente G formaron dos clados principales, los cuales a su vez mostraron agrupamientos internos con valores de *bootstrap* mayores a 70. Uno de estos clados contiene la mayoría de los clones pretrasplante ( $n=18$ , 85,7%), mientras que el otro clado contiene la totalidad de los clones postrasplante y un clon proveniente de la muestra pretrasplante (Gm74).

#### 6.7. Diversidad genética de los clones

Para evaluar la diversidad genética de los clones de cada muestra se analizó la distancia nucleotídica para cada set de secuencias, expresado como la media  $\pm$  error estándar (Tabla 7).

Paciente	Muestra	NS5B	E2
D	m86	0,009 $\pm$ 0,003	0,007 $\pm$ 0,002
	58	0,010 $\pm$ 0,003	0,013 $\pm$ 0,003
G	m74	0,029 $\pm$ 0,005	0,009 $\pm$ 0,003
	263	0,008 $\pm$ 0,002	0,006 $\pm$ 0,001

Tabla 7. Distancia genética entre los clones de cada muestra y región.

En los clones provenientes de las muestras del paciente D, tanto en la región NS5B como en la región E2, no se observaron cambios significativos en la distancia genética presente en la muestra pretrasplante respecto de la muestra postrasplante.

Contrariamente, en los clones provenientes de las muestras del paciente G se observó una mayor diversidad en los clones de la muestra pretrasplante respecto a la muestra postrasplante para la región NS5B, mientras que esta diferencia no se observó en los clones de la región E2.

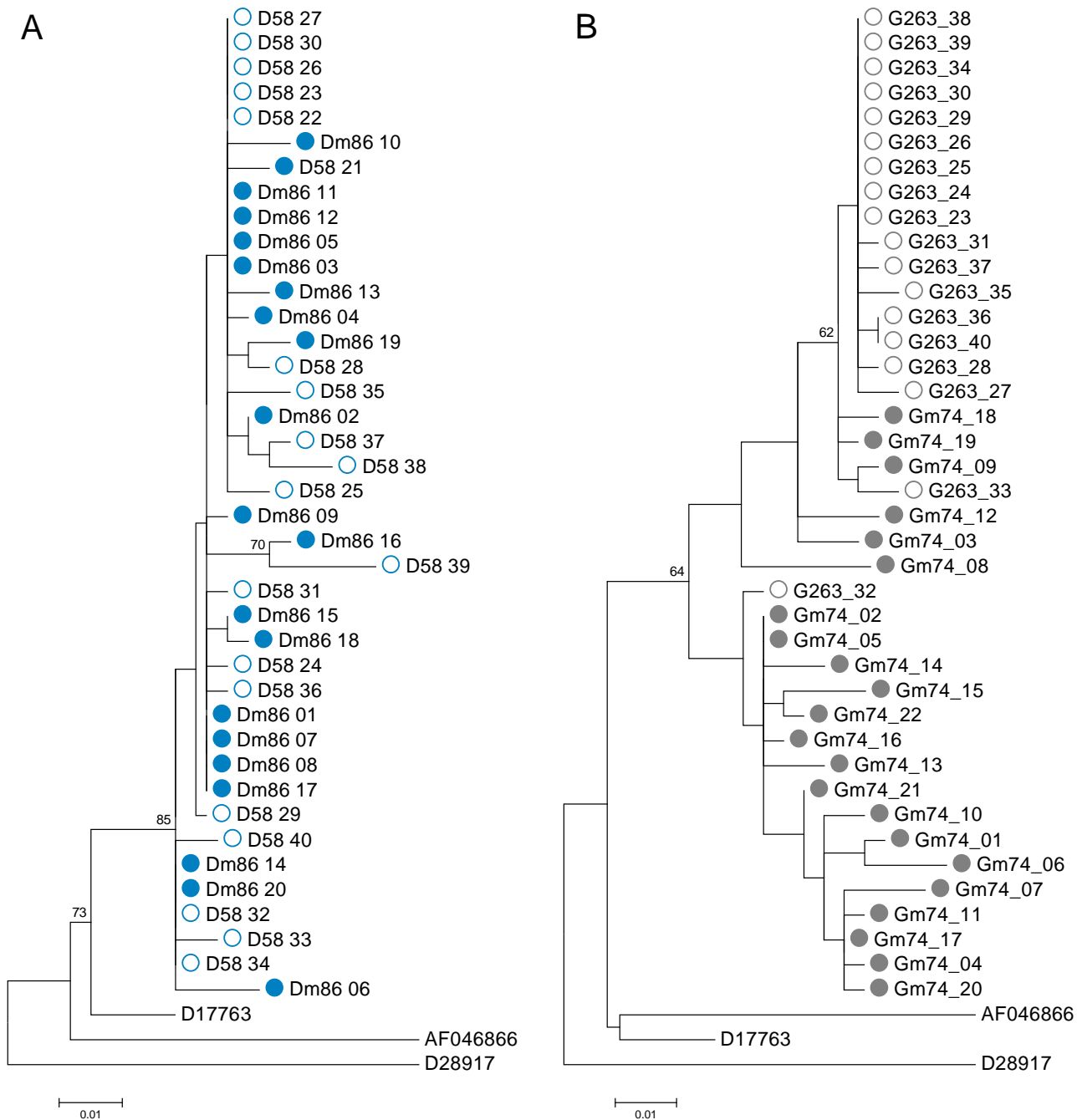


Figura 14. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región NS5B en los clones. Árbol de máxima verosimilitud (ML) correspondientes a 80 clones de los pacientes D y G. Panel A: Paciente D, 20 clones pretrasplante (Dm86) y 20 clones postrasplante (D58), Panel B: paciente G, 22 clones pretrasplante (Gm74) y 18 clones postrasplante (G263). El número en cada nodo corresponde a valores porcentuales de bootstrap obtenidos a partir de 1.000 réplicas (los valores menores a 60% no se muestran). Las secuencias están indicadas con el código del paciente (D o G) y los días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante. ● Pretrasplante, ○ postrasplante.

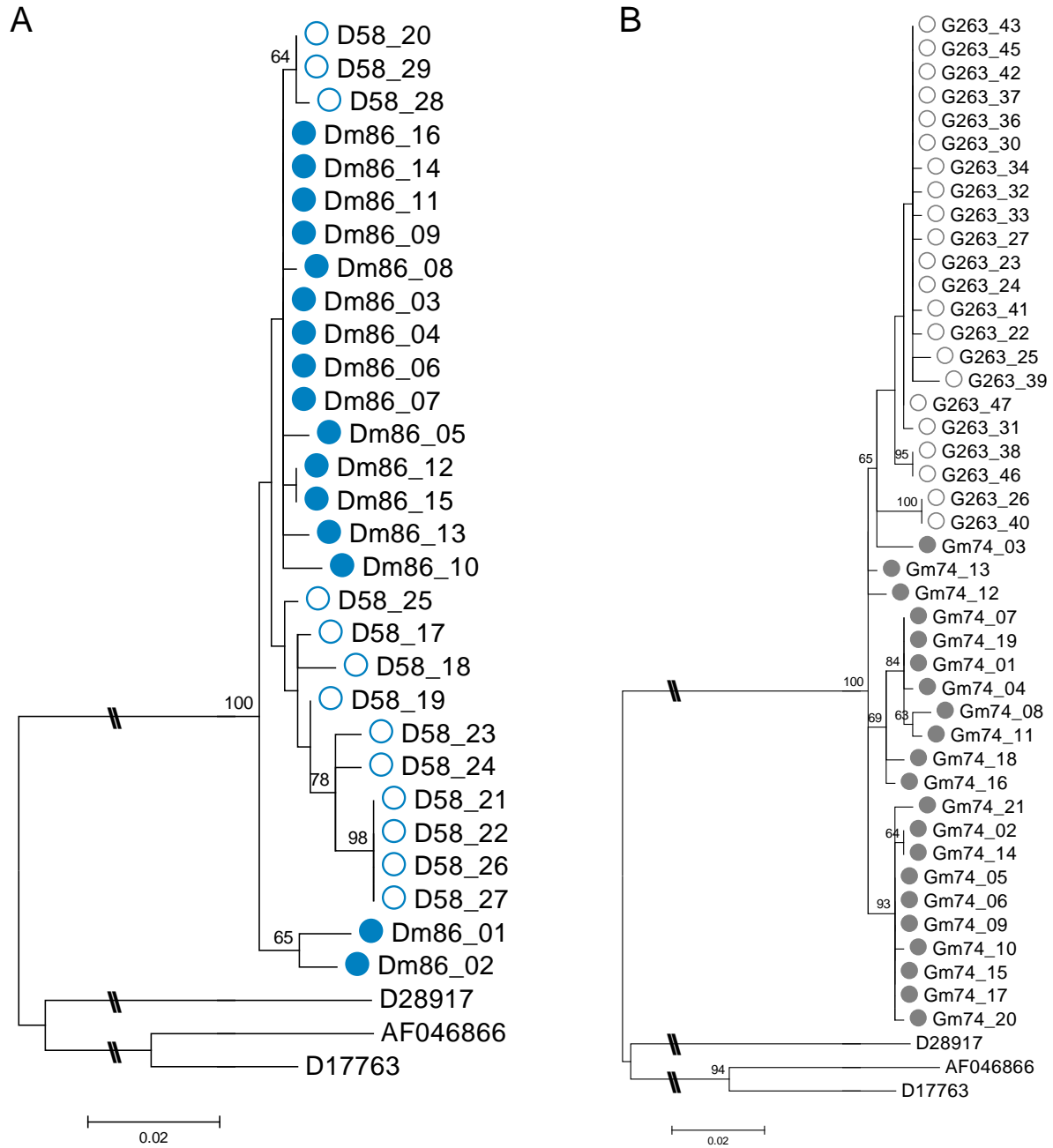


Figura 15. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídica de la región E2 en los clones. Árbol de máxima verosimilitud (ML) correspondientes a 72 clones de los pacientes D y G. Panel A: Paciente D, 16 clones pretrasplante (Dm86) y 13 clones postrasplante (D58), Panel B: paciente G, 21 clones pretrasplante (Gm74) y 22 clones postrasplante (G263). El número en cada nodo corresponde a valores porcentuales de bootstrap obtenidos a partir de 1.000 réplicas (los valores menores a 60% no se muestran). Las secuencias están indicadas con el código del paciente (D o G) y los días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante. ● Pretrasplante, ○postrasplante.

### 6.8. Complejidad genética de los clones

Para evaluar la complejidad genética de los clones de cada muestra se analizó la entropía normalizada de Shannon (SN) para cada set de secuencias.

La variación en la diversidad y la complejidad genética entre las muestras pre- y postrasplante en el paciente D fue exigua (Tabla 8). Contrariamente, en el paciente G, se observa menor diversidad y disminución de complejidad genética en ambas regiones entre las muestras pre- y post- trasplante. Esto sugiere la ocurrencia de un “cuello de botella” que ejerce una presión sobre la población viral, dando como resultante la selección de una población minoritaria.

Paciente	Región Muestra	NS5B		E2	
		SN	$\Delta$ SN	SN	$\Delta$ SN
D	m86	0,3602		0,4605	
	58	0,5926	0.2324	0,5810	0.1205
G	m74	0,7604		0,6879	
	263	0,3077	-0.4527	0,3454	-0.3425

Tabla 8. Entropía normalizada de Shannon entre los clones de cada muestra y región.

## 7. DISCUSION

El trasplante hepático es una oportunidad única para estudiar la evolución genética del HCV ya que las cuasiespecies circulantes que están en equilibrio dinámico requieren de una rápida adaptación a una situación derivada de la eliminación de la principal fuente de producción de virus (el parénquima hepático) y la implantación de un órgano no infectado. El estudio de la evolución genética en este contexto es complejo, ya que la infección se produce en un marco de fuerte inmunosupresión, así como en presencia de una respuesta inmune previamente establecida.

En este trabajo se abordó la caracterización de la evolución del HCV en pacientes trasplantados, mediante el análisis de la secuencia nucleotídica de diferentes regiones virales en muestras pre y post-trasplante.

La mayor limitación de este estudio retrospectivo ha sido la disparidad en los tiempos de muestreo analizados en los diferentes pacientes, tanto la diferencia de tiempo de las muestras respecto del trasplante, así como en el total de tiempo transcurrido entre la primera y última muestra de cada paciente. El tiempo es una variable crucial en la evolución viral, por lo tanto la arbitrariedad en los tiempos de muestreo ha limitado la posibilidad de comparar los resultados obtenidos entre los diferentes pacientes.

Asimismo, otra limitación es el tamaño de la cohorte analizada, teniendo en cuenta las diferentes variables asociadas a la evolución viral tales como: el estado inmunológico y *background* genético del receptor del órgano, el genotipo viral y la presencia de coinfecciones.

A partir de la identificación y caracterización del HCV a fines de la década de los años 80', se observó una significativa divergencia entre los diferentes aislamientos que habían sido caracterizados, lo cual condujo a la identificación de los genotipos [126]. Asimismo, pudo establecerse que los genotipos del HCV tenían implicancias tanto en la evolución de la infección, así como en la respuesta al tratamiento antiviral [127].

En la cohorte analizada en este estudio la mayoría de los pacientes se hallaban infectados con el genotipo 1, tres de ellos con el subgenotipo 1b (33,3%) y cuatro con el subgenotipo 1a (44,4%), mientras que los dos restantes se hallaban infectados con el subgenotipo 3a (22.2%). Esta distribución es análoga a la distribución de genotipos descrita en la población infectada en la Argentina, en particular en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires [44-46].

La distribución uniforme de genotipos entre la población infectada y los pacientes trasplantados sugiere que no habría una implicancia determinante del genotipo viral que conlleve a la necesidad de someterse a un trasplante hepático.

Respecto a la implicancia del genotipo viral en la severidad de la recurrencia de la infección, de los cinco casos con recurrencia severa, tres estaban infectados con el g1b y 2 con el g1a; mientras que aquellos con recurrencia moderada estaban infectados con el g1a en dos casos y con el g3a en los dos casos restantes. El tamaño de la cohorte impide realizar especulaciones respecto de la influencia del genotipo en la severidad de la recurrencia.

La influencia del genotipo en la severidad de la recurrencia de la infección es motivo de controversia. Algunos estudios demostraron que la gravedad de la recurrencia y los niveles de replicación viral del HCV después del trasplante hepático son más altos en los pacientes infectados por el g1 que en aquellos infectados con otros genotipos [107,1128-130]. Por el contrario, Gayowski y colaboradores observó que la tasa y la severidad de la recurrencia no difiere entre genotipos, sugiriendo que el genotipo del HCV podría no ser un factor relevante en la hepatitis C postrasplante [131].

En este estudio se determinó la evolución de tres proteínas del HCV con diferentes características funcionales en la replicación viral. Este abordaje permitió caracterizar la interacción virus hospedador en tres marcos diferentes de la biología del virus.

El análisis de la secuencia de la región NS5B pre y postrasplante mostró un bajo número de sustituciones intrapaciente, lo cual se reflejó en una señal filogenética limitada. Esta región, que codifica una proteína con actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN, fue la más conservada en la mayoría de los casos. Asimismo, las sustituciones observadas en su gran mayoría fueron sinónimas (85.2%). Esto sugiere que debido a su papel en el ciclo de replicación esta región presenta una fuerte restricción a la fijación de sustituciones.

Este resultado concuerda con lo observado por Blackard y colaboradores, quienes hallaron que el valor medio de dN-dS para NS5B era -0.011 (rango, -0.035 a 0.005) [132], lo cual sugiere una presión de selección negativa y/o una



restricción funcional de la actividad enzimática de la proteína que limitan la variabilidad de NS5B en comparación con otras regiones del genoma [133].

Contrariamente, en la región E2, que se halla presente en la envoltura del virión y contiene dominios involucradas en la interacción con los receptores celulares que median la adsorción y la entrada del virus, se observó una frecuencia de sustitución significativamente mayor que en la región NS5B y en el 43.9% de los casos las sustituciones fueron no sinónimas.

La variabilidad en esta región se halló focalizada en el dominio HVR1; diferentes estudios han demostrado que los cambios que ocurren en este dominio emergen con un patrón compatible con la selección y el escape de la respuesta inmune [134,135]. Esto refleja la presión selectiva, por parte del sistema inmunitario, a la que está sujeta esta región.

Así, los hallazgos obtenidos en este estudio concuerdan con los numerosos trabajos que han abordado la caracterización de la región E2, poniendo de relieve la implicancia de esta región en la persistencia de la infección y en el rol que cumple en la interacción entre el virus y el hospedador.

Este aspecto de adaptabilidad proporciona un paradigma fascinante para explorar las complejas presiones de selección que subyacen a la evolución del HCV y de otros virus causales de infecciones persistentes [136].

Finalmente, en la región del Core se observó una frecuencia de sustituciones similar a la región NS5B; no obstante la tasa de sustituciones no sinónimas fue mayor (17,3% vs 30,7%).

Se ha demostrado que la proteína del Core se halla asociada a diferentes proteínas y vías de señalización celular que tienen efecto directo sobre la biología y el ciclo de replicación del HCV [16,137], lo cual implicaría un cierto

grado de restricción a las sustituciones. Asimismo, diferentes estudios, basados en el mapeo con péptidos sintéticos, han identificado en la proteína de la cápside del HCV numerosos epitopes altamente inmunogénicos [138-142], lo cual implica que la región se halla bajo cierta presión positiva de selección. Estas características funcionales y estructurales de la proteína Core justificarían la frecuencia de sustituciones y la relación entre sustituciones sinónimas y no sinónimas observadas.

Estos resultados en su conjunto reflejan una estrecha relación entre la evolución y el papel que cada una de las proteínas de HCV cumplen en la biología del virus. Asimismo, los resultados obtenidos se corresponden con los antecedentes bibliográficos, al caracterizar la variabilidad del HCV a lo largo de su genoma [136,143].

Las secuencias nucleotídicas de las diferentes regiones de cada paciente formaron clados con alto valor de soporte (excepto el paciente G), sugiriendo que el trasplante no significó en la mayoría de los casos, en el marco de una fuerte inmunosupresión y en presencia de una respuesta inmune previamente establecida, un evento de presión selectiva positiva que significara un cambio en la cuasiespecie predominante previo al trasplante, de modo tal de modificar significativamente la secuencia consenso.

Sin embargo, en el análisis filogenético de la región E2, en tres de los siete pacientes en los cuales se analizaron más de 2 muestras, se observaron agrupamientos internos con valores significativos de soporte de la topología en los cuales se hallaban separadas las secuencias pretrasplante de las postrasplante. Este resultado sugiere que el trasplante podría implicar la

selección de una población minoritaria con mayor adaptación al escenario postrasplante.

En cuanto a la evolución del HCV en pacientes con diferente severidad de recurrencia, los resultados obtenidos no sugieren una asociación entre la severidad de la recurrencia del HCV y un patrón específico de la evolución.

Este resultado debe ser interpretado con cautela debido al tamaño de la muestra y al hecho de que las variables no intrínsecamente relacionadas con el HCV podrían influir en la severidad de la recurrencia.

Con la finalidad de evaluar la implicancia del trasplante en la heterogeneidad viral se realizó el análisis de las poblaciones pre y postrasplante, de las regiones E2 y NS5B, en dos pacientes (D y G) que mostraron un patrón evolutivo dispar. Ambos infectados con el genotipo 3a y seguidos durante un período de tiempo similar.

En el paciente D, no se observó una diferencia significativa en la diversidad y complejidad entre la muestra pretrasplante (Dm86) y la muestra postrasplante (D58) en ninguna de las dos regiones analizadas. Contrariamente, en el paciente G se observó una complejidad viral reducida en la muestra postrasplante (G263) con respecto a la presente en la muestras pretrasplante (Gm74) en la región NS5B y en menor magnitud en la región E2. Asimismo, se observó una disminución en la complejidad en ambas regiones.

La implicancia del trasplante hepático en la evolución del HCV es motivo de controversia. Algunos estudios sugieren que luego del trasplante, en ausencia de la presión inmune efectiva debido a la inmunosupresión, la población viral se vuelve más homogénea. Señalando que la diversidad viral pretrasplante se

reduce como consecuencia del "cuello de botella" que implica el trasplante, resultando en una presión selectiva de la variante viral que mejor se adapta al escenario postrasplante [120,144,145].

Contrariamente al escenario de "cuello de botella", otros estudios han descrito que múltiples linajes HCV se transmiten en el momento del trasplante, sin una disminución importante en la diversidad genética viral [146-148].

En un estudio prospectivo, Gray y colaboradores analizaron las poblaciones virales de la región E2 en diez pacientes trasplantados y observaron que en las muestras dentro de los primeros 4 meses postrasplante sólo algunos de los linajes pretrasplante se hallaban presentes; sin embargo, en muestras posteriores a los 20 meses postrasplante los ancestros de la mayoría de los linajes fueron identificados, lo cual sugiere que estos se hallaban presentes [148]. Este estudio pone de manifiesto la relevancia el tiempo de muestreo en el análisis de la evolución de HCV en la recurrencia postrasplante y permite elucidar, en cierto modo, las discrepancias observadas entre los diferentes estudios.

Sigue siendo controvertido el significado clínico de la evolución de las cuasiespecies en una infección establecida. Li y colaboradores [149] encontraron que mayores niveles de diversidad se correlacionan con recurrencias menos severas (presumiblemente a causa de una respuesta inmune más fuerte al virus), mientras que Pessoa y colaboradores [150] mostraron que los pacientes trasplantados inmunodeprimidos tienen mayor diversidad de cuasiespecies que los pacientes inmunocompetentes no trasplantados.

Los resultados obtenidos en este estudio no permiten establecer una asociación entre la severidad de la recurrencia de la infección, la evolución viral, el genotipos viral y/o la presencia de coinfecciones. Sin embargo, esta apreciación está limitada por el reducido tamaño de la cohorte analizada.

Finalmente, en este estudio se ponen de manifiesto patrones evolutivos peculiares de las diferentes regiones del virus analizadas, las cuales están estrechamente relacionadas con su función en el ciclo de replicación.

Las discrepancias observadas en los diferentes estudios que abordan esta temática están condicionadas por: el tamaño de cohorte de pacientes analizados, la metodología utilizada (secuenciación, clonado seguido de secuenciación, SSCP) y la región del virus analizada (en la mayoría de los casos se focalizan en la región E2).

La recurrencia postrasplante de la infección por HCV es prácticamente universal ya que sucede en la amplia mayoría de los pacientes. Sin embargo, la severidad de la misma parecería ser un evento multifactorial, en el cual la implicancia de la evolución viral no sería determinante en forma exclusiva.

## 8. CONCLUSIONES

La caracterización de la evolución viral en el contexto del trasplante hepático proporciona un paradigma fascinante para explorar las complejas presiones de selección que subyacen a la interacción virus-hospedador.

La evolución de las diferentes regiones del HCV guarda una estrecha relación con el papel que cada una de las proteínas cumple en la biología del virus.

La región NS5B presenta un elevado grado de conservación probablemente asociado a la restricción funcional de la actividad enzimática de la proteína.

La evolución de la región E2 sigue un patrón de sustituciones secuencial y acumulativo en función del tiempo, compatible con la selección y el escape de la respuesta inmune, consecuencia de la presión selectiva por parte del sistema inmunitario a la que está sujeta esta región.

La evolución de la región Core depende de una compleja interacción finamente equilibrada entre la selección negativa debida a sus características funcionales y la selección positiva debida a sus propiedades antigénicas.

Si bien el trasplante hepático puede implicar un efecto de “cuello de botella” sobre las poblaciones virales pretrasplante, este evento no se verifica en todos los casos.

La recurrencia postrasplante de la infección por HCV es prácticamente universal ya que sucede en la amplia mayoría de los pacientes. Sin embargo la severidad de la misma parecería ser un evento multifactorial, en el cual la implicancia de la evolución viral no sería determinante en forma exclusiva.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-361.
2. Alter M, Margolis H, Krawczynski K, Judson F, Mares A, Alexander W, Hu P, Miller J, Gerber M, Sampliner R. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States; The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med.* 1992; 327:1899-1905.
3. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* 2013; 57:1333-1342.
4. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015; 61:77-87.
5. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 2006; 3:47-52.
6. Lee MH, Yang HI, Yuan Y, L'Italien G, Chen CJ. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:9270-9280.
7. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 2014; 61:S58-S68.
8. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J.* 2011 11; 8:161.
9. Moradpour D, Penin F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 369:113-42.
10. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39:5-19.
11. Lyons A, Lytle J, Gomez J, Robertson H. Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of steem-loop II. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:2535-2541.
12. Koutsoudakis G, Fornis X, Pérez-Del-Pulgar S. *Gastroenterol Hepatol.* 2013; 36:280-93.
13. Boulant, S, Vanbelle, C; Ebel, C; Penin, F y Lavergne, JP. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol.* 2005; 79:11353-11365.
14. 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; 82:7964-7976.
15. 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; 9:1089- 1097.
16. McLauchlan, J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat.* 2000; 7:2-14.
17. Koike K. The oncogenic role of hepatitis C virus. *Recent Results Cancer Res.* 2014; 193:97-111.

18. Shavinskaya, A; Boulant, S; Penin, F; McLauchlan, J y 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; 282: 37158-37169.
19. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001; 7: 710-721.
20. Voisset, C y Dubuisson, J. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell*. 2004; 96:413-420.
21. Penin, F; Combet, C; Germanidis, G; Frainais, PO; Deleage, G y Pawlotsky, JM. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol*. 2001; 75:5703-5710.
22. Krey, T, d'Alayer J, Kikuti CM, Saulnier A, Damier-Piolle L, Petitpas I, Johansson DX, Tawar RG, Baron B, Robert B, England P, Persson MA, Martin A, Rey FA.. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 2010. 6:e1000762.
23. Lapierre, P; Troesch, M; Alvarez, F y Soudeyns, H. Structural basis for broad neutralization of hepatitis C virus quasispecies. *PLoS One*. 2011; 6:e26981.
24. Steinmann, E y Pietschmann, T (2010). Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses*. 2010; 2:2078- 2095.
25. Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Héliot L, Rouillé Y, Dubuisson J. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog*. 2011; 7:e1001278.
26. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology, Knipe DM, Howley, PM (eds). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2001, 991–1042.
27. Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, Rice CM. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol*. 2007; 81:8905-8918.
28. Morikawa, K; Lange, CM; Gouttenoire, J; Meylan, E; Brass, V; Penin, F y Moradpour, D . Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat*. 2011; 18:305-315.
29. Gouttenoire, J; Penin, F y Moradpour, D. Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev Med Virol*. 2010; 20:117-129.
30. Egger, D; Wolk, B; Gosert, R; Bianchi, L; Blum, HE; Moradpour, D y Bienz, K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*. 2002; 76:5974-5984.
31. Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol*. 2005; 79:3187-3194.
32. Moradpour D, Penin, F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5:453-463.
33. Bartenschlager R, Cosset FL, Lohmann V. Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* 2010; 53:583-585.



34. Simister P, Schmitt M, Geitmann M, Wicht O, Danielson UH, Klein R, Bressanelli S, Lohmann V. Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. *J Virol* 2009; 83:11926-11939.
35. Behrens S, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 1996; 15:12-22.
36. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996; 70: 3363-3371.
37. Friebe, P y Bartenschlager, R. Role of RNA structures in genome terminal sequences of the hepatitis C virus for replication and assembly. *J Virol*. 2009; 83:11989-11995.
38. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81:1631-1648.
39. Shi ST, Lai MM. Hepatitis C viral RNA: challenges and promises. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:1276-1295.
40. Ito T, Tahara S, Lai M. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* 1998; 72:8789-8796.
41. Murakami K, Abe M, Kageyama T, Kamoshita N, Nomoto A. Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol* 2001; 146:729-741.
42. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-973.
43. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014; 59:318-327.
44. Chiesa I, Serafino J, García MG, Nuñez GG, Pérez MS, Pirola DA. Distribution of hepatitis C virus genotypes in an Argentine population. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2012; 46:633-637.
45. del Pino N, Oubiña JR, Rodríguez-Frías F, Esteban JI, Buti M, Otero T, Gregori J, García-Cehic D, Camos S, Cubero M, Casillas R, Guàrdia J, Esteban R, Quer J. Molecular epidemiology and putative origin of hepatitis C virus in random volunteers from Argentina. *World J Gastroenterol* 2013 21; 19:5813-5827.
46. Quarleri JF, Robertson BH, Mathet VL, Feld M, Espínola L, Requeijo MP, Mandó O, Carballal G, Oubiña JR. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from argentine patients: a six-year retrospective study. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:4560-4568.
47. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2014; 61:S45-S57.
48. Alter JM. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *W J Gastroenterol* 2007; 13:2436-2441.
49. Flichman DM, Blejer JL, Livellara BI, Re VE, Bartoli S, Bustos JA, Ansola CP, Hidalgo S, Cerda ME, Levin AE, Huenul A, Riboldi V, Treviño EM, Salamone HJ, Nuñez FA, Fernández RJ, Reybaud JF, Campos RH. Prevalence and trends of markers of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human Immunodeficiency virus in Argentine blood donors. *BMC Infect Dis*. 2014; 14:218.

50. Alter MJ. HCV routes of transmission: what goes around comes around. *Semin Liver Dis.* 2011; 31:340-346.
51. Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002; 36:S106-S113.
52. Terrault NA. Sexual activity as risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36:S99-S105.
53. Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, van der Loeff MS, Rice TM, Bruneau J, Morris MD, Hajarizadeh B, Amin J, Cox AL, Kim AY, McGovern BH, Schinkel J, George J, Shoukry NH, Lauer GM, Maher L, Lloyd AR, Hellard M, Dore GJ, Prins M; InC3 Study Group. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2014; 59:109-220.
54. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10:553-562.
55. Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* 2006;13:34-41.
56. Rolfe KJ, Curran MD, Alexander GJ, Woodall T, Andrews N, Harris HE. Spontaneous loss of hepatitis C virus RNA from serum is associated with genotype 1 and younger age at exposure. *J Med Virol.* 2011; 83:1338-1344.
57. De Re V, Gragnani L, Fognani E, Piluso A, Izzo F, Mangia A, Crovatto M, Gava G, Casarin P, Sansonno D, Racanelli V, De Vita S, Pioltelli P, Caggiari L, De Zorzi M, Berretta M, Gini A, Zucchetto A, Buonaguro FM, De Paoli P, Zignego AL. Impact of immunogenetic IL28B polymorphism on natural outcome of HCV infection. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:710642.
58. Bonnard P, Lescure FX, Amiel C, Guiard-Schmid JB, Callard P, Gharakhanian S, Pialoux G. Documented rapid course of hepatic fibrosis between two biopsies in patients coinfecting by HIV and HCV despite high CD4 cell count. *J Viral Hepat.* 2007; 14:806-811.
59. Vallet-Pichard A, Pol S. Natural history and predictors of severity of chronic hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) co-infection. *J Hepatol* 2006; 44:528-34.
60. Harris HE, Eldridge KP, Harbour S, Alexander G, Teo CG, Ramsay ME; HCV National Register Steering Group\*. Does the clinical outcome of hepatitis C infection vary with the infecting hepatitis C virus type? *J Viral Hepat.* 2007; 14:213-220.
61. Soriano V, Mocroft A, Rockstroh J, Ledergerber B, Knysz B, Chaplinskas S, Peters L, Karlsson A, Katlama C, Toro C, Kupfer B, Vogel M, Lundgren J; EuroSIDA Study Group. Spontaneous viral clearance, viral load, and genotype distribution of hepatitis C virus (HCV) in HIV-infected patients with anti-HCV antibodies in Europe. *J Infect Dis.* 2008; 198:1337-1344.
62. Seeff LB, Hollinger FB, Alter HJ, Wright EC, Cain CM, Buskell ZJ, Ishak KG, Iber FL, Toro D, Samanta A, Koretz RL, Perrillo RP, Goodman ZD, Knodell RG, Gitnick G, Morgan TR, Schiff ER, Lasky S, Stevens C, Vlahcevic RZ, Weinshel E, Tanwantee T, Lin HJ, Barbosa L. Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C hepatitis: A National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. *Hepatology* 2001; 33:455-463.
63. Mahajan R, Xing J, Liu SJ, Ly KN, Moorman AC, Rupp L, Xu F, Holmberg SD; Chronic Hepatitis Cohort Study (CHeCS) Investigators. Mortality among persons in care with hepatitis C virus infection: the Chronic Hepatitis Cohort Study (CHeCS), 2006-2010. *Clin Infect Dis.* 2014; 58:1055-1061.

64. El-Kamary SS, Jhaveri R, Shardell MD. All-cause, liver-related, and non-liver-related mortality among HCV-infected individuals in the general US population. *Clin Infect Dis*. 2011; 53:150-157.
65. Russo MW, Galanko J, Beavers K, Fried MW, Shrestha R. Patient and graft survival in hepatitis C recipients after adult living donor liver transplantation in the United States. *Liver Transpl* 2004; 10:340-346.
66. Benvegnu L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural History of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004; 53:744-749.
67. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J; EASL Panel of Experts on HCC. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *Journal of Hepatology* 2001; 35:421-430.
68. World Health Organization. Mortality database. Available from: URL: <http://www.who.int/whosis/en>.
69. <http://globocan.iarc.fr/ia/TheAmericas/atlas.html>
70. Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27:273-238.
71. Giovannini M, Elias D, Monges G, Raoul JL, Rougier P; French National Federation of Cancer (FNCLCC). Hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 84:74-77
72. Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35:666-678.
73. Rubín A, Aguilera V, Berenguer M. Liver transplantation and hepatitis C. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35:805-812.
74. van der Helm J, Geskus R, Sabin C, Meyer L, Del Amo J, Chêne G, Dorrucchi M, Muga R, Porter K, Prins M; CASCADE Collaboration in EuroCoord. Effect of HCV infection on cause-specific mortality after HIV seroconversion, before and after 1997. *Gastroenterology*. 2013; 144:751-760.
75. Wandeler G, Gsponer T, Bregenzler A, Günthard HF, Clerc O, Calmy A, Stöckle M, Bernasconi E, Furrer H, Rauch A; Swiss HIV Cohort Study. Hepatitis C virus infections in the Swiss HIV Cohort Study: a rapidly evolving epidemic. *Clin Infect Dis*. 2012; 55:1408-1416.
76. Laufer N, Quarleri J, Bouzas MB, Juncos G, Cabrini M, Moretti F, Bolcic F, Fernández-Giuliano S, Mammana L, Salomón H, Cahn P. Hepatitis B virus, hepatitis C virus and HIV coinfection among people living with HIV/AIDS in Buenos Aires, Argentina. *Sex Transm Dis*. 2010;37: 342-343.
77. Soriano V. Treatment of chronic hepatitis C in HIV-positive individuals: selection of candidates. *J Hepatol* 2006; 44:S44-S48.
78. Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK, Lissen E, Gonzalez-García J, Lazzarin A, Carosi G, Sasadeusz J, Katlama C, Montaner J, Sette H Jr, Pässe S, De Pamphilis J, Duff F, Schrenk UM, Dieterich DT; APRICOT Study Group. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2004; 351:438-450.
79. Pineda JA, Mira JA, Gil Ide L, Valera-Bestard B, Rivero A, Merino D, Girón-González JA, Ríos-Villegas MJ, González-Serrano M, Collado A, García-García JA, Carrillo-Gómez R, López-Cortés LF, Gómez-Mateos J. Influence of concomitant antiretroviral therapy on the

- rate of sustained virological response to pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60:1347-1354.
80. Carrat F, Bani-Sadr F, Pol S, Rosenthal E, Lunel-Fabiani F, Benzekri A, Morand P, Goujard C, Pialoux G, Piroth L, Salmon-Céron D, Degott C, Cacoub P, Perronne C; ANRS HCO2 RIBAVIC Study Team. Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004; 292:2839-2348.
  81. Castellares C, Barreiro P, Martín-Carbonero L, Labarga P, Vispo ME, Casado R, Galindo L, García-Gascó P, García-Samaniego J, Soriano V. Liver cirrhosis in HIV-infected patients: prevalence, aetiology and clinical outcome. *J Viral Hepat.* 2008; 15:165-172.
  82. Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, Burgisser P, Erb P, Boggian K, Piffaretti JC, Hirschel B, Janin P, Francioli P, Flepp M, Telenti A. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet.* 2000 25; 356:1800-1805.
  83. García-Samaniego J, Rodríguez M, Berenguer J, Rodríguez-Rosado R, Carbó J, Asensi V, Soriano V. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96:179-183.
  84. Global Observatory on Donation And Transplantation. <http://www.transplant-observatory.org/Pages/home.aspx>
  85. Salvalaggio PR, Caicedo JC, de Albuquerque LC, Contreras A, Garcia VD, Felga GE, Maurette RJ, Medina-Pestana JO, Niño-Murcia A, Pacheco-Moreira LF, Rocca J, Rodriguez-Davalos M, Ruf A, Rusca LA, Vilatoba M. Liver transplantation in Latin America: the state-of-the-art and future trends. *Transplantation.* 2014; 98:241-246.
  86. Adjusted patient survival, deceased donor liver transplant survival at 3 months, 1 year, 3 years and 5 years. [http:// www.ustransplant. org/annual\\_reports/current/911a\\_li.pdf](http://www.ustransplant.org/annual_reports/current/911a_li.pdf)
  87. Bilbao I, Dopazo C, Lazaro JL, Castells L, Escartin A, Lopez I, Sapisochin G, Balsells J, Margarit C. Our experience in liver transplantation in patients over 65 yr of age. *Clin Transplant* 2008; 22:82-88.
  88. Fassio E, Díaz S, Santa C, Reig ME, Martínez Artola Y, Alves de Mattos A, Míguez C, Galizzi J, Zapata R, Ridruejo E, de Souza FC, Hernández N, Pinchuk L; Multicenter Group for Study of Hepatocarcinoma in Latin America; Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado (ALEH). Etiology of hepatocellular carcinoma in Latin America: a prospective, multicenter, international study. *Ann Hepatol.* 2010; 9:63-69.
  89. Consenso Argentino de Hepatitis C 2013. [http://aaeeh.org.ar/docs/libro\\_resumenes\\_consenso.pdf](http://aaeeh.org.ar/docs/libro_resumenes_consenso.pdf)
  90. Testillano M, Fernandez JR, Suarez MJ, Gastaca M, Bustamante J, Pijoan JI, Montejo M, Valdivieso A, Ruiz P, Gonzalez J, Ortiz de Urbina J. Survival and hepatitis C virus recurrence after liver transplantation in HIV- and hepatitis C virus-coinfected patients: experience in a single center. *Transplant Proc.* 2009; 41:1041-1043.
  91. Weber R, Sabin CA, Friis-Møller N, Reiss P, El-Sadr WM, Kirk O, Dabis F, Law MG, Pradier C, De Wit S, Akerlund B, Calvo G, Monforte Ad, Rickenbach M, Ledergerber B, Phillips AN, Lundgren JD. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study. *Arch Intern Med.* 2006; 166:1632-1641.
  92. Pineda JA, Romero-Gómez M, Díaz-García F, Girón-González JA, Montero JL, Torre-Cisneros J, Andrade RJ, González-Serrano M, Aguilar J, Aguilar-Guisado M, Navarro JM, Salmerón J, Caballero-Granado FJ, García-García JA; Grupo Andaluz para el Estudio de

- las Enfermedades Infecciosas; Grupo Andaluz para el Estudio del Hígado. HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. *Hepatology*. 2005; 41:779-789.
93. Villamil A, Bisignano L, Orozco F, Bandi JC, Barcán L, McCormack L, Gondolesi G, Santibañes Ed, Gadano A. The Argentine experience with human immune deficiency virus positive patients in the waiting list for liver transplantation: preliminary analysis]. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2013; 43:113-120.
  94. Norris S, Taylor C, Muiesan P, Portmann BC, Knisely AS, Bowles M, Rela M, Heaton N, O'Grady JG. Outcomes of liver transplantation in HIV-infected individuals: the impact of HCV and HBV infection. *Liver Transpl*. 2004; 10:1271-1278.
  95. Schreiber I, Gaynor JJ, Jayaweera D, Pyrsopoulos N, Weppler D, Tzakis A, Schiff ER, Regev A. Outcomes after orthotopic liver transplantation in 15 HIV-infected patients. *Transplantation*. 2007;84:697-705.
  96. Mindikoglu AL, Regev A, Magder LS. Impact of human immunodeficiency virus on survival after liver transplantation: analysis of United Network for Organ Sharing database. *Transplantation* 2008; 85:359-68.
  97. Miro JM, Montejo M, Castells L, Rafecas A, Moreno S, Agüero F, Abradelo M, Miralles P, Torre-Cisneros J, Pedreira JD, Cordero E, de la Rosa G, Moyano B, Moreno A, Perez I, Rimola A; Spanish OLT in HIV-Infected Patients Working Group investigators. Outcome of HCV/HIV-coinfected liver transplant recipients: a prospective and multicenter cohort study. *Am J Transplant*. 2012; 12:1866-1876.
  98. Registro Nacional de Trasplante Hepático. <https://cresi.incucai.gov.ar/IniciarCresiFromSintra.do>.
  99. Duclos-Vallée JC, Féray C, Sebah M, Teicher E, Roque-Afonso AM, Roche B, Azoulay D, Adam R, Bismuth H, Castaing D, Vittecoq D, Samuel D; THEVIC Study Group. Survival and recurrence of hepatitis C after liver transplantation in patients coinfectd with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *Hepatology*. 2008; 47:407-417.
  100. de Vera ME, Dvorchik I, Tom K, Eghtesad B, Thai N, Shakil O, Marcos A, Demetris A, Jain A, Fung JJ, Ragni MV. Survival of liver transplant patients coinfectd with HIV and HCV is adversely impacted by recurrent hepatitis C. *Am J Transplant*. 2006; 6:2983-2993.
  101. Antonini TM, Sebah M, Roque-Afonso AM, Teicher E, Roche B, Sobesky R, Coilly A, Vaghefi P, Adam R, Vittecoq D, Castaing D, Samuel D, Duclos-Vallée JC. Fibrosing cholestatic hepatitis in HIV/HCV co-infected transplant patients-usefulness of early markers after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2011; 11:1686-1695.
  102. Terrault NA, Roland ME, Schiano T, Dove L, Wong MT, Poordad F, Ragni MV, Barin B, Simon D, Olthoff KM, Johnson L, Stosor V, Jayaweera D, Fung J, Sherman KE, Subramanian A, Millis JM, Slakey D, Berg CL, Carlson L, Ferrell L, Stablein DM, Odim J, Fox L, Stock PG; Solid Organ Transplantation in HIV: Multi-Site Study Investigators. Outcomes of liver transplant recipients with hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfection. *Liver Transpl*. 2012;18:716-726.
  103. Keeffe EB. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology* 2001; 120:749-762.
  104. Liu H, Liu YF. Liver transplantation for patients with viral hepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2:28-32.
  105. Garcia-Retortillo M, Fornis X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, Rimola A, Rodes J. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35:680-687.

106. Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, Everhart J, Zetterman R, Lake J, Detre K, Hoofnagle J. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28: 823-830.
107. Feray C, Caccamo L, Alexander GJ, Ducot B, Gugenheim J, Casanovas T, Loinaz C, Gigou M, Burra P, Barkholt L, Esteban R, Bizollon T, Lerut J, Minello-Franza A, Bernard PH, Nachbaur K, Botta-Fridlund D, Bismuth H, Schalm SW, Samuel D. European collaborative study on factors influencing the outcome after liver transplantation for hepatitis C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP) Group. *Gastroenterology* 1999; 117: 619-625.
108. Manez R, Mateo R, Tabasco J, Kusne S, Starzl TE, Duquesnoy RJ. The influence of HLA donorrecipient compatibility on the recurrence of HBV and HCV hepatitis after liver transplantation. *Transplantation* 1994; 59: 640-642.
109. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayón JM, Martínez F, Carrasco D, Moya A, Orbis F, Mir J, Berenguer J. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36: 202-210.
110. Carrión JA, Navasa M, Forns X. Retransplantation in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *J Hepatol.* 2010; 53:962-70.
111. Baron Pw, Sindram D, Higdon D, Howell DN, Gottfried MR, Tuttle-Newhall JE, Clavien PA. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6: 407-412.
112. Prieto M, Berenguer M, Rayón JM, Córdoba J, Argüello L, Carrasco D, García-Herola A, Olaso V, De Juan M, Gobernado M, Mir J, Berenguer J. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29:250-256.
113. Berenguer M, Prieto M, Rayón JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, Carrasco D, San Juan F, Burgueño MD, Mir J, Berenguer J. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32:852-858.
114. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122:889-896.
115. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayón M, Córdoba J, Herola A, Ascher N, Mir J, Berenguer J, Wright TL. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000; 32:673-684.
116. Biggins SW, Beldecos A, Rabkin JM, Rosen HR. Retransplantation for hepatic allograft failure: Prognostic modeling and ethical considerations. *Liver Transplantation* 2002; 8:313-322.
117. Markmann JF, Gornbein J, Markowitz JS, Levy MF, Klintmalm GB, Yersiz H, Morrissey M, Drazan K, Farmer DG, Ghobrial RM, Goss J, Seu P, Martin P, Goldstein LI, Busuttil RW. A simple model to estimate survival after retransplantation of the liver. *Transplantation* 1999; 67:422-430.
118. Yao FY, Saab S, Bass NM, Hirose R, Ly D, Terrault N, Lazar AA, Bacchetti P, Ascher NL, Roberts JP. Prediction of survival after liver retransplantation for late graft failure based on preoperative prognostic scores. *Hepatology* 2004; 39:230-238.
119. Weiss RA, McMichael AJ. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nat Med.* 2004; 10:S70-76.

120. Feliu A, Gay E, García-Retortillo M, Saiz JC, Forns X. Evolution of hepatitis C virus quasispecies immediately following liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004; 10:1131-1139.
121. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876-4882.
122. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* Ser. 41:95-98.
123. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:1792-1797.
124. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003; 52:696-704.
125. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010; 59:307-321.
126. Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther.* 2005; 10:1-11.
127. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:223-235.
128. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, Maertens G, Williams R. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 815-820.
129. Féray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Mishiro S, Maertens G, Reynés M, Okamoto H, Bismuth H, Bréchet C. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995; 108: 1088-1096.
130. Pageaux GP, Ducos J, Mondain AM, Costes V, Picot MC, Perrigault PF, Domergue J, Larrey D, Michel H. Hepatitis C virus genotypes and quantitation of serum hepatitis C virus RNA in liver transplant recipients: relationship with severity of histological recurrence and implications in the pathogenesis of HCV infection. *Liver Transpl Surg* 1997; 3: 501-505.
131. Gayowski T, Singh N, Marino IR, Vargas H, Wagener M, Wannstedt C, Morelli F, Laskus T, Fung JJ, Rakela J, Starzl TE. Hepatitis C virus genotypes in liver transplant recipients: impact on posttransplant recurrence, infections, response to interferon-alpha therapy and outcome. *Transplantation* 1997; 64: 422-426.
132. Blackard JT, Ma G, Limketkai BN, Welge JA, Dryer PD, Martin CM, Hiasa Y, Taylor LE, Mayer KH, Jamieson DJ, Sherman KE. Variability of the polymerase gene (NS5B) in hepatitis C virus-infected women. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:4256-4259.
133. Driesel G, Wirth D, Stark K, Baumgarten R, Sucker U, Schreier E. Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region. *Arch Virol.* 1994; 139:379-388.
134. Pavio N, Lai MM. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci.* 2003; 28:287-304.
135. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol.* 1999; 7:402-410.
136. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol.* 2004; 85:3173-3188.

137. Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 21; 202:149-156.
138. Barban V, Frayse-Corgier S, Paranhos-Baccala G, Petit M, Manin C, Berard Y, Prince AM, Mandrand B, Meulien P. Identification of a human epitope in hepatitis C virus (HCV) core protein using a molecularly cloned antibody repertoire from a non-symptomatic, anti-HCV-positive patient. *J Gen Virol.* 2000; 81:461-469.
139. Pujol FH, Khudyakov YE, Devesa M, León G, Blitz-Dorfman L, Monsalve F, Lambert SB, Kalinina TY, Liprandi F, Fields HA. Characterization of the antibody reactivity to synthetic peptides from different parts of the hepatitis C virus genome. *Viral Immunol.* 1996; 9:89-96.
140. Moradpour, D., Wakita, T., Tokushige, K., Carlson, R. I., Krawczynski, K. & Wands, J. R. Characterization of three novel monoclonal antibodies against hepatitis C virus core protein. *Journal of Medical Virology* 1996; 48, 234-241.
141. Huang CJ, Peng HL, Cheng CY. Improving antigenicity of the recombinant hepatitis C virus core protein via random mutagenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:359042.
142. Ai LS, Lee YW, Chen SSL. Characterization of hepatitis C virus core protein multimerization and membrane envelopment: revelation of a cascade of core-membrane interactions. *Journal of Virology.* 2009; 83:9923–9939.
143. Lauck M, Alvarado-Mora MV, Becker EA, Bhattacharya D, Striker R, Hughes AL, Carrilho FJ, O'Connor DH, Pinho, JR. Analysis of hepatitis C virus intrahost diversity across the coding region by ultradeep pyrosequencing. *J Virol* 2012; 86:3952-3960.
144. Hughes MG Jr, Rudy CK, Chong TW, Smith RL, Evans HL, Iezzoni JC, Sawyer RG, Pruett TL. E2 quasispecies specificity of hepatitis C virus association with allografts immediately after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004; 10:208-216.
145. Martell M, Esteban JI, Quer J, Vargas V, Esteban R, Guardia J, Gómez J. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *J Virol.* 1994; 68:3425-3436.
146. Arenas JI, Gallegos-Orozco JF, Laskus T, Wilkinson J, Khatib A, Fasola C, Adair D, Radkowski M, Kibler KV, Nowicki M, Douglas D, Williams J, Netto G, Mulligan D, Klintmalm G, Rakela J, Vargas HE. Hepatitis C virus quasi-species dynamics predict progression of fibrosis after liver transplantation. *J Infect Dis.* 2004; 189:2037-2046.
147. Schvoerer E, Soulier E, Royer C, Renaudin AC, Thumann C, Fafi-Kremer S, Brignon N, Doridot S, Meyer N, Pinson P, Ellero B, Woehl-Jaegle ML, Meyer C, Wolf P, Zachary P, Baumert T, Stoll-Keller F. Early evolution of hepatitis C virus (HCV) quasispecies after liver transplant for HCV-related disease. *J Infect Dis.* 2007; 196:528-536.
148. Gray RR, Strickland SL, Veras NM, Goodenow MM, Pybus OG, Lemon SM, Fried MW, Nelson DR, Salemi M. Unexpected maintenance of hepatitis C viral diversity following liver transplantation. *J Virol* 2012; 86: 8432-8439.
149. Li H, Sullivan DG, Feuerborn N, McArdle S, Bekele K, Pal S, Yeh M, Carithers RL, Perkins JD, Gretch DR. Genetic diversity of hepatitis C virus predicts recurrent disease after liver transplantation. *Virology.* 2010; 402:248-255.
150. Pessoa MG, Bzowej N, Berenguer M, Phung Y, Kim M, Ferrell L, Hassoba H, Wright TL. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in patients with severe cholestatic hepatitis after liver transplantation. *Hepatology.* 1999; 30:1513-1520.



10. APENDICES

10.1. Perfil bioquímico y virológico de los pacientes

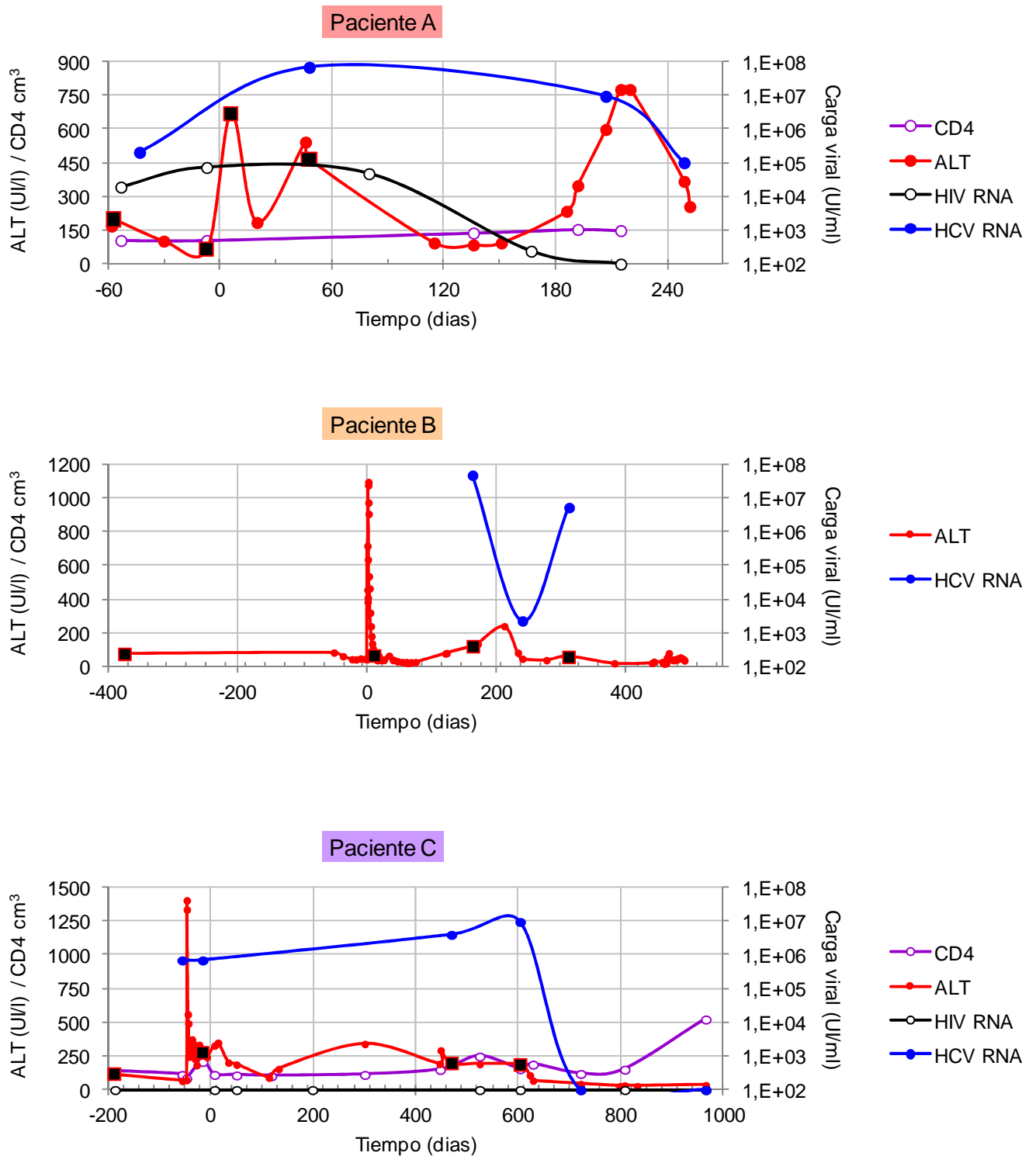


Figura A1. Perfil bioquímico y virológico de los pacientes. Los gráficos muestran los niveles de ALT (●) y la carga viral del HCV (●) para cada paciente en función del tiempo de seguimiento. En los casos de coinfección con HIV también se indica, los niveles de CD4 (○) y la carga viral de HIV (○). Además se indican las muestras analizadas (■).

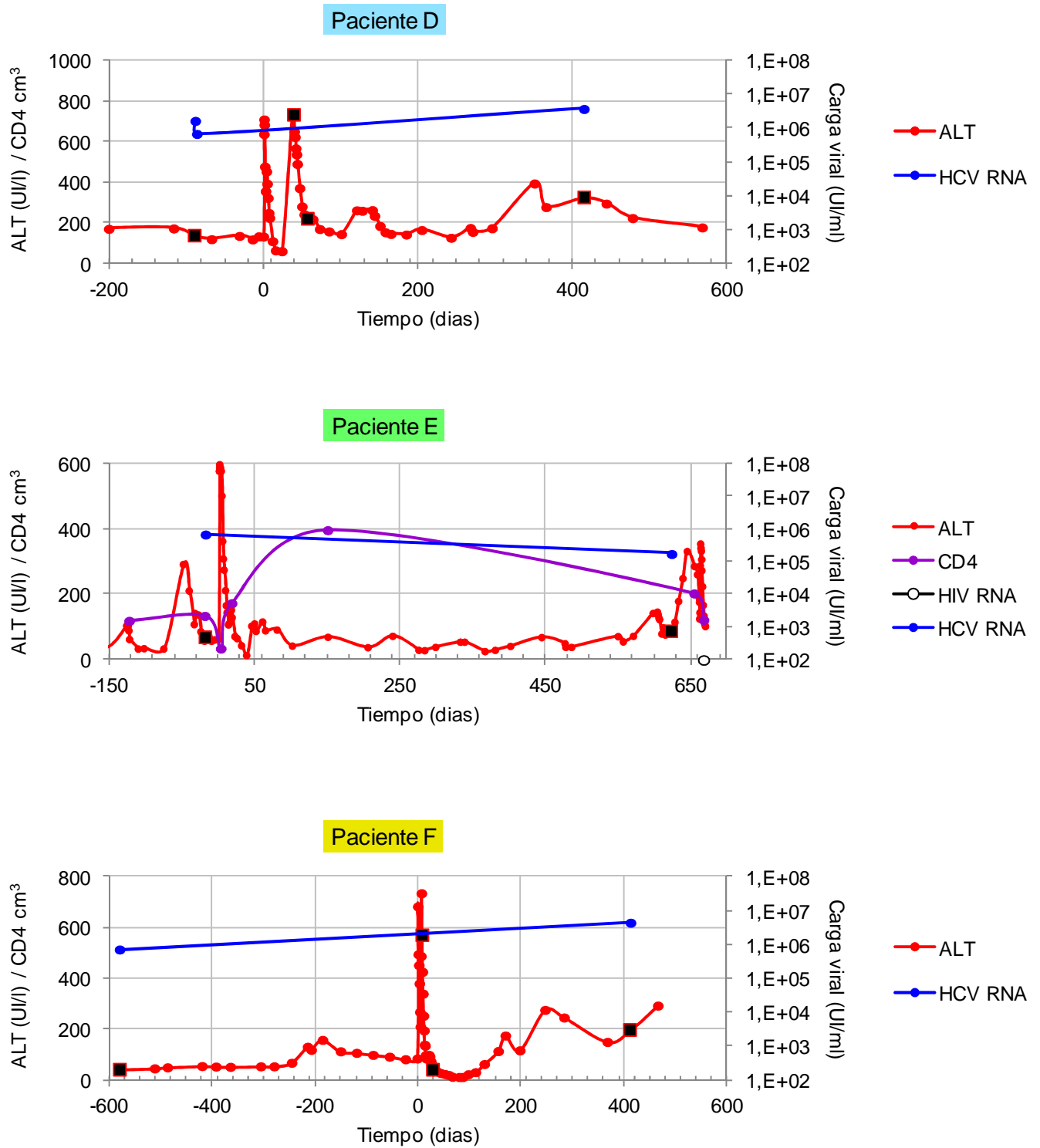


Figura A1. Continuación.

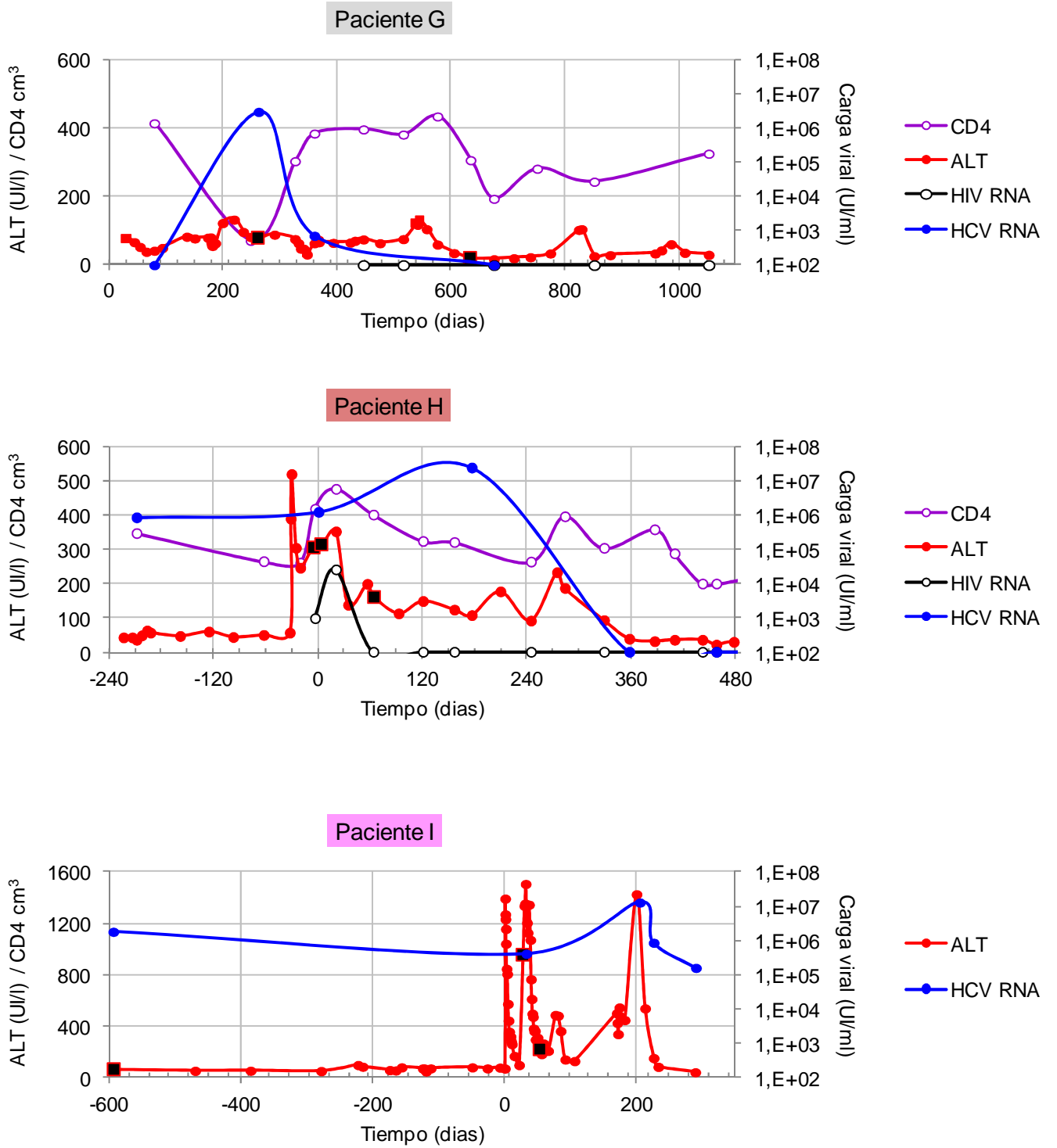


Figura A1. Continuación.

### 10.2. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región NS5B

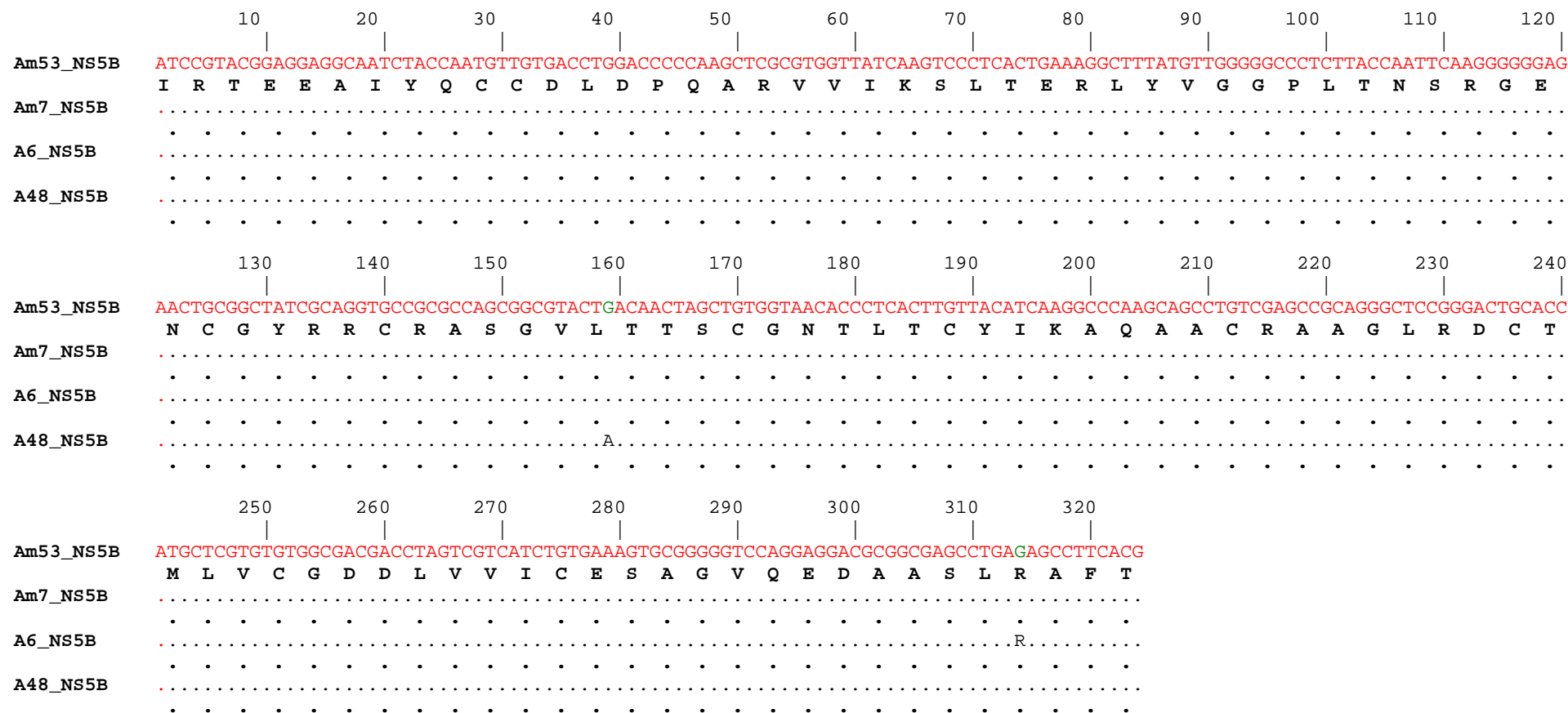


Figura A2. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región NS5B (nt 8384-8720). Las secuencias están indicadas con el código del paciente (A-l) y los días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante.

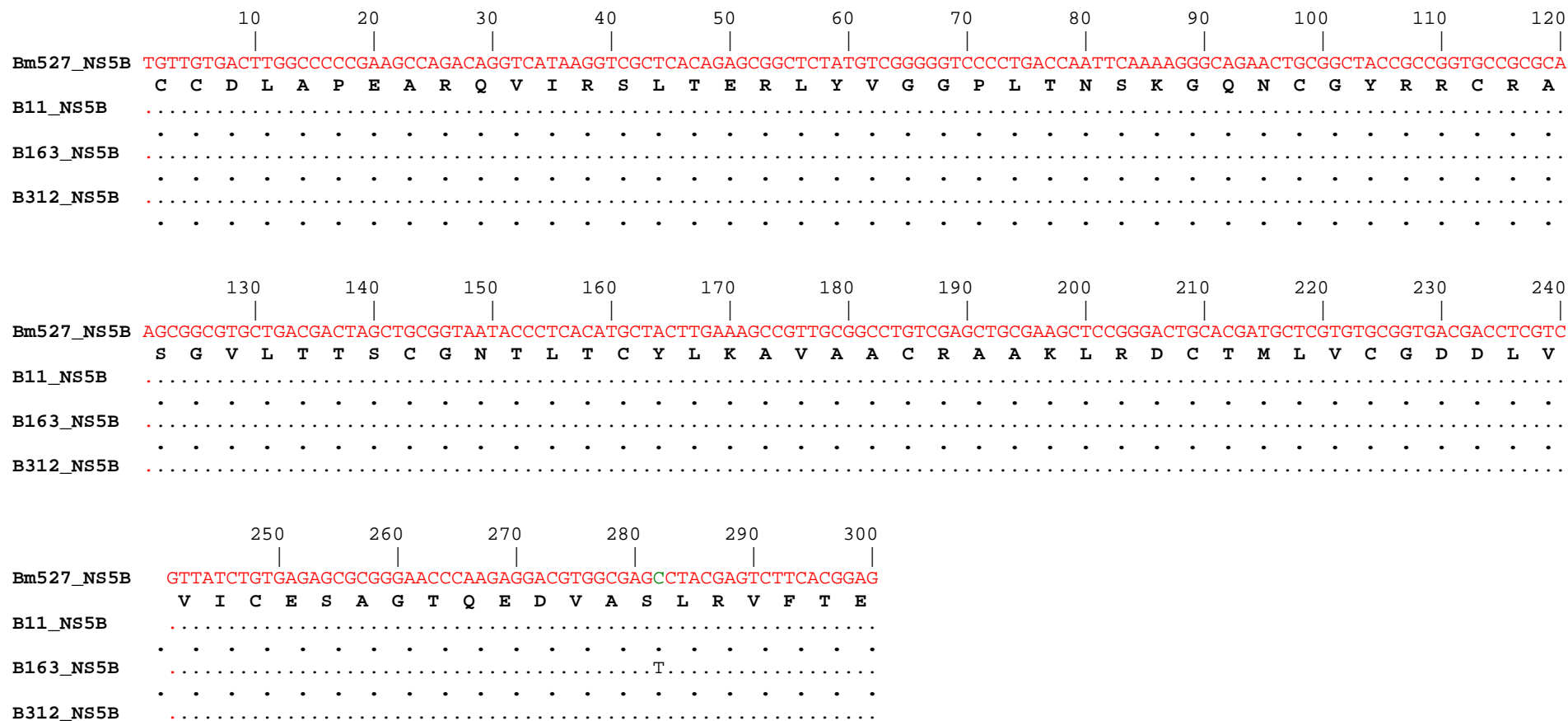


Figura A2. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																												
Cm15_NS5B	ATCCGTGTTGAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCTATAAGGGCGCTCACAGAGCGGCTTTATATGGGGTCCCTTGACCAATTCAAAAGGGCAG																																							
	I	R	V	E	E	S	I	Y	Q	C	C	D	L	A	P	E	A	R	Q	A	I	R	A	L	T	E	R	L	Y	I	G	G	P	L	T	N	S	K	G	Q
C470_NS5B	.....C.....																																							
C604_NS5B	.....C.....																																							
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240																												
Cm15_NS5B	AACTGCGGTTATCGCCGGTGTGCGCAAGCGGCGTGCTGACGACCAGCTGTGGTAATACCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCTGCGGCTTGCCGGGCTGCAAAGCTCGAGAACTACAG																																							
	N	C	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	N	T	L	T	C	Y	L	K	A	S	A	A	C	R	A	A	K	L	E	N	Y	T
C470_NS5B	.....																																							
C604_NS5B	.....																																							
	250	260	270	280	290	300	310	320																																
Cm15_NS5B	ATGCTCGTGTGCGGAGACGACCTTGTTCGTTATCTGTGAGAGCGCGGGACCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAG																																							
	M	L	V	C	G	D	D	L	V	V	I	C	E	S	A	G	T	Q	E	D	A	A	S	L	R	V	F	T	E											
C470_NS5B	.....																																							
C604_NS5B	.....																																							

Figura A2. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Dm86_NS5B	GGAGAGGAGATATACCAATGCTGTAACCTTGAACCGGAGGCCAGGAAAGTGATCTCCTCCCTCACGGAGCGGCTTTACTGCGGGGGCCCTATGTTCAACAGCAAGGGGGCCAGTGTGGT											
	G E E I Y Q C C N L E P E A R K V I S S L T E R L Y C G G P M F N S K G A Q C G											
D39_NS5B	.....											
D58_NS5B	.....											
D415_NS5B	.....A.....											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
Dm86_NS5B	TATCGCCGCTGCCGTGCCAGTGGAGTTCTGCCTACCAGCTTGGCAACAACAATCACTTGTACATCAAGGCCACAGCGGCTGCAAAGGCCGAGGCCTCCGGAACCCGGACTTTCTTGTC											
	Y R R C R A S G V L P T S F G N T I T C Y I K A T A A A K A A G L R N P D F L V											
D39_NS5B	.....											
D58_NS5B	.....											
D415_NS5B	.....T.....											
	250	260	270	280	290	300	310					
Dm86_NS5B	TGCGGAGATGATCTGGTCGTGGTGGCTGAAAGTGCTGGCGTCGATGAGGATAGAGTAGCCCTGGGAGCCTTCACGGAG											
	C G D D L V V V A E S A G V D E D R V A L G A F T E											
D39_NS5B	.....											
D58_NS5B	.....											
D415_NS5B	.....G.....											

Figura A2. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
<b>Em17_NS5B</b>	GAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTGGACCCCAAGCCCGCTGGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTTTATGTCGGGGGCCCTCTTACCAATTCAGGGGGGAAAAC TCGGC											
<b>E624_NS5B</b>	E E A I Y Q C C D L D P Q A R V A I K S L T E R L Y V G G P L T N S R G E N C G .....T.....											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
<b>Em17_NS5B</b>	TATCGCAGGTGCCGCGCAAGCGGTGACTGACAAC TAGCTGTGGTAATACCCCTCACTTGCTACATCAAGGCCAAGCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCGGGACTGCACCATGCTCGTG											
<b>E624_NS5B</b>	Y R R C R A S G V L T T S C G N T L T C Y I K A Q A A C R A A G L R D C T M L V .....											
	250	260	270	280	290	300	310					
<b>Em17_NS5B</b>	TGTGGCGACGACTTGGTCGTTATCTGTGAAAGTCAGGGAGTCCAGGAGGATGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAG											
<b>E624_NS5B</b>	C G D D L V V I C E S Q G V Q E D A A S L R A F T E .....											

Figura A2. Continuación.



	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
<b>Fm579_NS5B</b>	GAGGAGTCAATCTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCGAGGCCAGACAGGCCATAAAGTCGCTCACGGAGCGGCTTTACATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCCAAAGGGCAGAACTGCGGT											
<b>F8_NS5B</b>	E E S I Y Q C C D L A P E A R Q A I K S L T E R L Y I G G P L T N S K G Q N C G											
<b>F31_NS5B</b>	.....											
<b>F413_NS5B</b>	.....											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
<b>Fm579_NS5B</b>	TATCGCCGGTGC CGCGCGAGCGGGCTGCTGACGACTAGCTGCGGGAATACCCTCACCTGTTACTTGAAGGCCGCTGCAGCCTGTCGAGCTGC GAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTG											
<b>F8_NS5B</b>	Y R R C R A S G V L T T S C G N T L T C Y L K A A A A C R A A K L Q D C T M L V											
<b>F31_NS5B</b>	.....C.....											
<b>F413_NS5B</b>	.....C.....A.....											
	250	260	270	280	290	300	310					
<b>Fm579_NS5B</b>	TGCGGAGACGACCTTGTCTGTTATCTGTGAAAGTGC GGGA ACTCAGGAGGACGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAG											
<b>F8_NS5B</b>	C G D D L V V I C E S A G T Q E D A A S L R V F T E											
<b>F31_NS5B</b>	.....											
<b>F413_NS5B</b>	.....											

Figura A2. Continuación.

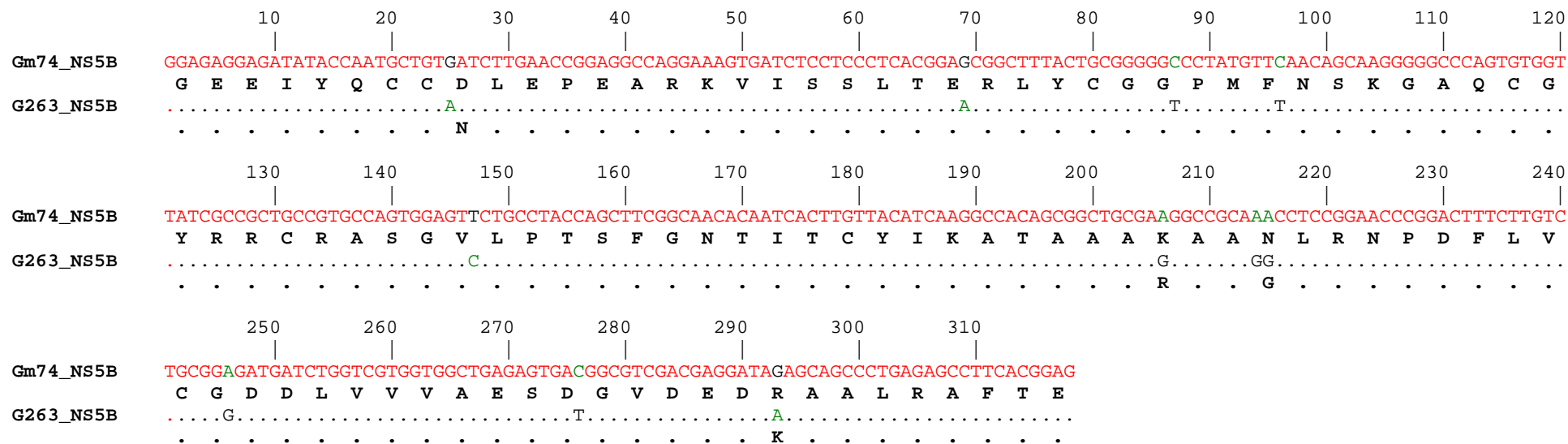


Figura A2. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Hm3_NS5B	GAGGAGGCAATCTACCAATGTTGTGACCTGGACCCCCAAGCCCGCTGGCCATCAAGTCCCTCACTGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGC											
H1_NS5B	E E A I Y Q C C D L D P Q A R V A I K S L T E R L Y V G G P L T N S R G E N C G											
H64_NS5B	.....											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
Hm3_NS5B	TACCGCAGGTGCCGCGCCAGCGGCTACTGACAACTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCAAGCAGCCTGTCGAGCCGCAGGGCTCCAGGACTGCACCATGCTCGTG											
H1_NS5B	Y R R C R A S G V L T T S C G N T L T C Y I K A Q A A C R A A G L Q D C T M L V											
H64_NS5B	.....											
	250	260	270	280	290	300	310					
Hm3_NS5B	TGTGGCGACACTGGTCGTTATCTGTGAAAGTGCAGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAG											
H1_NS5B	C G D D L V V I C E S A G V Q E D A A S L R A F T E											
H64_NS5B	.....											

Figura A2. Continuación.

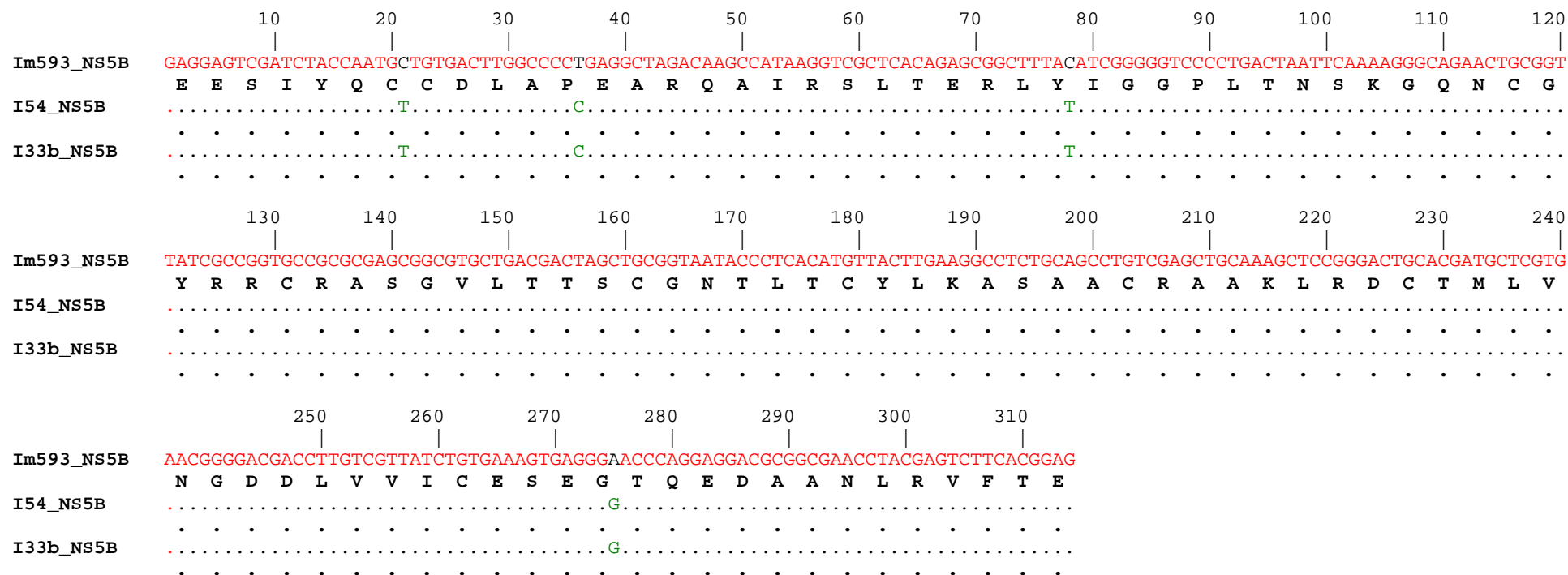


Figura A2. Continuación.

Genotipo		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
1a	Am53_NS5B	IRTEEAIYQCCDLDPQARVVIKSLTERLYVGGPLTNSRGENCYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYIKAQAACRAAGLRDCTMLVCGDDLVVICESAGVQEDAASLRAFT										
	Am7_NS5B	.....										
	A6_NS5B	.....										
	A48_NS5B	.....										
1a	E624_NS5B	.....A.....										Q.....
	Em17_NS5B	.....A.....										Q.....
1a	Hm3_NS5B	.....A.....										Q.....
	H1_NS5B	.....A.....										Q.....
	H64_NS5B	.....A.....										Q.....
1b	Bm527_NS5B	IRVEESYQCCDLAPPEARQVIRSLTERLYVGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKAVAACRAAKLRDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDVASLRVFT										
	B11_NS5B	.....										
	B163_NS5B	.....										
	B312_NS5B	.....										
1b	Cm15_NS5B	.....A.A.....I.....										S.....ENY.....A.....
	C470_NS5B	.....A.A.....I.....										S.....ENY.....A.....
	C604_NS5B	.....A.A.....I.....										S.....ENY.....A.....
1b	Fm579_NS5B	.....A.K.....I.....										A.....Q.....A.....
	F8_NS5B	.....A.K.....I.....										A.....Q.....A.....
	F31_NS5B	.....A.K.....I.....										A.....Q.....A.....
	F413_NS5B	.....A.K.....I.....										A.....Q.....A.....
1b	Im593_NS5B	.....A.....I.....										S.....N.....E.....A..N....
	I33_NS5B	.....A.....I.....										S.....N.....E.....A..N....
	I54_NS5B	.....A.....I.....										S.....N.....E.....A..N....
3a	Dm86_NS5B	GEEIYQCCNLEPEARKVVISLTERLYCGGPMFNASKGAQCGYRRCRASGVLPTSFNGTITCYIKATAAAKAAGLRNPDLVCGDDLVVVAESAGVDEDRVALGAFTE										
	D39_NS5B	.....										
	D58_NS5B	.....										
	D415_NS5B	.....										
3a	Gm74_NS5B	.....D.....N.....D.....A..R....										
	G263_NS5B	.....										



Figura A3. Alineamiento de las secuencias directas de aminoácidos de de la región NS5B (aa 249-357) (nt 8384-8720). Los nombres de las secuencias indican el tiempo de muestreo en días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante.

### 10.3. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región E2

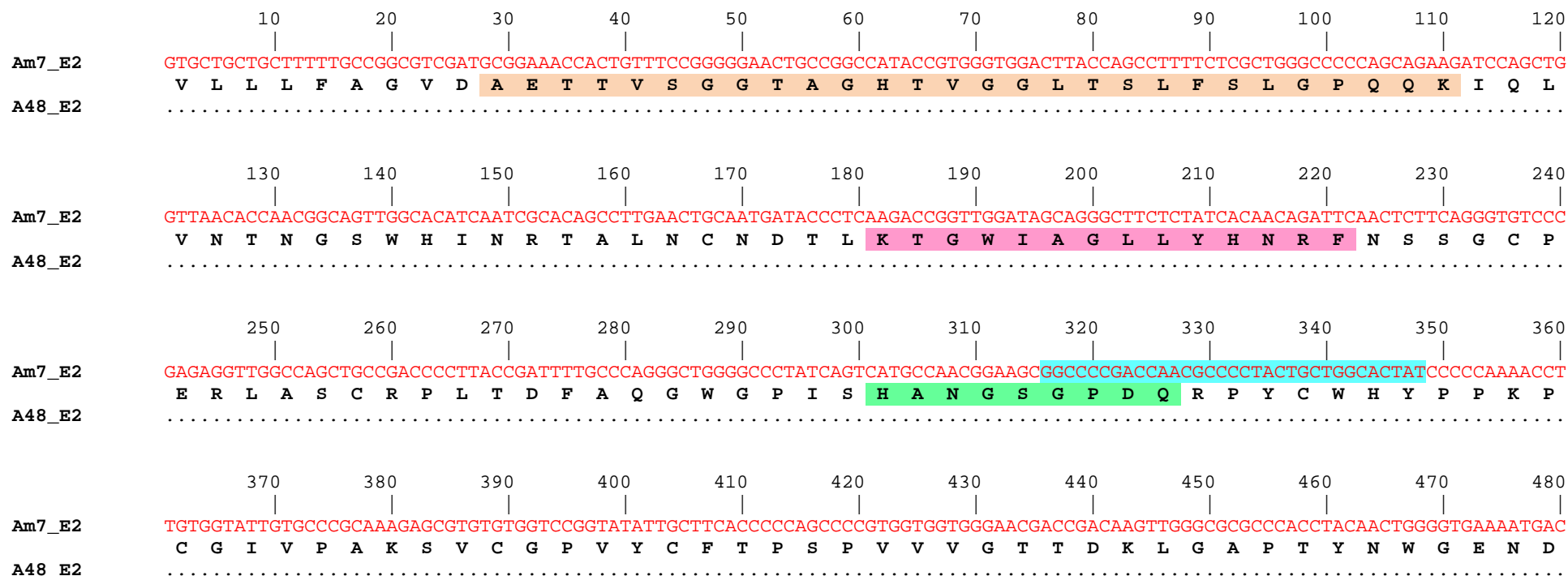


Figura A4. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región E2 (nt 1443-2013). La región HVR1 está resaltada en color naranja, HVR2 en verde, HVR3 en fucsia y el sitio de unión a CD81 en celeste. Las secuencias están indicadas con el código del paciente (A-I) y los días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante.

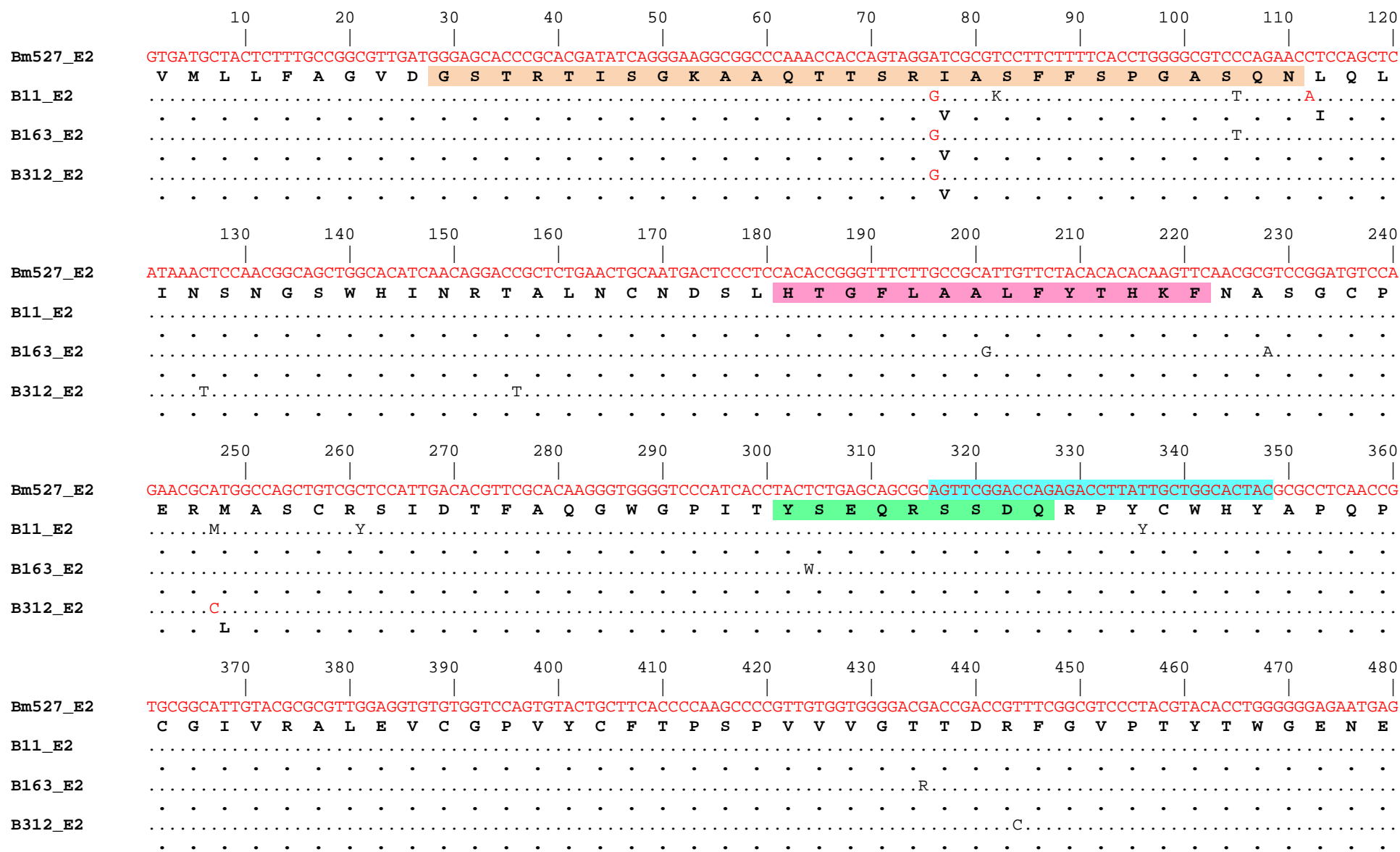


Figura A4. Continuación.



	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																																	
Cm186_E2	GTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTTGACGGAAGCACCCGCACAATAGGGGGGAGGCAGGCCCATRCCACTCAGAGCCTTGCRCTCCCTCTTTTCYCCTGGGGCGTCTCAGAAAAATCCAGCTC																																												
Cm15_E2	V	M	L	L	F	A	G	V	D	G	S	T	R	T	I	G	G	R	Q	A	H	T	A	T	Q	S	L	A	S	L	F	S	P	G	A	S	Q	K	I	Q	L				
C470_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	G	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
C604_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	A	.	G	.	A	.	.	G	.	TG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240																																	
Cm186_E2	ATAAACACCAACGGCAGCTGGCACATTAACAGGACTGCCCTGAACTGCAATGACTCCCTCCASACTGGGTTCCCTTGCCGCGCTGTTCTACACACACAAGTTCAACGCGTCCGGGTGCCCA																																												
Cm15_E2	I	N	T	N	G	S	W	H	I	N	R	T	A	L	N	C	N	D	S	L	H	Q	T	G	F	L	A	A	L	F	Y	T	H	K	F	N	A	S	G	C	P				
C470_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	
C604_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360																																	
Cm186_E2	GAGCGCATGGCCAGCTGCCGACCATTGACAAGTTCAGTCAGGGATGGGGTTCATCAGTTATGCCAAGCCCACTAGCTCGGATCAGAGGCCCTATTGCTGGCACTACGCACCTCAGCCG																																												
Cm15_E2	E	R	M	A	S	C	R	T	I	D	K	F	S	Q	G	W	G	S	I	S	Y	A	K	P	T	S	S	D	Q	R	P	Y	C	W	H	Y	A	P	Q	P					
C470_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C604_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480																																	
Cm186_E2	TGTGGTATTGTACCCGCGTCGCAAGTGTGCGGGCCAGTATACTGCTTCACCCCAAGCCCTGTTGTGGTGGGGACGACCGATCGGTTCCGTTGTTCCACGTATACTGGGGGAGAATGAG																																												
Cm15_E2	C	G	I	V	P	A	S	Q	V	C	G	P	V	Y	C	F	T	P	S	P	V	V	V	G	T	T	D	R	F	G	V	P	T	Y	T	W	G	E	N	E					
C470_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C604_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Figura A4 Continuación.

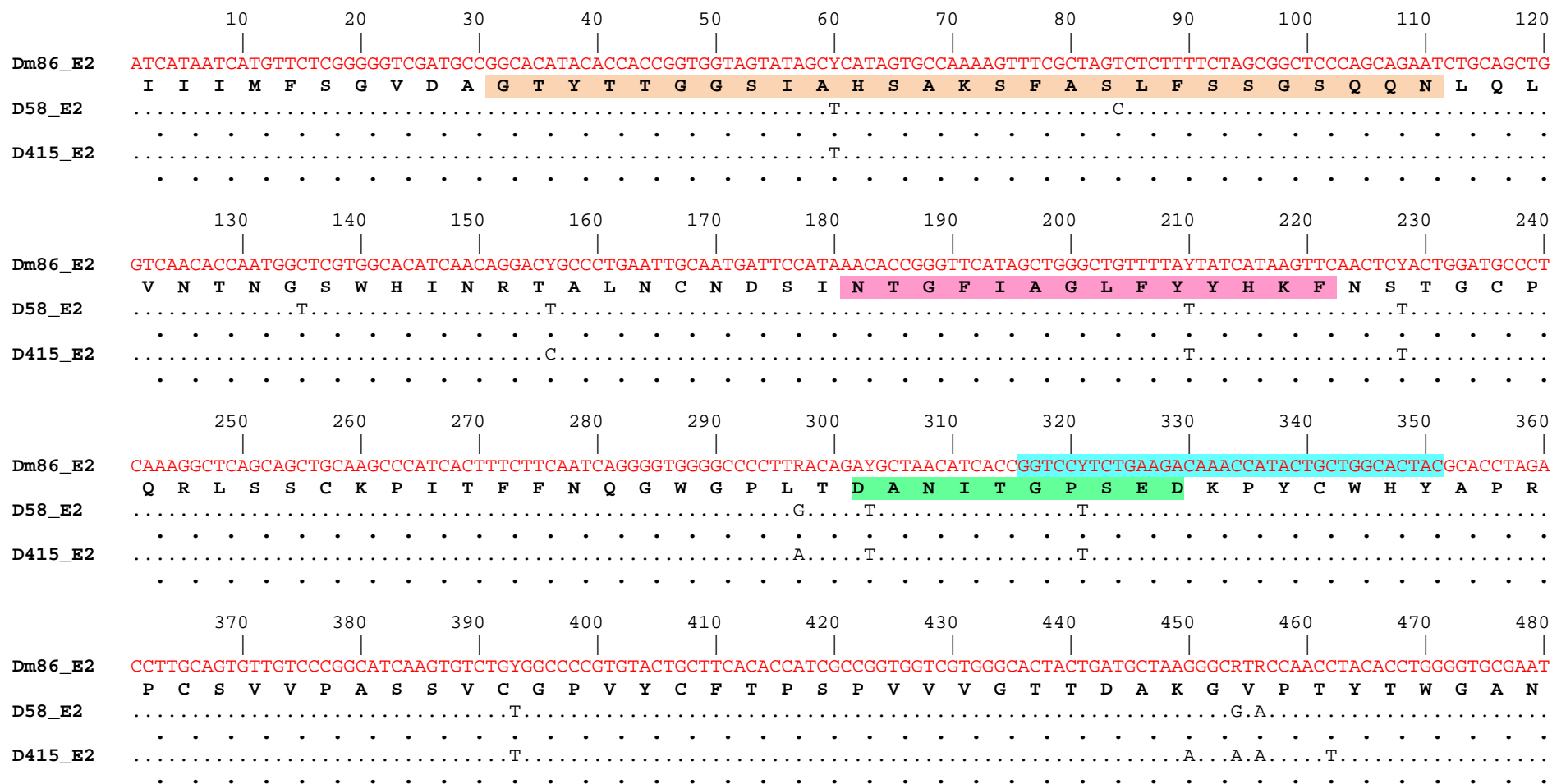


Figura A4. Continuación.

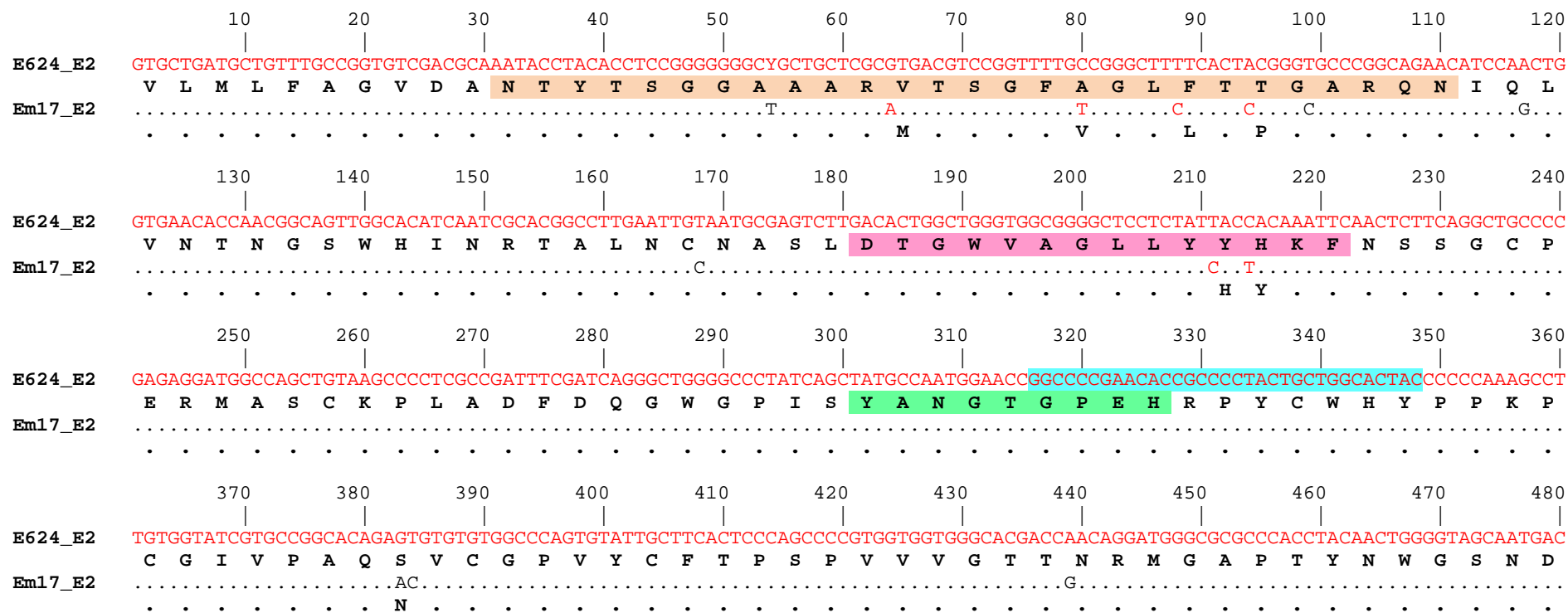


Figura A4. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																																					
Fm579_E2	GTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTTGATGGGACCTCTRGACATGGRACCCRTGTGACAGGGGGGACGSAGGSCYAYRCCGTCACTGGCYTTTCGTCTCTCTCTCTCCCTGGGGCGTCCCAG																																																
F8_E2	V	M	L	L	F	A	G	V	D	G	T	S	G/R	H	G	T	H/R	V	T	G	G	T	E/Q	A/G	H/Y	A/T	V	S	G	L/F	A/T	S	L	F	S	P	G	A	S	Q									
F31_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
F413_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
Fm579_E2	AAAATCCAGCTGGTAAACACCAATGGCAGTTGGCACATCAACCGCACTGTCTGAATTGCAACGACTCTCTCCATACCGGATTCTTGCCGCGCTGTTCTACGTGCGCAGCTTCAACGCG																																																
F8_E2	K	I	Q	L	V	N	T	N	G	S	W	H	I	N	R	T	A	L	N	C	N	D	S	L	H	T	G	F	L	A	A	L	F	Y	V	R	S	F	N	A									
F31_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
F413_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fm579_E2	TCCGATGTCCAGAGCGCATGGCCAGCTGTGCTCCATTGACAAGTTCGATCAGGGGTGGGTCCCATCACTTACGCTGAGCCTAACATCTCGGACCAGAGACCCTATTGCTGGCACTAC																																																
F8_E2	S	G	C	P	E	R	M	A	S	C	R	S	I	D	K	F	D	Q	G	W	G	P	I	T	Y	A	E	P	N	I	S	D	Q	R	P	Y	C	W	H	Y									
F31_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
F413_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fm579_E2	GCACCTCGACGGTGTGGTATCGTGCCCGCATCGSAGGTGTGTGGTCCAGTGTACTGCTTCACCCCAAGTCCGTGTGGTGGTGGGGACGACCGACCGKTTCCGGCGTCCCTACCTACACCTGG																																																
F8_E2	A	P	R	R	C	G	I	V	P	A	S	E/Q	V	C	G	P	V	Y	C	F	T	P	S	P	V	V	V	G	T	T	D	R	F	G	V	P	T	Y	T	W									
F31_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
F413_E2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Figura A4. Continuación.

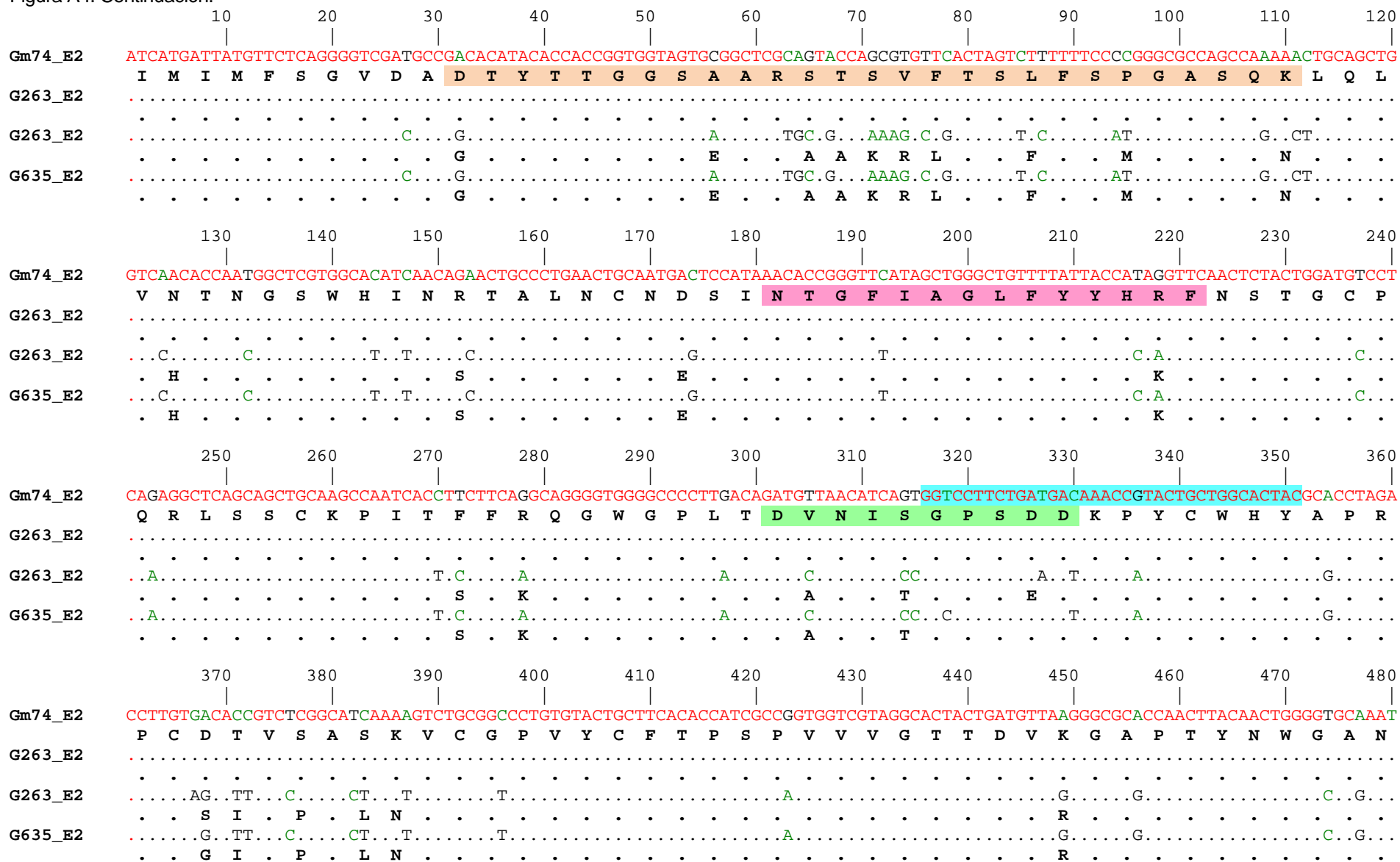


Figura A4. Continuación.

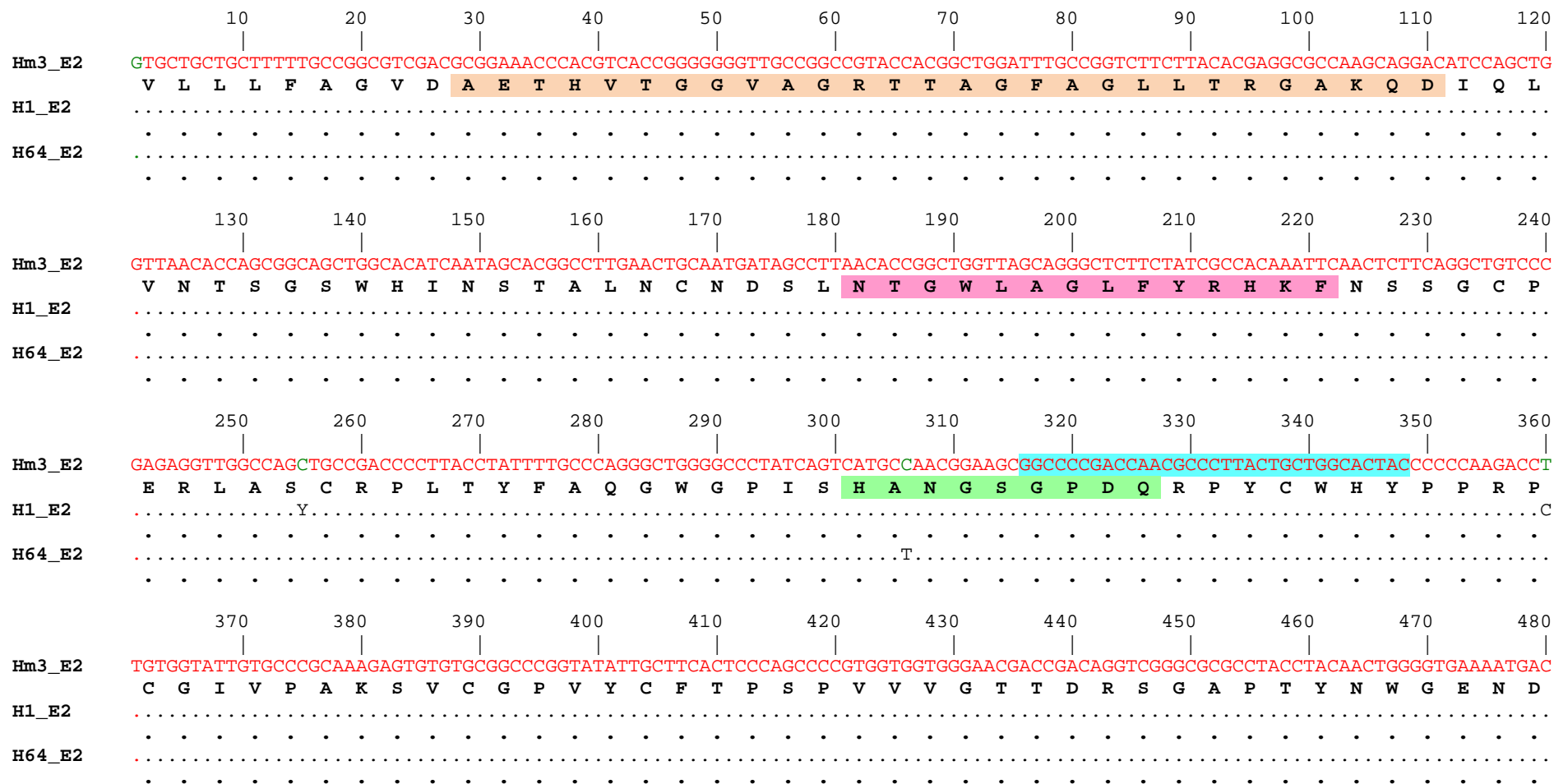


Figura A4. Continuación.

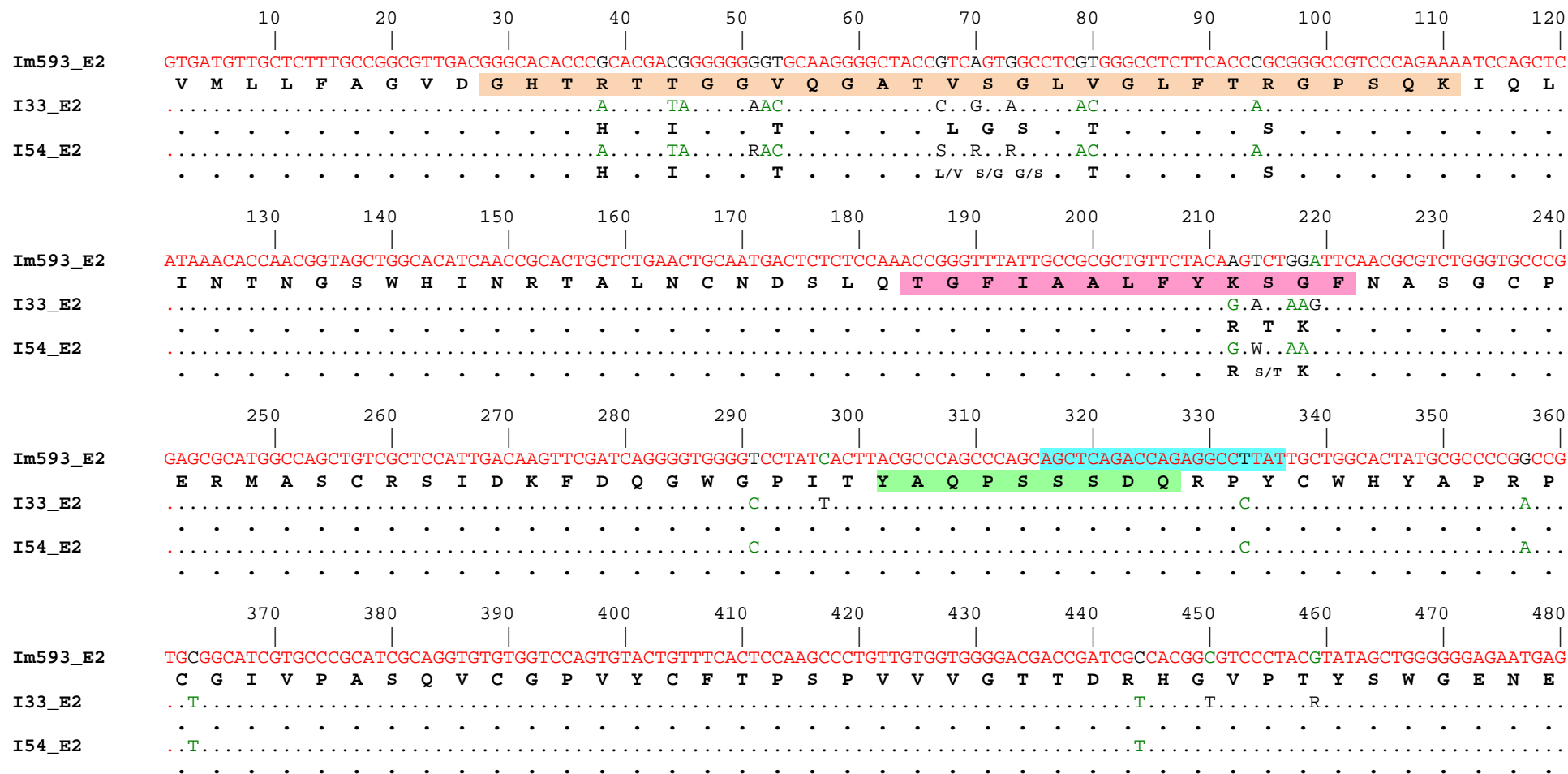


Figura A4. Continuación.

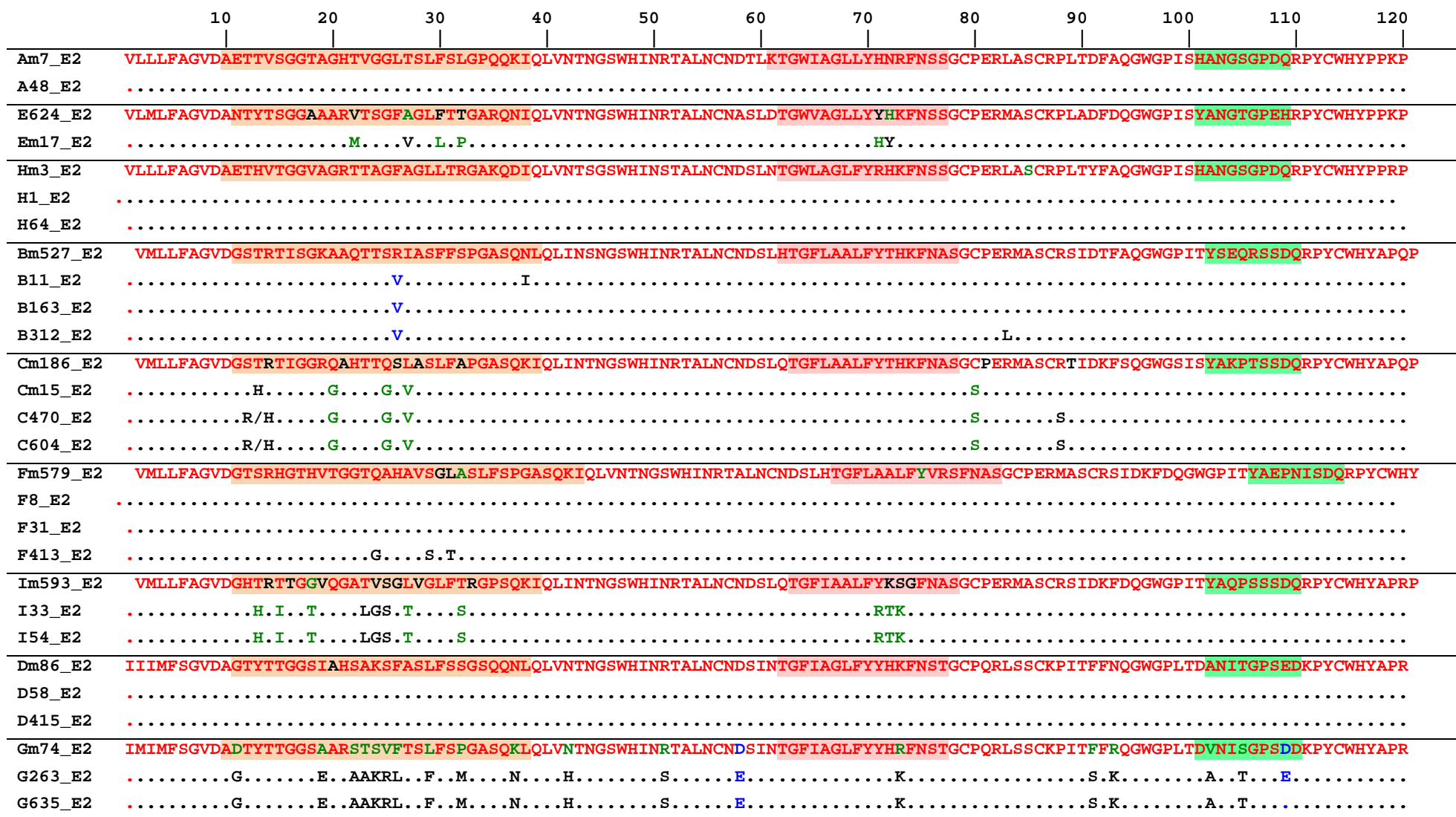


Figura A5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región E2 (aa-9 - 111) (nt 1443-2013). La región HVR1 está resaltada en color naranja, HVR2 en verde, HVR3 en fucsia.



### 10.4. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región Core

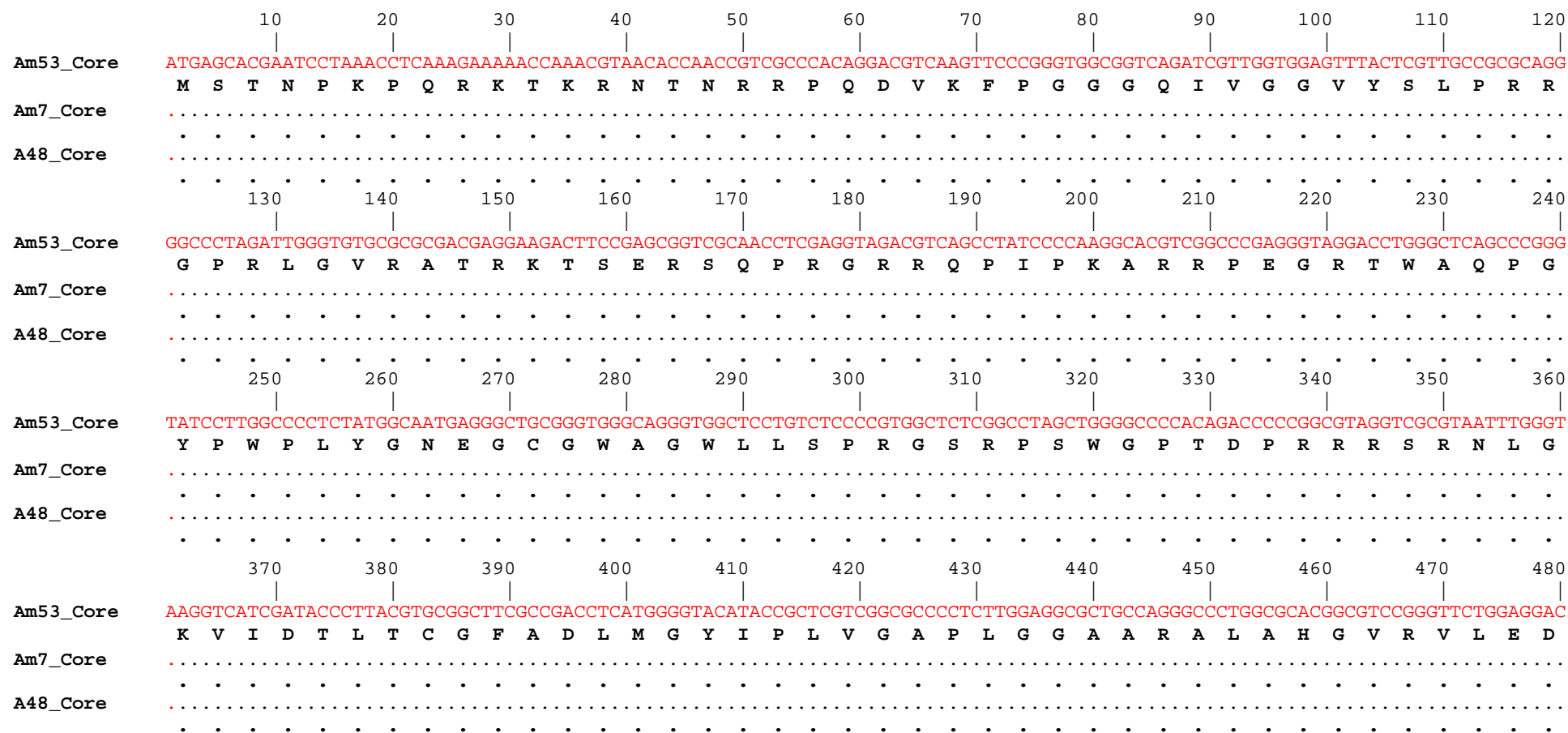


Figura A6. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región Core (nt 302-875). Las secuencias están indicadas con el código del paciente (A-I) y los días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Bm527_Core	ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATCGTCGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGG											
B11_Core	M S T N P K P Q R K T K R N T N R R P Q D V K F P G G G Q I V G G V Y L L P R R											
B163_Core	.....C.....Y.....											
B312_Core	.....											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
Bm527_Core	GGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTACACAACCTCGTGGACGGCGACAACCTATCCCAAGGCTCGCCGCCCCGAGGGCAGGGACTGGGCTCAGCCCGGA											
B11_Core	G P R L G V R A T R K T S E R S Q P R G R R Q P I P K A R R P E G R D W A Q P G											
B163_Core	.....											
B312_Core	.....											
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
Bm527_Core	TACCCTTGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGCATGGGGTGGCAGGATGGCTCCTGTACCTCGTGGCTCCCGCCTAGTTGGGGCCCCAATGACCCCCGCGTAGGTCGCGTAATTTGGGT											
B11_Core	Y P W P L Y G N E G M G W A G W L L S P R G S R P S W G P N D P R R R S R N L G											
B163_Core	.....											
B312_Core	.....											
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
Bm527_Core	AAAGTCATCGACACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGTACATTCCGCTCGTGGCGCCCCCTAGGGGGCGCCGAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGTTCTGGAGGAC											
B11_Core	K V I D T L T C G F A D L M G Y I P L V G A P L G G A A R A L A H G V R V L E D											
B163_Core	.....Y.....											
B312_Core	.....T.....C.....											

Figura A6. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																												
<b>Cm15_Core</b>	ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAAMCMANCNTAACACCATCCGCCGCCACAGGACGTTAAGTTCCCGGGCGGTGGYAGATCGTYGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCCGAGG																																							
	M	S	T	N	P	K	P	Q	R	K	T/N	X	X	N	T	I	R	R	P	Q	D	V	K	F	P	G	G	G	Q	I	V	G	G	V	Y	L	L	P	R	R
<b>C15_Core</b>	.....																																							
<b>C470_Core</b>	.....N.....																																							
<b>C604_Core</b>	.....A.....K.....																																							
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240																												
<b>Cm15_Core</b>	GGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTTCGCAACCTCGTGAAGGCGACAACCTATCCCAAGGCTCGCCAGCCGAGGGCAGGGCTGGGCTCAGCCCGGG																																							
	G	P	R	L	G	V	R	A	T	R	K	T	S	E	R	S	Q	P	R	G	R	R	Q	P	I	P	K	A	R	Q	P	E	G	R	A	W	A	Q	P	G
<b>C15_Core</b>	.....R.....A.....																																							
<b>C470_Core</b>	.....R.....																																							
<b>C604_Core</b>	.....C.....R.....P.....																																							
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360																												
<b>Cm15_Core</b>	TACCCTTGGCCCTCTACGCAATGAGGGCCTGGGGTGGCAGGATGGCTCCTGTACCRCRGGCTCTGGCCTAATTGGGGYCCCACCGACCCCGGCGTARGTCGCGGAATTTGGGT																																							
	Y	P	W	P	L	Y	G	N	E	G	L	G	W	A	G	W	L	L	S	P	H/R	G	S	R	P	N	W	G	P	T	D	P	R	R	K/R	S	R	N	L	G
<b>C15_Core</b>	.....A.....H.....																																							
<b>C470_Core</b>	.....K.....A.....G.....R.....																																							
<b>C604_Core</b>	.....K.....H.....R.....G.....R.....																																							
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480																												
<b>Cm15_Core</b>	AAGGTTATCGATAACCTCACATGCGGCYTCGCCGACCTCATGGGTACATTCGCTTGTCGGCGCCCCCTAGGGGGCGTTGCCAGRGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGRYTSTGGAGGAC																																							
	K	V	I	D	T	L	T	C	G	F/L	A	D	L	M	G	Y	I	P	L	V	G	A	P	L	G	G	V	A	R	A	L	A	H	G	V	R	X	L/V	E	D
<b>C15_Core</b>	.....C.....L.....AC.C.....																																							
<b>C470_Core</b>	.....C.....AC.C.....																																							
<b>C604_Core</b>	.....C.....L.....AC.C.....T.L.....																																							

Figura A6. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Dm86_Core	ATGAGCACACTTCTTAAACCTCAAAGAAAAACAAAAGAAACACCATCCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGACAGATCGTTGGTGGAGTATACGTGTTGCCGCGCAGG											
D39_Core	M S T L P K P Q R K T K R N T I R R P Q D V K F P G G G Q I V G G V Y V L P R R											
D58_Core	.....R.....											
D415_Core	.....T.C..... .....A.....											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
Dm86_Core	GGCCACGATTGGGTGTGTGCGCGACGCGTAAACTTCTGAACGGTCACAGCCTCGCGGACGRCGACAGCCTATCCCAAGGCGCGTCGGAGCGAAGGCCGGTCTCGGGCTCAGCCCGGG											
D39_Core	G P R L G V C A T R K T S E R S Q P R G R R Q P I P K A R R S E G R S W A Q P G											
D58_Core	.....R.....											
D415_Core	.....											
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
Dm86_Core	TACCCTTGGCCCTCTATGGTAACGAGGGTGCGGTGGCAGGGTGGCTCCTGTCCCACGCGGCTCCCGTCTTCTTGGGGCCCAATGACCCCCGCGAAGGTCCCGCAATTTGGGT											
D39_Core	Y P W P L Y G N E G C G W A G W L L S P R G S R P S W G P N D P R R R S R N L G											
D58_Core	.....Y.....											
D415_Core	.....T.....A.....											
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
Dm86_Core	AAAGTCATCGATACCCCTTACGTGTGGATTCCGCCGACCTCATGGGTACATCCCGCTCGTCGGCGCCCCGTAGGAGGCGTCGCAAGAGCCTTCGCGCAYGGCGTGAGGGCCCTTGAAGAC											
D39_Core	K V I D T L T C G F A D L M G Y I P L V G A P V G G V A R A F A H G V R A L E D											
D58_Core	.....											
D415_Core	.....G.....											

Figura A6. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
<b>Fm579_ Core</b>	ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAACGTAACACCAACCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGG											
<b>F8_ Core</b>	M S T N P K P Q R K T K R N T N R R P Q D V K F P G G G Q I V G G V Y L L P R R											
<b>F31_ Core</b>	.....M.....											
<b>F413_ Core</b>	.....											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
<b>Fm579_ Core</b>	GGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTCAACCTCGTGAAGGCGACAGCCTATCCCCAAGGCTCGCCGCCCGAGGGTAGGGCCTGGGCTCAGCCCGGG											
<b>F8_ Core</b>	G P R L G V R A T R K T S E R S Q P R G R R Q P I P K A R R P E G R A W A Q P G											
<b>F31_ Core</b>	.....											
<b>F413_ Core</b>	.....											
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
<b>Fm579_ Core</b>	TACCCTTGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGCTTAGGGTGGGAGGATGGCTCCTGTCCCCCATGGCTCCCGGCCTAATTGGGGCCCCACGGACCCCGGCGTAGGTGCGGTAATTTGGGT											
<b>F8_ Core</b>	Y P W P L Y G N E G L G W A G W L L S P H G S R P N W G P T D P R R R S R N L G											
<b>F31_ Core</b>	.....											
<b>F413_ Core</b>	.....T.....											
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
<b>Fm579_ Core</b>	AAGGTCATCGATACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATTCCGCTCGTCGGCGCCCCCTAGGGGGCGTTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAGGAC											
<b>F8_ Core</b>	K V I D T L T C G F A D L M G Y I P L V G A P L G G V A R A L A H G V R V L E D											
<b>F31_ Core</b>	.....Y.....Y.....											
<b>F413_ Core</b>	.....C.....											

Figura A6. Continuación.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
<b>Im593_ Core</b>	ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCACAGGACGTTAAGTTCCTCCGGCGGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGG											
<b>I54_ Core</b>	M S T N P K P Q R K T K R N T N R R P Q D V K F P G G G Q I V G G V Y L L P R R											
<b>I33b_ Core</b>	.....											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
<b>Im593_ Core</b>	GGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACCCAGGAAGACTTCCGAGCGGTCAACCTCGTGAAGGCGACAACCTATCCCCAAGGCTCGCCAGCCCCAGGGCAGGGCCTGGGCTCAGCCCCGG											
<b>I54_ Core</b>	G P R L G V R A T R K T S E R S Q P R G R R Q P I P K A R Q P E G R A W A Q P G											
<b>I33b_ Core</b>	.....C.....P.....C.....P.....											
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
<b>Im593_ Core</b>	TACCCTTGCCCCCTCTATGGTAATGAGGGCATGGGGTGGGCAGGATGGCTCCTGTACCCCCGGGGCTCTCGGCCTAGTTGGGGCCCCACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGTAACTTGGGT											
<b>I54_ Core</b>	Y P W P L Y G N E G M G W A G W L L S P R G S R P S W G P T D P R R R S R N L G											
<b>I33b_ Core</b>	.....A.....H.....R.....H.....											
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
<b>Im593_ Core</b>	AAGGTCATCGATACCCTCACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATTCCGCTCGTCGGCGCCCCCTTAGGGGGCGCCAGGGCYCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAGGAC											
<b>I54_ Core</b>	K V I D T L T C G F A D L M G Y I P L V G A P L G G A A R A L A H G V R V L E D											
<b>I33b_ Core</b>	.....C.....A.T.....V.....C.....A.Y.....V/A.....											

Figura A6. Continuación.

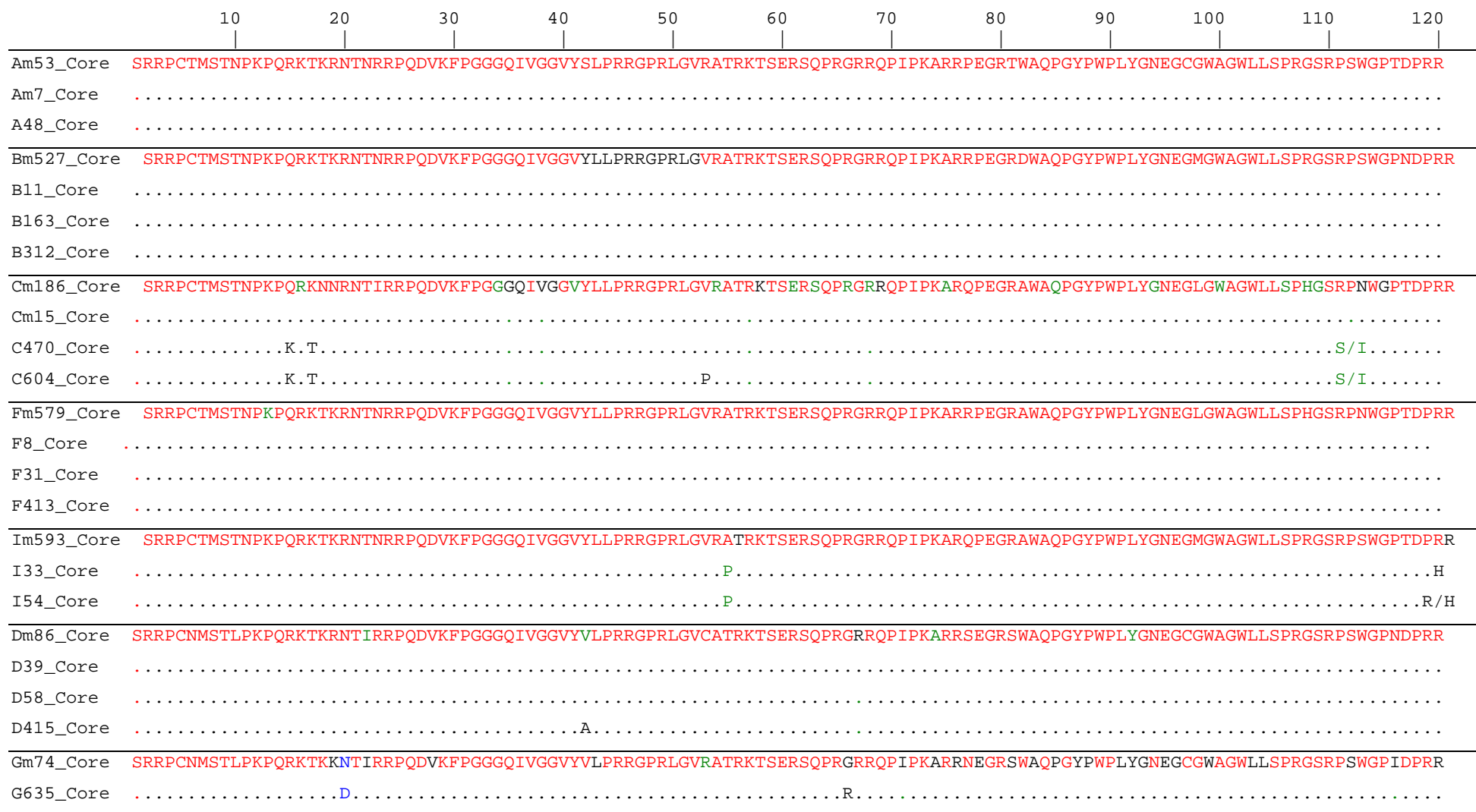


Figura A7. Alineamiento de las secuencias directas de aminoácidos de la región Core (nt 302-875). Los nombres de las secuencias indican el tiempo de muestreo en días respecto a la fecha del trasplante, m: previo al trasplante.