



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis de las mutaciones en las secuencias de nucleótidos de las proteínas virales NS5A y NS5B asociadas a resistencia al tratamiento con los inhibidores de acción directa pan-genómicos sofosbuvir / velpatasvir obtenidas de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

LISSETH PÉREZ VALERIO

DIRECTORA: DRA. FRANCISCA SOSA JURADO

CODIRECTORA: DRA. LORENA MILFLORES FLORES

AGOSTO, 2024



AGRADECIMIENTOS

A mis amados padres José Adrián y Claudia por su apoyo incondicional, por motivarme y acompañarme en cada paso del camino tanto de forma académica como personal, a mi hermano Adrián, gracias por siempre apoyarme y cuidar de mí, por siempre estar y ser mi maestro de vida.

A mi directora de tesis la D.C Francisca Sosa Jurado, gracias por sus consejos, enseñanzas y su guía, gracias por orientarme y confiar siempre en mi trabajo.

A la D.C. Lorena Milflores Flores, por su apoyo, su orientación y sus consejos, por ser una excelente profesora y una guía en este proceso.

Al D.C. Luis Márquez Domínguez, por sus enseñanzas, su tiempo, su paciencia y enriquecimiento durante la realización de este proyecto.

En el mismo espíritu de gratitud, extendiendo mi agradecimiento a mis amigos quienes siempre estuvieron presentes durante este proceso, gracias por su apoyo incondicional en los momentos más necesarios. Finalmente, a mis amigos y compañeros del laboratorio de virología, con quienes compartí experiencias y recuerdos que siempre atesorare, así como el apoyo mutuo que siempre nos brindamos.

Contenido

LISTADO DE ABREVIATURAS	10
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN	13
Epidemiología del VHC.....	14
Incidencia en México	16
Virus de la hepatitis C (VHC).....	16
Organización genómica	17
Ciclo de replicación	21
Tratamientos contra la hepatitis C.....	23
PROTEÍNAS VIRALES NS5A Y NS5B DEL VHC	25
Proteína NS5A VHC	25
Proteína NS5B VHC	27
Antivirales de acción directa contra VHC genotipos GT1-GT6.....	29
Velpatasvir	29
Sofosbuvir	31
Sustituciones asociadas a Resistencia (SAR)	32
HIPÓTESIS	35
JUSTIFICACIÓN	35
OBJETIVOS	36
Objetivo general.....	36
Objetivos específicos.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Diseño de estudio	36
Tamaño de muestra.....	36

Muestras.....	36
Población de estudio	37
Criterios de inclusión	37
Criterios de exclusión	37
Criterios de eliminación	37
METODOLOGÍA.....	37
Protocolo	37
Muestreo.....	37
Población de estudio.....	37
Criterios de selección de muestras	38
Extracción de ARN viral de muestras de pacientes con VHC.....	38
Determinación de la concentración de ARN y ADN	38
Obtención de ADN a partir de ARN viral por retrotranscripción (RT)	38
Genotipificación del VHC por RFLP (en caso de no tener reportado el genotipo viral por otras técnicas).....	39
Obtención de fragmentos de los genes que codifican a las proteínas NS5A y NS5B por RT-PCR punto final.....	40
Primera ronda de una reacción de PCR y una reacción de PCR anidado	40
Purificación de productos PCR.....	40
Secuenciación.....	40
Diseño de oligonucleótidos iniciadores (paciente no respondedor con resultado de estar infectado con genotipo 2)	41
Obtención de secuencias del VHC	41
RESULTADOS	42
Genotipificación por RFPL.....	42
Secuencias de nucleótidos de las regiones NS5A y NS5B del VHC genotipo 2	43

Oligonucleótidos Iniciadores.....	45
Obtención de fragmentos de PCR	48
Resultados de secuenciación.....	50
Obtención de estructuras proteicas.....	60
Obtención de estructuras proteicas NS5A y NS5B del VHC GT2	60
Obtención de estructuras por homología.....	62
Localización de las SAR dentro de las proteínas NS5A y NS5B del VHC	64
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	72
REFERENCIAS	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la partícula viral del virus de hepatitis C

Figura 2. Esquema de la organización genómica del VHC y las proteínas virales.

Figura 3. El ciclo de replicación del virus de la hepatitis C (VHC)

Figura 4. La organización esquemática de los dominios NS5A.

Figura 5. Esquemática organización de la estructura de la NS5B

Figura 6. Estructura química de velpatasvir

Figura 7. Estructura química de daclatasvir

Figura 8. Estructura química de velpatasvir

Figura 9. Región UTR (fragmento de 251 pb)

Figura 10. Productos de restricción con la enzima MvaI en un fragmento de 251pb.

Figura 11. Oligonucleótidos que fueron diseñados para obtener la región NS5A.

Figura 12. Oligonucleótidos que fueron diseñados para obtener la región NS5B.

Figura 13. Fragmentos obtenidos con los oligos para la proteína NS5A

Figura 14. Fragmento de 451 pb de la proteína NS5B perteneciente al paciente 3

Figura 15. Resultados de secuenciación del producto de la proteína NS5B del P1.

Figura 16. Resultado de secuenciación para el producto de PCR de la UTR para el P1

Figura 17. Resultado de secuenciación para el producto de PCR de la UTR para el P3 (control)

Figura 18. Oligonucleótidos diseñados para obtener la región CORE

Figura 19. Resultado de la obtención del producto PCR de la proteína Core

Figura 20. Resultado de la secuenciación del producto Core del P1

Figura 21. Resultado de la secuenciación del producto Core del P3

Figura 22. Fragmento del alineamiento entre las secuencias consenso de los subtipos 2, 2a y 2b, así como de la recombinante 2k/1b para la proteína NS5A

Figura 23. Fragmento del alineamiento entre las secuencias consenso de los subtipos 2, 2a y 2b, así como de la recombinante 2k/1b para la proteína NS5B

Figura 24. Estructura cristalizada de la proteína NS5A genotipo 1b del VHC con PDB: 3FQQ

Figura 25. Estructura cristalizada de la proteína NS5B genotipo 1b del VHC PDB: 4TLR

Figura 26. Superposicionamiento de la estructura obtenida en PDB:3FQQ (color azul) y la estructura obtenida por homología (color rojo) de la proteína NS5A del VHC

Figura 27. Superposicionamiento de la estructura obtenida en PDB: 4TLR (color amarillo) y la estructura obtenida (color morado) por homología de la proteína NS5B del VHC

Figura 28. Modelo generado por homología de la proteína NS5A (color rojo) del VHC con sus respectivas sustituciones asociadas a resistencia (color verde)

Figura 29. Modelo generado por homología de la proteína NS5B (color morado) del VHC con sus respectivas sustituciones asociadas a resistencia (color verde)

Figura 30. Sustituciones asociadas a resistencia en la proteína NS5A del VHC. De color verde se muestra al aminoácido de referencia, mientras que en color azul se presenta la sustitución L31M, C92R y Y93H

Figura 31. Sustituciones asociadas a resistencia en la proteína NS5B del VHC. De color verde se muestra al aminoácido de referencia, mientras que en color azul se presenta la sustitución L159F y S282R

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Las proteínas del virus de la hepatitis C (VHC) y sus diferentes funciones en la replicación viral.....	19
Tabla 2. Sustituciones asociadas a resistencia (SAR) en medicamentos indicados en el tratamiento con AAD.	33
Tabla 3. Mezcla de reacción utilizada en la retrotranscripción.....	39
Tabla 4. Reacción de restricción enzimática para genotipificación viral.....	39
Tabla 5. ID del GenBank de los subtipos 2, 2a y 2b del VHC.....	44
Tabla 6. Oligonucleótidos iniciadores diseñados para obtener la región NS5A para el genotipo 2 del VHC.	45
Tabla 7. OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES DISEÑADOS PARA OBTENER LA REGIÓN NS5B PARA EL GENOTIPO 2 DEL VHC.....	46
Tabla 8. Secuencias de la región CORE del VHC genotipo 2a y 2b.	52
Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para obtener la proteína Core para el genotipo 2a y 2b del VHC.	53
Tabla 10. ID DE SECUENCIAS DEL VHC RECOMBINANTE 2K/1B.....	57

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AAD	Antivirales de acción directa
ARN	Ácido ribonucleico
CHC	Carcinoma hepatocelular
CIBIOR	Centro de Investigación Biomédica de Oriente
cLDL	Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
CLDN1	Claudina-1
DCV	Daclatasvir
DGAT1	Enzima diacilglicerol acetiltransferasa-1
dsARN	ARN de doble cadena
DSV	Dasabuvir
EBR	Elbasvir
RFCE	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EphA2	Receptor 2 de efrina tipo A
GT	Genotipo
GLE	Glecaprevir
GZR	Grazoprevir
HCC	Hepatitis C crónica
HINT 1	Nucleósido de la triada de la histidina 1
HSPG	Proteoglicanos de sulfato de heparina

IRES	Sitio de entrada interno al ribosoma
LCS	Secuencias cortas de baja complejidad
LDLr	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LDV	Ledipasvir
NI	Inhibidores nucleosídicos
NNI	Inhibidores no nucleosídicos
OBV	Ombitasvir
OR	Organelos de replicación
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés Open Reading Framework)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pegINF α -RBV	Interferón alfa pegilado y la ribavirina
PIB	Pibrentasvir
PTV	Paritaprevir
RBV	Ribavirina
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
RT	Retrotranscriptasa
RTV	Ritonavir
RVS	Respuesta viral sostenida
SAR	Sustitución asociada a resistencia
SMV	Simeprevir
SOF	Sofosbuvir

Tm	Temperatura de fusión o hibridación
UTR	Región no traducida (del inglés Untranslated Region)
VDM	Vesículas de doble membrana
VEL	Velpatasvir
VHC	Virus de hepatitis C
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La hepatitis C es una enfermedad que provoca una inflamación en el hígado causada por el virus de la hepatitis C, esta enfermedad puede presentarse de forma aguda o crónica, siendo esta última la causal de manifestaciones clínicas como cirrosis o carcinoma hepatocelular; tiene una morbilidad estimada de 400 millones de personas alrededor del mundo, por lo que a lo largo de los años se han utilizado diferentes tratamientos médicos con la finalidad de erradicarla como lo son los antivirales de acción directa pangenotípicos enfocado a interrumpir el ciclo de replicación del virus, entre los que se encuentre el fármaco epclusa (velpatasvir/sofosbuvir), dirigido a las proteínas virales NS5A y NS5B. A pesar de la alta eficacia del tratamiento (95% a 100%) para lograr una respuesta viral sostenida, un subconjunto de pacientes etiquetados como no respondedores sigue sin poder erradicar el VHC.

La alta variabilidad del genoma del virus de la hepatitis C limita la amplificación por RT-PCR. En la primera parte de este trabajo se amplificó un producto de 150pb de la región NS5B. Los oligonucleótidos empleados lograron amplificar otros segmentos de las proteínas NS5A y NS5B, por lo que se consideró genotipificar al virus a partir de la muestra. En la segunda parte de este trabajo se diseñaron oligonucleótidos para la región Core, región conservada que se utiliza para la genotipificación de este tipo de virus, los resultados de secuenciación permitieron identificar correctamente el genotipo de la muestra como una recombinante 2k/1b de origen europeo de poca prevalencia a nivel mundial. En la literatura se reporta que los tratamientos habituales tienen poca efectividad en este tipo de recombinante y es uno de los pocos casos reportados de esta recombinante dentro de la República Mexicana.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una enfermedad que causa inflamación del hígado y es producida por el virus de la hepatitis C (VHC). En un primer escenario su transmisión se da a través de transfusión de sangre, trasplante de órganos sólidos, uso de drogas intravenosas, así como el realizarse tatuajes o piercings con material contaminado, tener prácticas sexuales de riesgo con personas infectadas y la transmisión perinatal (de madres a hijos recién nacidos), siendo esta la de menor frecuencia. En el segundo escenario patogénico da inicio con la replicación del virus, desarrollando así la sintomatología de la enfermedad. Se pueden presentar síntomas de una hepatitis aguda, y la infección puede ser resuelta en forma natural por el individuo, o bien persistir durante varios años como hepatitis C crónica (HCC), que al inicio será clínica y bioquímicamente indistinguible, llegando a presentar la transición insidiosa y sin manifestaciones clínicas aparentes hacia la cirrosis llegando a desencadenar carcinoma hepatocelular (CHC) (Preciado et al., 2014; Houghton, 2019; Razavi-Amoli & Alipour, 2022)

Epidemiología del VHC

Se estima que para el año 2019, 58 millones de personas alrededor del mundo estaban infectadas con el VHC, de las cuales solo 15.2 millones (21%) de estas personas se encontraban diagnosticadas; y solo 9.4 millones (62%) de las personas ya diagnosticadas habían sido tratadas con antivirales de acción directa (AAD) (Organización Mundial de la Salud, 2022). Se ha registrado que de 3 a 4 millones de personas son infectadas cada año, de las cuales más de 350 mil mueren por comorbilidades (Salvatierra, 2017).

En el año 2021 Sedeño-Monge, et al., estimaron que para el año 2015, la morbilidad por virus de hepatitis C fue de aproximadamente 500 millones de personas infectadas, de las cuales aproximadamente 400 mil fallecieron por complicaciones médicas como lo son la cirrosis hepática (CH) y carcinoma hepatocelular. Además se observó que el 25% de las personas infectadas con VHC que presentaban una

infección aguda eliminaban al virus de forma espontánea, y la mayoría de ellos se infectan de forma crónica afectando así a 71 millones de personas, siendo propensos a presentar alguna complicación médica a lo largo de su vida (Sedeño-Monge et al., 2021). Debido a su alta prevalencia la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha implementado la “estrategia mundial del sector de la salud sobre las hepatitis virales 2022-2030”, con la finalidad de reducir en un 65% la mortalidad y en un 90% la incidencia del VHC para el año 2030 (Organización Mundial de la Salud, 2022).

Existen seis genotipos (GT) de VHC, cada uno de ellos con múltiples subtipos (a, b, c, en adelante). La variabilidad genética entre genotipos es de alrededor de 30%, mientras que para los subtipos es de 15% (Preciado et al., 2014) siendo cada uno de estos distribuido por regiones en el mundo, siendo las regiones de mayor prevalencia el Mediterráneo Oriental con 2.3%, Europa con un 1.5% seguidos de América con un 1.0% según datos de la OMS (Figura 1); dentro de la distribución de los GT para el VHC, los GT 1-3 se encuentran presentes en todo el mundo, el GT4 se encuentra presente en Medio Oriente y África, el GT5 prevalece en su mayoría en África y el GT6 en Asia, mientras que el GT7 es poco común, encontrándose solamente en África central. (Sedeño-Monge et al., 2022; Organización Mundial de la Salud, 2022).

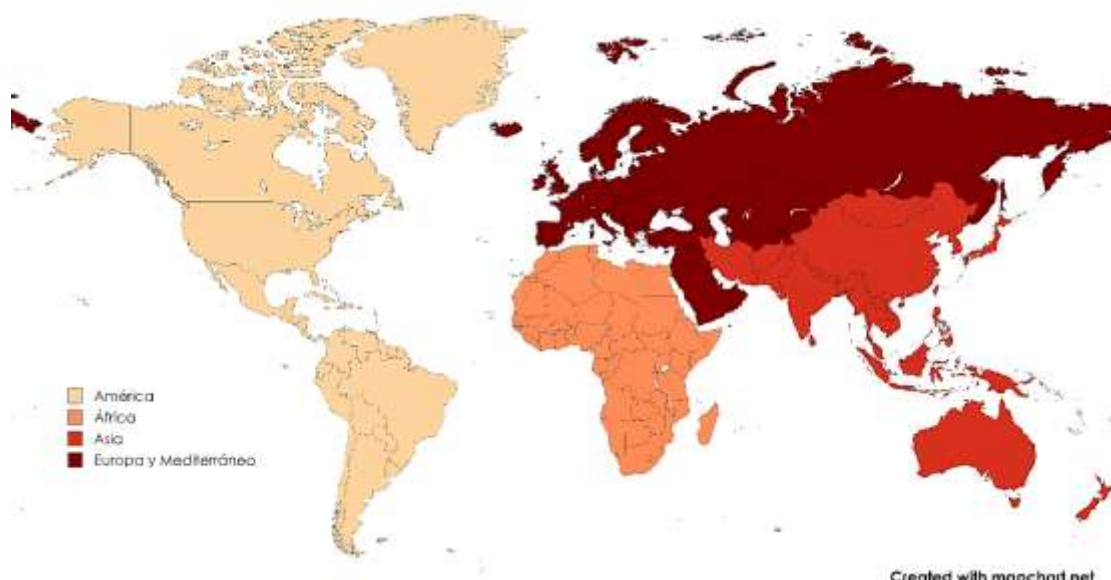


FIGURA 1 . INCIDENCIA DEL VHC A NIVEL MUNDIAL. MODIFICADO DE ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2023; SALVATIERRA, 2017

Incidencia en México

Con los datos obtenidos entre los años 2008 a 2019, en el año 2021 Sedeño-Monge, et al., observaron que entre los estados de mayor incidencia se encontraban Baja California Norte, Ciudad de México, Jalisco, Sinaloa y Estado de México, teniendo en conjunto un total de 19,271 nuevos casos, mostrándose mayor incidencia en hombres que en mujeres con 1,490 y 859 respectivamente, con los rangos de edad en hombres de 50 a 59 años y en mujeres de 60 a 64 años, asimismo, se determinó la distribución de los diferentes genotipos del VHC en México, tomando como referencia un total de 11,838 muestras, determinando que 8,019 casos (67.74%) fueron GT1, 2 495 casos (21.1%) para GT2 y 827 casos (7.0%) en GT3; siendo los genotipos de menos incidencia los GT4 (0.41%) y GT5 (0.05%) (Sedeño-Monge et al., 2021). En 2023, Kershenobich, et al., estimaron que la prevalencia de VHC en México ronda entre el 0.4% a 0.6% de la población, siendo los estados de mayor prevalencia Jalisco, Colima y Baja California (Kershenobich et al., 2023).

Virus de la hepatitis C (VHC)

El virus de la hepatitis C pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus*, es un virus de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple de polaridad positiva, cuenta con seis genotipos diferentes que a su vez se dividen en subtipos (más de 90 subtipos diferentes). El virión posee una estructura esférica (Figura 2) con un diámetro de entre 55 a 65 nm (Du & Tang, 2016), su genoma se encuentra cubierto por una cápside icosaédrica formada por el ensamblaje de unidades de proteína de la cápside, también conocida como proteína C o proteína core en inglés. Es un virus envuelto ya que al exterior de la cápside se encuentran unidas las proteínas de envoltura 1 (E1) y proteínas de envoltura (E2) (Houghton, 2019).

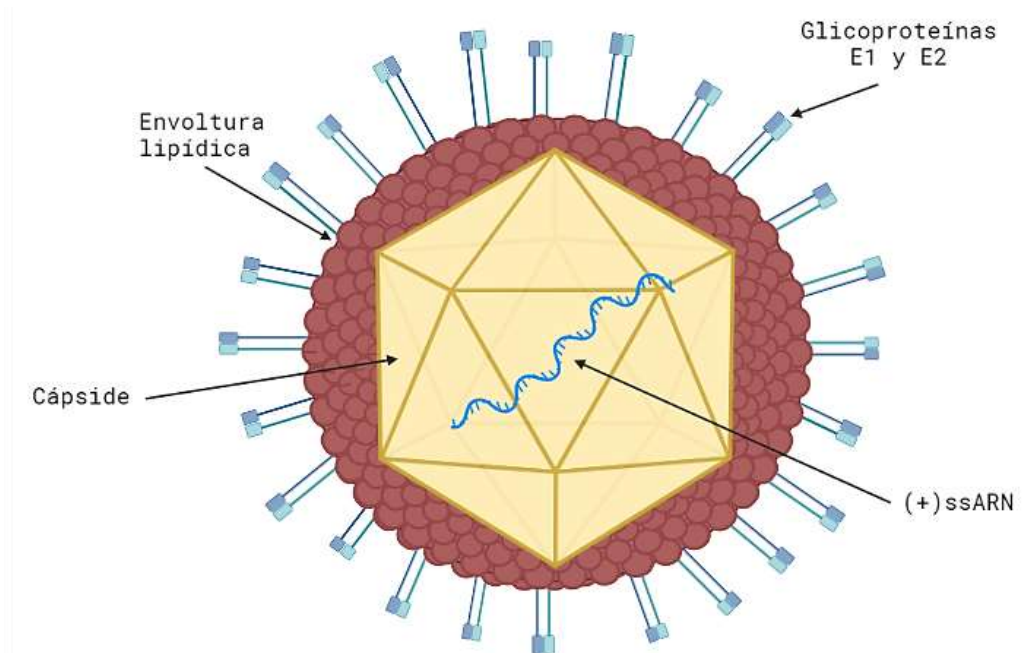


FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA PARTÍCULA VIRAL DEL VIRUS DE HEPATITIS C, EN EL QUE SE ENCUENTRA PRESENTE UNA CÁPSIDE ICOSAÉDRICA, EN SU INTERIOR SE ENCUENTRA UN ARN EN SENTIDO POSITIVO Y UNA ENVOLTURA LIPÍDICA EN LA QUE SE ENCUENTRAN UNIDAS LAS GLICOPROTEÍNAS E1 Y E2. CREADO CON BIORENDER.COM

Organización genómica

La estructura genómica del VHC es una cadena de ARN de aproximadamente 9,600 nucleótidos (Echeverría et al., 2015) en el que se encuentran dos regiones no traducibles (UTR por sus siglas en inglés de *Untranslated Region*) encontradas en los extremos 5' y 3' respectivamente y un marco de lectura abierto (ORF, Open Reading Frame) que codifica para una poliproteína de poco más de 3,000 aminoácidos (aa) (Figura 3), esta poliproteína es procesada, dando lugar a 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (*Hepatitis C Virus Databases*, 2005).

La función de las proteínas tanto estructurales como no estructurales se muestran en la Tabla 1. Las proteínas estructurales están conformadas por la proteína C de la cápside (también llamada proteína *core*, aa1 al aa192) y las proteínas de envoltura del virión E1 (del aa192 al aa384) y E2 (del aa384 al aa747), las cuales desempeñan un papel en la fijación del virus a la célula huésped. Por otro lado, las proteínas no estructurales presentan funciones específicas en la amplificación del genoma viral formando el complejo de replicación viral (Li et al., 2021), entre las

proteínas no estructurales se encuentran p7, una proteína integral de membrana de fusión poco conocida; estudios *in vitro* sugieren que pertenece a una familia de viroporinas y actúa como canal iónico de calcio (aa747 al aa810) (Steinmann & Pietschmann, 2010).

El resto de las proteínas no estructurales está centrado en el procesamiento de las poliproteínas y la replicación viral. La proteína NS2 (aa810 al aa1027) junto con el dominio amino terminal de la proteína NS3 (aa1027 al aa1658) forman la proteasa NS2-NS3 dependiente de zinc, que procesa el lugar de corte entre NS2 y NS3, además, NS2 interacciona molecularmente con p7 y E2 teniendo un papel crucial en la producción de viriones y NS3 que posee un dominio serina proteasa en el extremo amino terminal y un dominio helicasa/ATPasa en el extremo carboxilo terminal. La NS4A (aa1658 al aa1712) es un cofactor que se asocia con la proteasa NS3, formándose la proteasa NS3-NS4A, siendo indispensable para el ciclo de replicación del VHC, catalizando al resto de las proteínas no estructurales en las proteínas NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B (Koutsoudakis et al., 2013a).

Por otro lado, NS4B (aa1712 al aa1973) es una proteína integral de membrana cuya función es formar una red de membrana esencial para la formación del complejo de replicación. Otra de las proteínas no estructurales es NS5A (aa1973 al aa2421) cuya función aun no es clara en el ciclo de vida del VHC, sin embargo, se sabe que interacciona con proteínas celulares además de regular vías de señalización y por último la NS5B (aa2421 al aa3012) una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Koutsoudakis et al., 2013b).

TABLA 1. LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y SUS DIFERENTES FUNCIONES EN LA REPLICACIÓN VIRAL.

Proteína viral Función en el ciclo de replicación del VHC

Core	Empaquetar el ARN genómico del VHC para formar nucleocápsides y también participa en la síntesis de lípidos
E1 y E2	Responsables de la entrada del virión a las células
p7	Canal iónico, permitiendo la permeabilidad de la membrana por los iones y el ingreso de los virus a las células
NS2	Autoproteasa para romper la unión entre NS2 y NS3
NS3	NS3 contiene un dominio de proteasa amino terminal responsable del procesamiento de la poliproteína del VHC y un dominio de helicasa DExD-box carboxilo terminal responsable de la replicación del ARN del VHC a través de estructuras secundarias de ARN desenrolladas
NS4A	Cofactor de la proteasa NS3
NS4B	Funciona como un andamio para el complejo de replicación viral e inducir los reordenamientos de las vesículas de membrana
NS5A	Interactuar con una gran cantidad de proteínas celulares que son importantes para el ensamblaje viral y la función del complejo de replicación
NS5B	ARN-polimerasa dependiente de ARN del VHC responsable de la amplificación del ARN del VHC

Modificado de Li et al., 2021

GENOMA DEL VHC

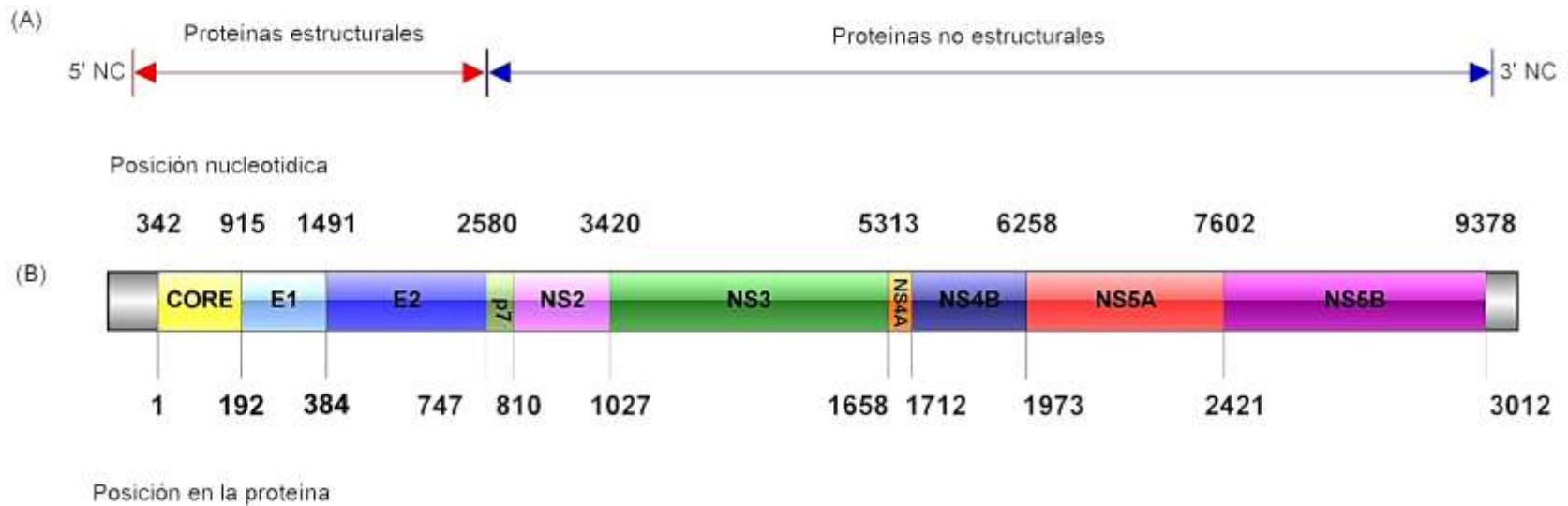


FIGURA 3. ESQUEMA DE LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL VHC Y LAS PROTEÍNAS VIRALES. (A) PROTEÍNAS ESTRUCTURALES (ROJO) Y PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (AZUL) DEL VHC, (B) PROTEÍNAS VIRALES QUE CONFORMAN AL VHC, LAS FLECHAS NEGRAS INDICAN EL SITIO DE CORTE DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS, ASÍ COMO LA POSICIÓN NUCLEOTÍDICA (PARTE SUPERIOR) Y POSICIÓN AMINOACÍDICA O PROTEÍNA (PARTE INFERIOR) EN EL GENOMA. MODIFICADO DE (ECHEVERRÍA ET AL., 2015)

Ciclo de replicación

El ciclo de replicación del VHC comienza con la unión de los viriones mediante las proteínas estructurales E1 y E2 a los receptores de los hepatocitos, el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) y los proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPG), permitiendo la interacción inicial entre el receptor B1 (SRB1 o SCARB1, scavenger receptor class B member 1) y la proteína tetraspanina CD81 (Figura 4). Luego de esto la proteína tetraspanina CD81 interactúa con la claudina-1 (CLDN1), y receptores de tirosina cinasa EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico) y EphA2 (receptor 2 de efrina tipo A) iniciando la entrada del virus en la célula del hepatocito generando un endosoma dependiente de clatrina, dando inicio al proceso de endocitosis (*Hepatitis C Online*, 2005). Una vez dentro de la célula, la clatrina es dispersada, permitiendo a la vesícula permanecer libre dentro del citosol y acidificando el endosoma. Al acidificarse el endosoma, la membrana de este y las proteínas de membrana del virus se fusionan, el resultado es la liberación de la nucleocápside del virus, la cual es la encargada de contener el ARN genómico viral (Li et al., 2021).

Por otra parte, la síntesis del genoma del virus da inicio en el lugar conocido como sitio de entrada interno del ribosoma, (IRES, del inglés internal ribosome entry site), en la región 5' del ARN viral este forma un complejo ribosoma-ARN, el cual se une a la membrana del retículo endoplásmico permitiendo el proceso de la traducción y da lugar a una única poliproteína que posteriormente es procesada por proteasas celulares y virales, inicia con la división de las proteínas estructurales E1, E2 luego de eso la cisteína proteasa NS2 y el extremo N-terminal de la proteína NS3 escinde a NS2 de NS3. Por último, NS3 junto con NS4A se unen a la membrana formando así el complejo de proteasa NS3-NS4A, este complejo se encarga de escindir las proteínas faltantes (NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Tabata et al., 2020).

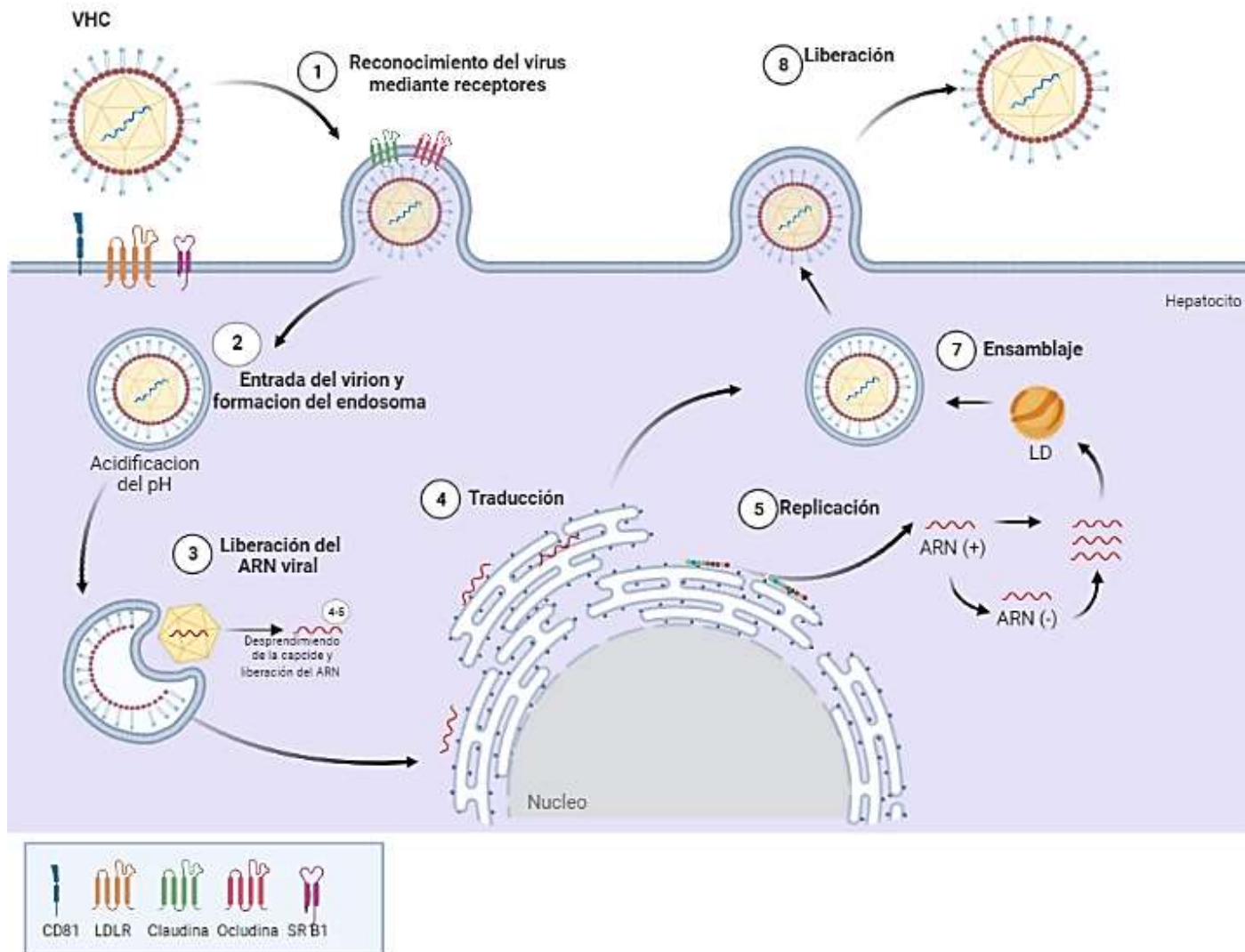


FIGURA 4. EL CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC). SE MUESTRAN LOS OCHO PASOS DEL CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL (KOUTSOUDAKIS ET AL., 2013B; MORADPOUR ET AL., 2007)

El ensamblaje de la partícula viral se lleva a cabo en el citoplasma formando la nucleocápside, esto ocurre cerca del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) y la enzima diacilglicerol acetiltransferasa-1 (DGAT1) formando la nucleocápside, la cual rodeara al ARN del virus. En el aparato de Golgi las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se encuentran implicadas en la secreción del VHC a la superficie celular mediante vesículas de transporte, mejor conocidos como cuerpos multivesiculares, luego de este transporte, las vesículas se fusionan con la membrana celular del hepatocito y con ayuda de las partículas lipoproteicas VLDL son liberadas las partículas virales del VHC (Moradpour et al., 2007; Scheel & Rice, 2013)

Tratamientos contra la hepatitis C

Durante cerca de 15 años, el interferón alfa pegilado y la ribavirina (pegINF α -RBV) fue el tratamiento contra VHC, su meta era alcanzar una respuesta viral sostenida (RVS) a la semana 24 o 48 después de terminar el tratamiento, es decir, un periodo de más de 24 semanas después de haber completado en tratamiento en el cual no se presenta una respuesta o carga viral positiva, sin embargo, la RVS era usualmente menor al 50%, en 2005 un estudio realizado por Duvnjak M. reporto una RVS del 42% al 45% para el genotipo 1, y para los genotipos 2 y 3 (GT1, GT2 y GT3) del 76% al 82% (Duvnjak et al., 2005). En el 2015 Sandoval-Ramírez y colaboradores informaron de una RVS de alrededor del 38% en pacientes mexicanos infectados con GT1, la baja RVS con pegINF α -RBV fue atribuida a la presencia de cirrosis y a una alta carga viral (Sandoval-Ramirez et al., 2015).

Más adelante, en el año 2011 fue aprobada la primera generación de los denominados antivirales de acción directa (AAD), conocidos también como DAAs por las siglas en inglés (direct acting antivirals), teniendo una mejora en la RVS siendo esta de entre el 65% al 75% (Pérez-Hernández et al., 2022). La última generación AAD fue aprobada en el año 2014, siendo estos una combinación de inhibidores cuyos fármacos pueden ir dirigidos a proteínas específicas, por lo que pueden ser diferenciados unos de otros gracias a que sus nombres comerciales poseen terminaciones diferentes, es decir, aquellos que utilizan la terminación

“previr” son inhibidores de la proteasa NS3/NS4, los inhibidores de la proteína viral NS5A presentan terminación “pasvir” e inhibidores de la ARN polimerasa dependiente de ARN, NS5B cuentan con la terminación “buvir”. Los AAD son usados siguiendo el historial clínico del paciente, debido a que los pacientes con cirrosis pueden tener efectos de descompensación hepática. Existen AAD más factibles en caso de tener o no cirrosis, conocidos como AAD de última generación teniendo una RVS del 94% al 100% (Sandmann et al., 2019).

En México en 2017 el sector de salud pública inicio el tratamiento con AAD genotipo específico en pacientes infectados con GT1, los comercialmente conocidos como Viekira-Pak (dasabuvir, ombitasvir, paritaprevir, y rinotavir) y Harvoni (ledipasvir y sofosbuvir) debido a que no se contaba con fármacos que fueran eficaces contra otros genotipos del virus. En un estudio realizado en una Unidad Médica de Alta Especialidad del Instituto Mexicano del Seguro Social (UMAE-HE, IMSS) en la ciudad de Puebla, México, con ambos esquemas se obtuvo 97% al 100% de RVS en pacientes con y sin cirrosis hepática, posterior al tratamiento AAD, se observó una mejora en el proceso inflamatorio del hígado, pero no así con el grado de fibrosis hepática (Melendez-Mena et al., 2021). En 2019 el IMSS inicio tratamiento con AAD pangénotípico para los genotipos 1, 2 y 3 con las combinaciones de AAD: sofosbuvir / velpatasvir, sofosbuvir / velpatasvir / ribavirina y glecaprevir / pibrentasvir. Siendo sofosbuvir un inhibidor de la NS5B (Eltahla et al., 2015, Gao et al., 2016); velpatasvir y pibrentasvir inhibidores de la NS5A, y el glecaprevir un inhibidor de las proteasas NS3/4A de tercera generación (McCauley & Rudd, 2016). En un estudio realizado en Puebla, México en 2019 por Carranza Aguilera, se trataron a 102 pacientes con diferentes esquemas: 42 pacientes recibieron el tratamiento con sofosbuvir/velpatasvir, mientras que 11 fueron tratados con sofosbuvir/velpatasvir/ribavirina, y 49 más con glecaprevir/pibrentasvir, respecto a los genotipos virales detectados en los pacientes el GT1 fue el de mayor prevalencia (37%), GT2 (36%), GT1b (22%), y GT3 (3%), con respecto al estadio de la enfermedad hepática, el 54% de los participantes en el estudio presentaron cirrosis, no obstante obteniendo una RVS del 98% (Aguilera Guirao et al., 2006).

PROTEÍNAS VIRALES NS5A Y NS5B DEL VHC

Proteína NS5A VHC

Actualmente se conoce poco sobre la estructura de la proteína NS5A, sin embargo, se sabe que posee una hélice anfipática corta en el carboxilo terminal formada por 33 aminoácidos, cuya función es indispensable para su unión a la membrana citoplasmática y para la replicación del genoma en un sistema de replicones. La proteína NS5A ayuda a la proteína NS5B a unirse a la plantilla de ARN viral (-), además de ser una fosfoproteína multifuncional que contiene zinc. Tiene una longitud aproximada de 450 aminoácidos, posee tres dominios, cada uno de ellos separados por secuencias cortas de baja complejidad (SBC, denominados LCS por sus siglas en inglés *Low-complexity regions*), que contribuyen a la formación de bucles flexibles expuestos a la superficie, y que unen a los 3 dominios de la proteína (Figura 5a) (Tellinghuisen et al., 2004).

El dominio I (aa33 al aa213) contiene un motivo conservado de tetracisteínas capaz de coordinarse con un átomo de zinc (Figura 5b), las mutaciones en el dominio de tetracisteínas interrumpen la interacción y anulan la replicación del genoma en un sistema de replicones, este dominio cuenta con un enlace disulfuro cerca del extremo C-terminal, y tanto el zinc como el disulfuro permiten el mantenimiento del pliegue del dominio en general. Entre las funciones del dominio I, se sabe que es una región de unión al ARN, involucrado en la replicación del virus, además tiene un papel en el ensamblaje del virus. El dominio II (aa250 al aa342) y el dominio III (aa356 al aa447) por otra parte interactúan con factores virales y/o celulares (como es el caso de la ciclofilina A y la fosfatidilinositol 4-quinasa III α , también conocida como PI4KA). El dominio II se tiene evidencia de que contiene 3 estructuras alfa-helicoidales cerca del extremo C-terminal, mientras que el dominio III solo se tiene evidencia de que participa en el ensamblaje de los viriones (Yin et al., 2018).

La proteína NS5A tiene dos formas con características moleculares aparentemente distintas, referidas como la especie basal y la hiperfosforilada, se han detectado múltiples sitios de fosforilación dentro del LCS I, también se han identificado otros sitios de fosforilación en el dominio I, en el péptido LCSII y en el dominio III (Ross-Thrieland & Harris, 2015). Cada una de las diferentes funciones de NS5A parecen estar reguladas mediante la fosforilación de los LCS ya que pueden actuar como reguladores intermediarios en la replicación del ARN y el ensamblaje del virión. La fosforilación de la NS5A es funcionalmente importante, pero los mecanismos moleculares por la cual esta modificación postraduccional, modula la función de la proteína aún quedan por dilucidarse (Goonawardane et al., 2018).

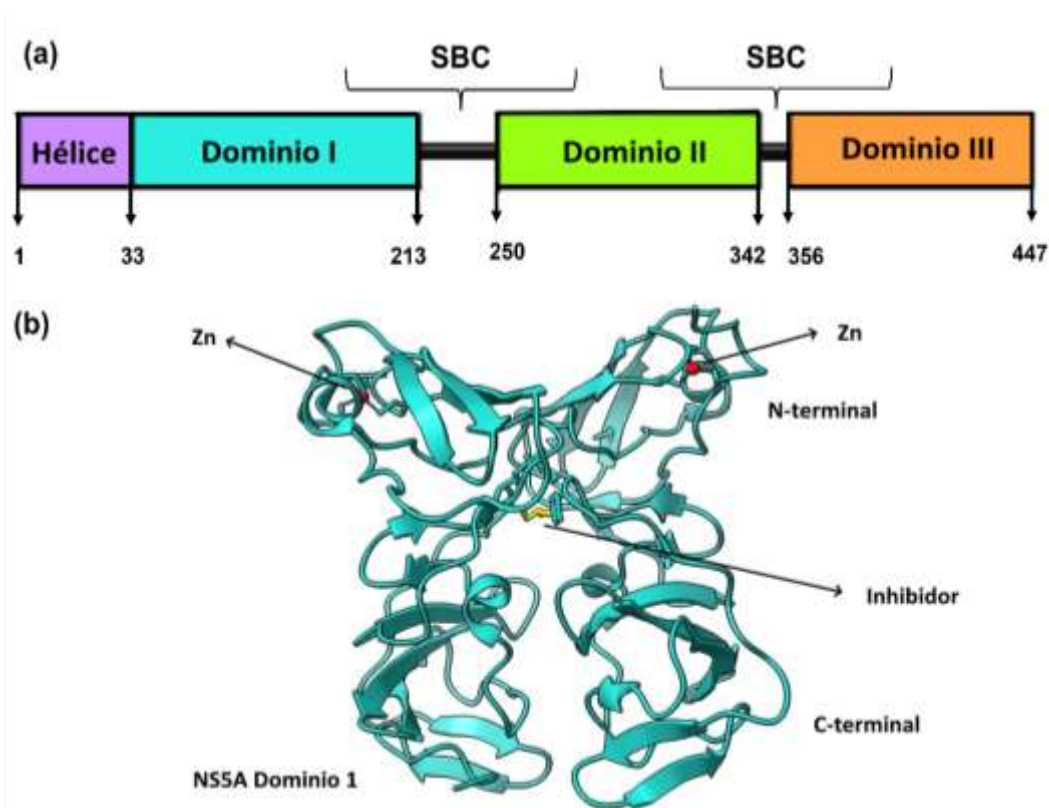


Figura 5. La organización esquemática de los dominios NS5A. (a) NS5A contiene una alfa-hélice anfipática N-terminal crítica para su orientación a la membrana celular y tres dominios (dominios I, II y III) separados por dos secuencias de baja complejidad (LCS). (b) Los inhibidores de la NS5A se unen al dominio dimerizado I, lo que bloquea potencialmente a la NS5A para que ejerza sus funciones. Las sustituciones de aminoácidos asociadas a resistencia (SAR) de los inhibidores de la NS5A a menudo se encuentran en M28, Q30, L31, e Y93 (Gao et al., 2016). Imagen modificada de Li et al., 2021.

Proteína NS5B VHC

La NS5B tiene un dominio catalítico que abarca a la mayor parte de la proteína (aa1 al aa530), seguido de una secuencia enlazadora (aa531 al aa570) y un dominio catalítico transmembrana C-terminal (aa571 al aa591) que es esencial para la replicación. La NS5B como todas las ARN polimerasa dependiente de ARN virales contiene subdominios de palma (aa360 al aa530), pulgar (aa189 al aa359) y dedos (aa1 al aa188). Además, posee un dominio β -plegada específico de las RdRps de la familia *Flaviviridae*, así como un dominio enlazador (Figura 6). Cada dominio contribuye en específicos pasos de la síntesis de ARN viral (Sesmero & Thorpe, 2015).

La replicación del ARN del VHC se ha detectado que tiene lugar en organelos de replicación (OR), es decir proteínas no estructurales (sitios de replicación del genoma viral) que se forman debido a diferentes tipos de alteraciones de la membrana citoplasmática inducidas por el VHC, entre estas se encuentran unas vesículas de doble membrana (VDM) que han sido asociadas a ARN viral de doble cadena (dsARN) y en donde se han encontrado a las proteínas no estructurales del VHC, es decir, los OR con alto contenido de colesterol y esfingolípidos (Li et al., 2021). Aun no se conoce si la replicación del ARN del VHC tiene lugar en la superficie interior o exterior de los OR, sin embargo, se sabe que un mecanismo de transporte debe estar presente en los OR para la entrada de metabolitos necesarios para la replicación. La ventaja de los OR es que el complejo de replicación NS3-NS5B y factores celulares se concentran dentro, mientras que están excluidos los ARN celulares, por consiguiente se tiene especificidad de la plantilla de ARN viral (Neufeldt et al., 2016).

La NS5B del VHC es una RdRp (la NS5B *in vitro* puede copiar el ARN del VHC sin ayuda de otros factores, pero *in vivo* requiere de actividades específicas de la acción en *cis* y *trans* de las proteínas no estructurales NS3-NS5B (Bartlett et al., 2018), así como de las estructuras bucle tallo de la región 5' UTR, y del extremo 3' altamente conservado de la región 3' UTR. "El inicio de la síntesis de ARN de cadena negativa" ("(PDF) Aspectos genéticos del virus del dengue Genetic ... - ResearchGate")

Comienza en el apareamiento uridina-guanosina terminal del extremo 3' (Adams et al., 2017).

El proceso de síntesis de ARN realizado por la NS5B se divide en 4 pasos: Unión, iniciación, amplificación y terminación del ARN (Tabata et al., 2020). La síntesis de ARN del VHC inicia en el extremo 3' y se requieren de altos niveles de GTP, el cual se une al dominio β -plegada de la NS5B, también son requeridas las interacciones proteína-proteína entre NS3, NS5A y la NS5B, en el paso de amplificación la NS5B requiere de un cambio conformacional hacia una conformación abierta para la salida del dsARN (López-Jiménez et al., 2014). Hasta ahora no se sabe cómo termina la NS5B la síntesis del ARN del VHC, si bien la NS5B es notablemente propensa a errores con una tasa de error de 10^{-4} en cada ronda de replicación, al parecer tiene un mecanismo de incisión de nucleótidos, lo que puede permitir una corrección de errores limitada (Jin et al., 2013).

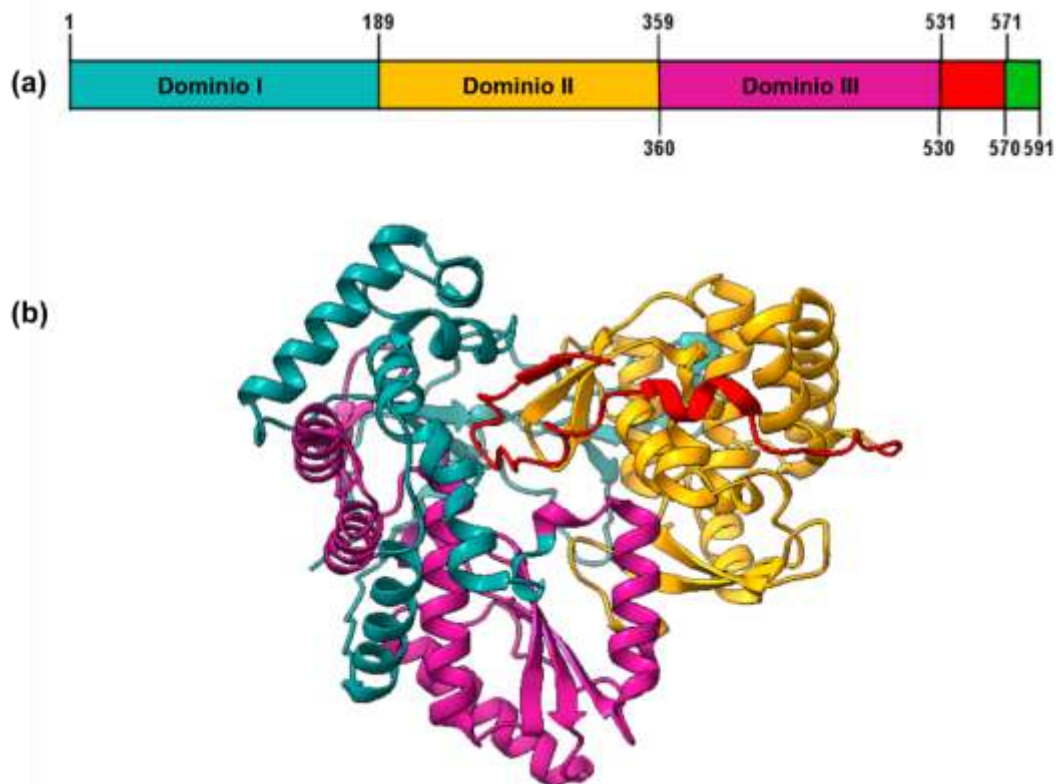


FIGURA 6. ESQUEMÁTICA ORGANIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA NS5B. (A) NS5B ABARCA UN DOMINIO CATALÍTICO TERMINAL, UNA SECUENCIA ENLAZADORA Y UN DOMINIO TRANSMEMBRANA C-TERMINAL (TMD). (B) EL DOMINIO CATALÍTICO DE LA NS5B TIENE UNA FORMA DE MANO DERECHA QUE CONTIENE LAS REGIONES DE PALMA, PULGAR Y DEDOS (IMAGEN MODIFICADA DE LI ET AL., 2021)

Antivirales de acción directa contra VHC genotipos GT1-GT6

Velpatasvir

Es un inhibidor del complejo de replicación de la proteína no estructural NS5A (fórmula química $C_{49}H_{54}N_8O_8$, Figura 7, Pubchem identifier: CID 67683363) (Velpatasvir, 2023), esencial para la replicación del VHC, para el ensamblaje de los viriones, recetado para el tratamiento de personas con la infección por VHC (genotipos 1 al 6) y para aquellos coinfectados con VIH, con o sin cirrosis descompensada. La terapia con este medicamento además puede ser combinada con Ribavirina cuando el paciente cuenta con cirrosis descompensada (Bourlière et al., 2017).

Aunque no está claro la forma de actuar de este medicamento, se cree que sea similar al de otros inhibidores de NS5A los cuales se unen al dominio 1 de NS5A (del aa33 al aa213), compitiendo con el ARN del VHC para unirse a este sitio durante la replicación (Mariantonietta et al., 2019; Velpatasvir, 2023).

El velpatasvir presenta una similitud en su mecanismo de acción (inhibición de NS5A) y de estructura con su recombinante daclatasvir (primer AAD contra NS5A, Figura 8, Pubchem identifier: CID 25154714) formando un amplio sistema resonante de alta densidad electrónica, el cual facilita la unión a la proteína NS5A, estabilizando su estructura y bloqueando sus funciones, así mismo su estructura en los extremos de la molécula emulan secuencias peptídicas (en realidad, carbamatos), que facilitan la inserción del fármaco en los huecos (bolsillos) de la proteína NS5A. Atendiendo a la gran similitud estructural entre el velpatasvir y el daclatasvir, es previsible que ambos tengan un comportamiento molecular similar, siendo su sitio de unión idéntico. Los anillos de bifenilo descansan en la parte superior de los dos grupos metilo del aminoácido T95 en los dos monómeros de la NS5A. Los anillos de los dos residuos Y93 extienden el canal hidrófobo para acomodar el resto del grupo bifenilo y uno de los anillos laterales del DCV. Los aminoácidos ubicados en las posiciones K26, I27 e I28 de las dos α -hélices y P97 de cada monómero completan las esquinas hidrófobas, permitiendo que el fármaco se ajuste fácilmente en la ranura hidrófoba formada en la esquina de los bolsillos de

la proteína NS5A (“Daclatasvir, 2023). Mientras que los restos R30 y Q54 forman cuatro enlaces de hidrógeno simétricos con el DCV (Barakat et al., 2015)

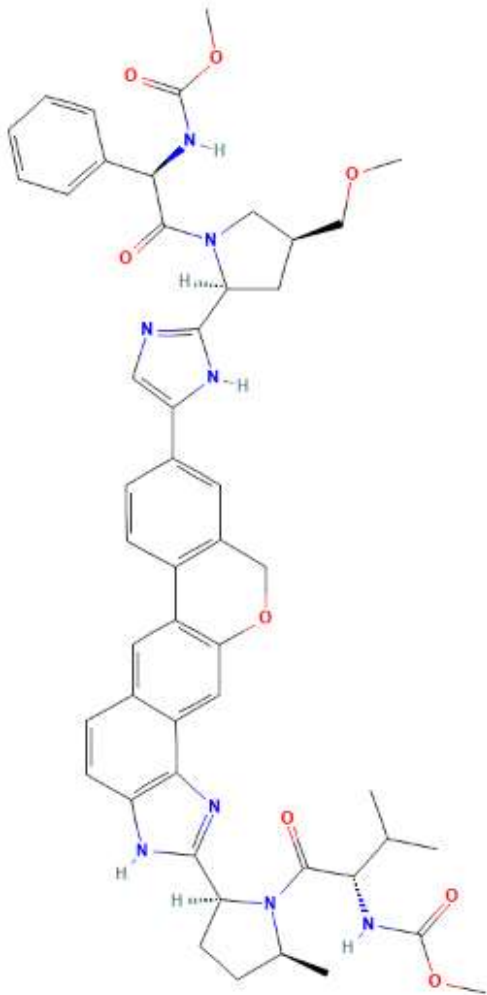


FIGURA 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE VELPATASVIR. INHIBIDOR DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL NS5A DEL VIRUS DE HEPATITIS C, ACTÚA SOBRE LA REPLICACIÓN DEL ARN VIRAL, CUENTA CON TRECE ACEPTADORES DE ENLACES DE HIDROGENO, CUATRO DONANTES DE ENLACES DE HIDROGENO, EN COLOR ROJO SE OBSERVAN LOS OXÍGENOS, MIENTRAS QUE EN COLOR AZUL SE REPRESENTAN LOS NITRÓGENOS.

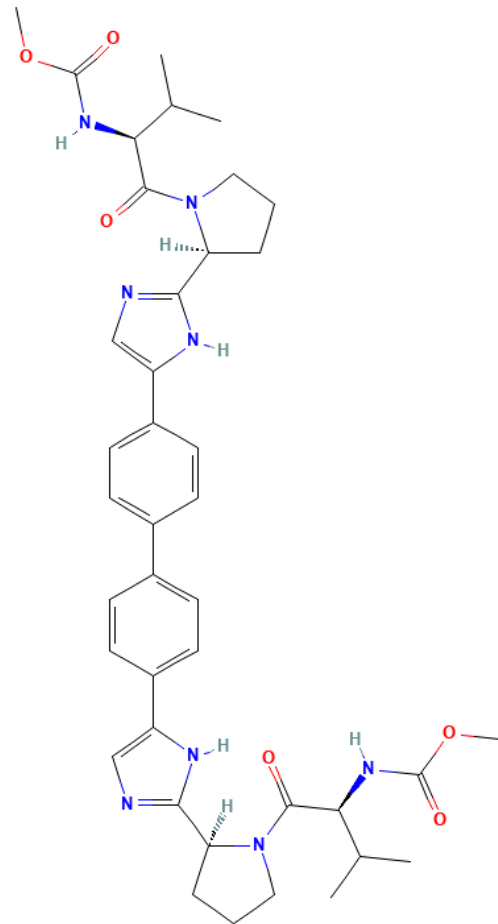


FIGURA 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DE DACLATASVIR. MEDICAMENTO ANÁLOGO DEL VELPATASVIR, ES UN INHIBIDOR DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL NS5A DEL VHC. EN COLOR ROJO SE OBSERVAN LOS OXÍGENOS, MIENTRAS QUE EN COLOR AZUL SE REPRESENTAN LOS NITRÓGENOS.

Sofosbuvir

Es un inhibidor nucleosídico de la polimerasa de ARN dependiente del ARN de la proteína NS5B imprescindible para la replicación del VHC, es un profármaco de un nucleótido de pirimidina monofosforilado, 2-desoxi-2-fluoro-2-C-metiluridina monofosfato (formula química $C_{22}H_{29}FN_3O_9P$, Figura 9, Pubchem identifier: CID 45375808), tras su administración oral el sofosbuvir es metabolizado en el interior de los hepatocitos para luego formar el análogo trifosfato farmacológicamente activo de uridina (GS-461203), compitiendo con los nucleótidos naturales e incorporándose en el ARN del VHC por acción de la NS5B polimerasa durante la replicación del genoma viral y actuando como un terminador de cadena (Bourlière et al., 2017; Sofosbuvir 2023).

Sofosbuvir previene la replicación viral del VHC uniéndose a los dos iones Mg^{2+} presentes en el motivo del sitio activo GDD (Glicina-Aspártico-Aspártico; distintivo de la proteína NS5B del VHC, presente en el sitio activo del subdominio de la palma y se encuentra rodeado por los dominios I y II) de la polimerasa NS5B del VHC y evitando la replicación del material genético del VHC, GS-461203 (metabolito activo del fármaco) inhibe la actividad de la polimerasa de la NS5B recombinante de los genotipos 1b, 2, 3 y 4. Aunque puede considerarse como un inhibidor de amplio espectro, no es un inhibidor de las polimerasas ADN y ARN humanas ni un inhibidor de la ARN polimerasa mitocondrial (Bourlière et al., 2017; Vademecum, 2020)

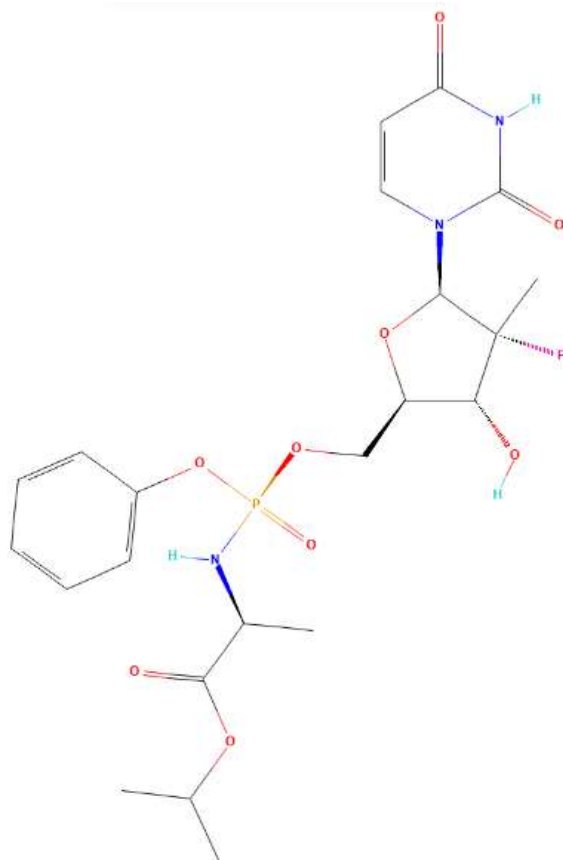


FIGURA 9. ESTRUCTURA QUÍMICA DE SOFOSBUVIR. TERMINADOR DE LA CADENA DE REPLICACIÓN DEL VHC Y ANÁLOGO NUCLEOTÍDICO, CUENTA CON NUEVE ACEPTADORES DE ENLACES DE HIDROGENO, TRES DONANTES DE ENLACES DE HIDROGENO, SE OBSERVAN DE COLOR ROJO LOS OXÍGENOS, DE COLOR AZUL MARINO LOS NITRÓGENOS Y DE COLOR AZUL CIELO LOS HIDRÓGENOS, MIENTRAS QUE EN COLOR NARANJA SE OBSERVA UN FOSFORO.

Sustituciones Asociadas a Resistencia (SAR)

A pesar de la alta tasa de éxito (más del 95%) en pacientes con VHC tratados, existe un porcentaje de menor eficiencia en el tratamiento (del 3% al 5%), existiendo diferentes factores que contribuyen a esto con los AAD, lo que puede generar sustituciones asociadas a resistencia (SAR), limitando las opciones de retratamiento (Howe et al., 2022). La alta tasa de homogeneidad genética del VHC causada por su falta de mecanismos de corrección por su ARN polimerasa en comparación con su alta actividad de replicación viral, produce una gran cantidad de recombinante virales, mejor conocidas como cuasiespecies, lo que podría generar recombinante con susceptibilidad reducida a los AAD (Perales et al., 2018).

En diferentes estudios, se han detectado diferentes mutaciones relacionada con la disminución de la susceptibilidad a antivirales (Tabla 2), es por ello por lo que se recomienda que los inhibidores de NS5A sean usados en combinación con otros regímenes para prevenir la aparición de recombinante resistentes a los diferentes fármacos. Cabe señalar que existen diferentes tipos de inhibidores, los inhibidores nucleosídicos (NI) y los inhibidores no nucleosídicos (NNI).

TABLA 2. SUSTITUCIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA (SAR) EN MEDICAMENTOS INDICADOS EN EL TRATAMIENTO CON AAD.

Genotipo VHC	Régimen AAD	SAR			Referencias
		NS3	NS5A	NS5B	
1a	SMV+SOF+RBV	Q80K			(Stefano et al., s/f)
	OBV+PTV+RTV+DSV	Q80K	Y93C Q30R	S556G	
	SMV+SOF+RBV	Q80K			
	OBV+PTV+DSV	Q80K	Q30L Y93H	S556G	
	EBR+GZR+RBV	Q80K	Q30H L31M		
	OBV+PTV+DSV		M28T	S556G	
	DCV		M28T Q30E/H/R L31M/V P32L Y93H/C/N H58D/R		(Nakamoto et al., 2014)
	SOF			L59F S282G/R/T/C C316H/R L320I/F/V V321A/F	(Howe et al., 2022)
DSV			L314H C316Y A395G M414I/T/V E446K/Q/T Y448C/H A553T/V G554S Y555H S556G/R/N G557R G558R D559G/N Y561H/N S565F	(Howe et al., 2022) (Lontok et al., 2015)	
Beclabuvir			A421V P495L/S		
1b	SOF+LDV		L31V Y93H L31M L31I		(Stefano et al., s/f)

	OBV+PTV+DSV	V36L S122N V170I	L31V L31I Y93H	C451N S556G		
	EBR+GZR		L31M P58S Y93H			
	DCV		L31F/V P32L Y93H/N L23F R30Q P58S L28M/T			(Nakamoto et al., 2014) (Lontok et al., 2015)
	SOF			L159F S282G/R/T/C C316F/H/N V321I		(Howe et al., 2022)
	DSV			C316H/N/Y/W S368T N411S M414I/T/V C445F/Y Y448C/H A553V G554S S556G/R G558R D559G/N		(Howe et al., 2022) (Lontok et al., 2015)
2	DCV		F28S L31M C92R Y93H		(Nakamoto et al., 2014)	
	SOF			L159F S282G/R/T	(Howe et al., 2022) (Lontok et al., 2015)	
3	OBV+PTV+DSV		L31M Y93H		(Stefano et al., s/f)	
	DCV		Y93H		(Nakamoto et al., 2014)	
	DCV+SOF		Y93H S14M A17S A21T A62S S98G S103P D126E F127C D172E	E258Q N307G A338V	(Stefano et al., s/f)	
	SOF+VEL		Y93H			
SOF			A150V/E/T/R/I/S/L/G L159F/P K206E/R/Q/N/T/G/H S282G/R/T/C V321A/G/V	(Howe et al., 2022) (Lontok et al., 2015)		

SAR (sustituciones asociadas a resistencia), SMV: Simeprevir, SOF: Sofosbuvir, RBV: Ribavirina, OBV: Ombitasvir, PTV: Paritaprevir, RTV: Ritonavir, DSV: Dasabuvir, EBR: Elbasvir, GZR: Grazoprevir, LDV: Ledipasvir, VEL: Velpatasvir, DCV: Daclatasvir, GLE: Glecaprevir, PIB: Pibrentasvir

Terminación Previr, inhibidores de proteasas, (rojo)

Terminación Buvir, NS5B (azul)

Terminación tasvir, NS5A (negro)

HIPÓTESIS

El análisis de las secuencias nucleotídicas de las proteínas virales NS5A y NS5B del VHC obtenidas de pacientes no respondedores al tratamiento con los AAD velpatasvir y sofosbuvir permitirá identificar sustituciones asociadas a resistencia que generen modificaciones respecto a las proteínas consenso NS5A y NS5B.

JUSTIFICACIÓN

Las proteínas virales NS5A y NS5B cumplen varias funciones en el ciclo replicativo del VHC, lo cual las ha convertido desde hace varios años en un blanco terapéutico importante. Desde el año 2017, el IMSS introdujo los antivirales de acción directa (AAD) para GT1, en 2019 los AAD pangenotípicos cuyas formulaciones contienen inhibidores de estas proteínas para los genotipos GT1, GT2 y GT3. Las sustituciones asociadas a resistencia (SAR) de los inhibidores de las proteínas virales NS5A y NS5B han sido detectadas en los genomas de los virus que infectan a pacientes sin tratamiento previo, por lo que las SAR pueden existir en forma natural, la presencia de SAR preexistentes puede atenuar la efectividad de los AAD de la NS5A y NS5B. Las SAR también pueden inducirse y sumarse a las ya existentes de manera natural. Lo anterior ha sido reportado por estudios con pacientes pre o post tratamiento con AAD en otras regiones. En México no existen estudios sobre SAR post tratamiento con AAD pan genómicos, por lo que se desconoce si circulan este tipo de cepas de VHC entre los derechohabientes del IMSS.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar las secuencias nucleotídicas las proteínas NS5A Y NS5B del VHC obtenidas de pacientes no respondedores al tratamiento con ADD pangenotípicos sofosbuvir/velpatasvir con la finalidad de identificar la presencia de SAR que pudieran estar implicadas en la respuesta fallida al tratamiento farmacológico.

Objetivos específicos

1. Identificar a pacientes no respondedores al tratamiento contra VHC con antivirales de acción directa como eplusa (sofosbuvir/velpatasvir).
2. Determinar las SAR en el marco de lectura abierto de las proteínas NS5A y NS5B del VHC.
3. Generar de manera in silico la estructura de las proteínas NS5A y NS5B del VHC genotipo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de estudio

Observacional, descriptivo, transversal, analítico, homodémico.

Tamaño de muestra

A conveniencia, pacientes no respondedores al tratamiento sofosbuvir/velpatasvir que iniciaron y terminaron tratamiento durante 2021 y 2022. Se esperan 1 o 2 muestras de pacientes con VHC.

Muestras

Las muestras de suero o plasma fueron obtenidas en el servicio de gastroenterología del Hospital de Especialidades, Unidades Médicas de Alta Especialidad (UMAE), IMSS, Pue. Puebla; de pacientes no respondedor al tratamiento con AAD sofosbuvir/velpatasvir que iniciaron y terminaron tratamiento durante 2021.

Población de estudio

Pacientes infectados con VHC no respondedores al tratamiento con el fármaco Epclusa (sofosbuvir, velpatasvir).

Criterios de inclusión

- Hombre o Mujer
- Mayor de 18 años
- No respondedores al tratamiento con AAD (sofosbuvir, velpatasvir)
- Con o sin cirrosis
- Coinfectados con virus de inmunodeficiencia humana (VIH), pero con carga viral negativa por tratamiento con anti retrovirales

Criterios de exclusión

- Paciente coinfectado con VHB con carga viral detectada

Criterios de eliminación

- Carga viral menor 10,000 UI/MI
- Muestra de suero hemolizada

METODOLOGÍA

Protocolo

El estudio se realizó en el laboratorio de virología medica del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), IMSS.

Muestreo

Las muestras fueron proporcionadas por el área de gastroenterología perteneciente al hospital de especialidades IMSS San José.

Población de estudio

Pacientes infectados con VHC no respondedores al tratamiento con el antiviral de acción directa Epclusa (sofosbuvir, velpatasvir).

Criterios de selección de muestras

Se seleccionaron a aquellos pacientes que fueran no respondedores al tratamiento, además de poseer las siguientes características:

- Hombre o Mujer
- Mayor de 18 años
- No respondedores al tratamiento (sofosbuvir, velpatasvir)

Extracción de ARN viral de muestras de pacientes con VHC

Para la extracción del ARN de las muestras de suero o plasma de los pacientes con VHC, se utilizó el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, No. de catálogo 52904). La extracción del ARN viral se realizó conforme al protocolo del fabricante. La integridad del ARN se verificó mediante la concentración y pureza por espectrofotómetro.

Determinación de la concentración de ARN y ADN

La medición de la concentración se realizó en un espectrofotómetro (Implen NanoPhot 16), para determinar las concentraciones del ARN extraído y de ADN obtenido por PCR en ng/ μ L, y verificar las relaciones de absorbancia a 260/280 y 260/230 nanómetros.

Obtención de ADN a partir de ARN viral por retrotranscripción (RT)

La síntesis de la primera hebra de cADN a partir de molde de ARN monocatenario mediado por una transcriptasa reversa (RT). El ARN utilizado para la obtención de ADN fue obtenido previamente a partir de muestras de plasma de los pacientes con VHC. La muestra procesada fue identificada como la muestra P-1, protegiendo así la identidad del paciente.

La obtención del cADN fue obtenida por medio del kit comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, No. de catálogo EP0752) siguiendo las especificaciones del fabricante, los reactivos (proporcionados por el kit) fueron

colocados en un tubo estéril libre de nucleasas y agregando en el orden que se muestra a continuación (Tabla 3).

TABLA 3. MEZCLA DE REACCIÓN UTILIZADA EN LA RETROTRANSCRIPCIÓN.

Componentes	Volumen
ARN molde	8 μ L
Oligonucleótidos hexaméricos	1 μ L
Agua (libre de nucleasas)	3 μ L
Buffer 5X	4 μ L
Inhibidor de RNasa RiboLock (20U/ μ L)	1 μ L
Mezcla de dNTP's 10 nM	2 μ L
Rever Aid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptasa (200 U/ μ L)	1 μ L
Volumen total de reacción	20 μ L

Genotipificación del VHC por RFLP (en caso de no tener reportado el genotipo viral por otras técnicas)

Con un fragmento de 251pb de la región 5' UTR se puede determinar el genotipo viral mediante la acción de las enzimas de restricción *MvaI*, *HinFI* y *ScrFI*, empleando en cada caso un amortiguador, adecuado (Tabla 4); los productos de la restricción fueron verificados mediante gel de agarosa.

TABLA 4. REACCIÓN DE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA PARA GENOTIPIFICACIÓN VIRAL.

Componentes	Volumen
Agua (libre de nucleasas)	9.5 μ L
Amortiguador Tango 10X	2.0 μ L
<i>MvaI</i> 10 u/ μ L	0.50 μ L
<i>HinFI</i> 10 u/ μ L	0.50 μ L
cADN 251 pb	7.5 μ L
Volumen total	20.0 μ L

Obtención de fragmentos de los genes que codifican a las proteínas NS5A y NS5B por RT-PCR punto final

A partir del ADNc obtenido de la reacción RT, se obtuvieron productos de PCR de entre 300pb a 600pb por PCR punto final, o por PCR anidado, el tamaño depende de los oligonucleótidos iniciadores diseñados para obtener las regiones donde codifican las proteínas virales NS5A y NS5B.

Primera ronda de una reacción de PCR y una reacción de PCR anidado

Se realizaron reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de 15 a 40µl dependiendo de la disponibilidad de ADNc al momento de realizar el proceso. Se realizó una mezcla de la reacción en un tubo de PCR y siguiendo las instrucciones del instructivo PCR Master Mix (Promega). Los tubos con las reacciones se colocaron en el termociclador bajo los siguientes parámetros: 40 ciclos a 94°C por 2 min, 94°C por 40 s, la temperatura de alineamiento cambio de acuerdo con la T_m de los oligonucleótidos iniciadores utilizados, posteriormente a 72°C por 1 min, 72°C por 10 min y 4°C constante. Se almacenaron a -80°C. La reacción de PCR anidado es similar a la de la primera ronda de PCR, solo hace la diferencia que el ADNc empleado es el producto de la primera ronda de PCR.

Purificación de productos PCR

La purificación de los productos de PCR para su envío a secuenciación se realizó siguiendo las instrucciones del Kit DNA Clean & concentrator (Zymo Research)

Secuenciación

El proceso de secuenciación se realizó por el método Sanger automatizado, las muestras se enviaron al Laboratorio LANGEBIO ubicado en el CINVESTAV-Irapuato. Los resultados de la secuenciación fueron analizados mediante el programa BioEdit 7.2.5.0.

Diseño de oligonucleótidos iniciadores (paciente no respondedor con resultado de estar infectado con genotipo 2)

Obtención de secuencias del VHC

Se identificó una secuencia consenso con ayuda de las secuencias del VCH genotipo 2 de las proteínas no estructurales NS5A y NS5B del VHC. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos GenBank. La secuencia consenso fue realizada con ayuda del programa BioEdit, por medio de el alineamiento múltiple de 49 secuencias (siete secuencias GT2, 25 secuencias GT2a y 19 secuencias 2b), siguiendo con los parámetros siguientes:

- Alinear las posiciones homologas
- Identificar sustituciones en un residuo por otro
- Identificar la falta de una base (gap)
- Un gap puede corresponder tanto a una deleción como a una inserción

Otras puntuaciones de los alineamientos

La mejor puntuación del alineamiento es aquella en la que alinea mas posiciones homologas como numero de letras que coinciden, porcentaje de identidad, numero de coincidencias en cada cien posiciones, porcentaje de similitud, tiene en cuenta la similitud fisicoquímica de los diferentes nucleótidos.

El diseño de los oligonucleótidos iniciadores se hizo con el programa IDT Oligo Analyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), una herramienta que busca comprender el comportamiento esperado de los oligonucleótidos, así como identificar y manipular las características que deben presentar, como se muestra a continuación (Thornton & Basu, 2011; Ye et al., 2012)

- Contar con un tamaño mayor a 18 nucleótidos.
- Tener una relación de guaninas (G) y citosinas (C) de entre 50 a 60%.
- Evitar la auto complementariedad
- No formar estructuras secundarias (horquillas).
- Tener una temperatura de fusión (Tm) de 55 a 65°C.

- No variar más de 5°C de diferencia entre los oligos.

Como parte del proceso de verificación de los oligonucleótidos diseñados, se utilizó el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la finalidad de comprobar que los oligonucleótidos iniciadores hibrida dentro del genoma del VHC.

RESULTADOS

Muestra de plasma obtenida de paciente masculino de 41 años con diagnóstico de hepatitis C crónica, recibió tratamiento con los AAD sofosbuvir/velpatasvir por 12 semanas, después de ese tiempo al final de tratamiento tuvo una carga viral de 4,402,834 UI/ml, paciente con reporte de genotipo 2 por técnica de INNO-LiPA HCV II, y fue clasificado como no respondedor al tratamiento con AAD.

Genotipificación por RFPL

Como parte del proceso de genotipificación de la muestra en estudio, se realizó una reacción de PCR punto final estandarizada previamente con los oligonucleótidos 940 y 211 para la obtención de la región UTR, para la muestra de interés denominada como P-1 y dos controles, una muestra genotipo 1b y otra del genotipo 2 (P-2 y P-3, respectivamente) (Figura 10, en donde se observa en el primer pozo el marcador de peso molecular de 100pb, en el pozo dos se encuentra el P-1, seguido de la muestra control P-2 y P-3 en los pozo tres y cuatro respectivamente y por ultimo un control negativo (CN) en el pozo cinco), obteniéndose un producto de 251pb para las tres muestras.

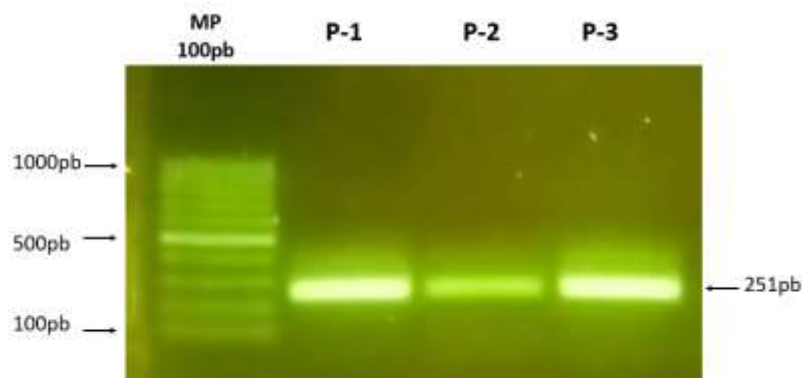


FIGURA 10. REGIÓN UTR (FRAGMENTO DE 251PB).

El genotipo fue confirmado mediante la técnica de RFPL (fragmentos de restricción de longitud polimórfica, por sus siglas en inglés), que emplea las enzimas de restricción *MvaI* (Fermentas) / *HinFI* (Promega), para discriminar entre los genotipos 1 y 2 (Patrón para GT1 53+63+42+93; patrón GT2 53+198)

Mostrándose el patrón GT2 para los pacientes P-1 y P-3 en los pozos tres y cinco respectivamente, en donde se observan dos fragmentos, uno de 198 pb y uno de 53pb, por el contrario, el paciente P-2 mostro un patrón GT1, visualizándose una única banda de 93pb en el cuarto pozo (Figura 11)

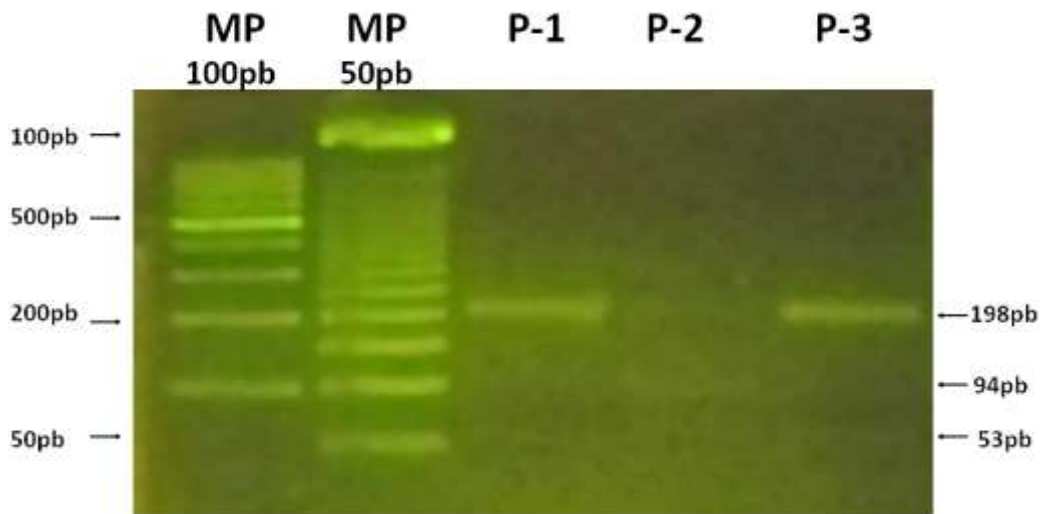


FIGURA 11. PRODUCTOS DE RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA *MVAI* EN UN FRAGMENTO DE 251PB. DE IZQUIERDA A DERECHA EN LA COLUMNA 1 SE MUESTRA EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 100 PB, EN LA COLUMNA 2 SE MUESTRA UN MARCADOR DE 50 PB Y EN LAS COLUMNAS 3 Y 5 SE VISUALIZA UN PRODUCTO DE 198PB CORRESPONDIENTE AL GENOTIPO 2 DEL VHC

Secuencias de nucleótidos de las regiones NS5A y NS5B del VHC genotipo 2

Se obtuvieron del GenBank secuencias del genotipo 2, 2a y 2b del VHC, a continuación, se muestran los ID (número de identificación de las secuencias). Se realizó un alineamiento múltiple, el cual fue generado con ayuda del programa BioEdit con el propósito de obtener secuencias consenso de los genotipos 2, 2a y 2b para la elaboración los oligonucleótidos. Se alinearon un total de 49 secuencias (Tabla 5).

TABLA 5. NÚMEROS DE ACCESO DEL GENBANK DE LOS SUBTIPOS 2, 2A Y 2B DEL VHC.

Subtipo	Número de identificación en Gene Bank para los diferentes subtipos del genotipo 2							
2	D00944.1	KY620314	KY620323	KY620323	KY620326	KY620327	KY620328	
2a	HQ639939	AY746460	AF238486	HQ639938	HQ639944	HQ639945	AB047639	AB047640
	AF169003	AF169004	AF169005	AF169002	AF238482	AF238483	AF238484	KM587616
	AB047643	AB047644	AB047645	KY620316	AB047641	AB690461	AB047642	
2b	AY232738	AY232739	AF238486	AY232730	AY232731	AY232734	AY232735	AY232736
	AY232742	AY232743	AY232744	AY232745	AY232746	AY232747	AY232748	AY232749
	AY232737	AY232740	AY232741					

Oligonucleótidos Iniciadores

Se diseñaron 26 diferentes oligonucleótidos para cada una de las proteínas de interés (NS5A y NS5B), doce de ellos (Tabla 6) específicos para la proteína NS5A y catorce específicos para la proteína NS5B (Tabla 7). Los oligonucleótidos diseñados de forma *in silico* fueron sintetizados por el laboratorio IDT (Integrated DNA Technologies) y Sigma-Aldrich.

TABLA 6. OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR LA REGIÓN NS5A DEL GENOTIPO 2 DEL VHC.

Oligonucleótidos diseñados para la proteína NS5B del VHC					
Nombre de secuencia	5' a 3'	Posición en el genoma	Numero de bases	Tm (°C)	% de GC
G2NS5B1s	TTG GTC TAC TTG CTG CGA GGA	7644-7624	21	51.4	52.9
G2NS5B1a	TCC TCG GAG CAA GTA GAC CAA	7624-7644	21	51.4	52.9
G2NS5B2s	ACA TCA AAG AGC GCC TCA	7787-7804	18	62.3	50.0
G2NS5B2a	TGA GGC GCT CTT TGA TGT	7804-7787	18	62.3	50.0
G2NS5B3s	AGC TCG CCT TAT CGT TTA CCC TGA	8134-8157	24	69.3	50.0
G2NS5B3a	TCA GGG TAA ACG ATA AGG CGA GCT	8157-8134	24	69.3	50.0
G2NS5B4s	TCT GCG AGA AAA TGG CCC TT	8172-8181	20	67.9	50.0
G2NS5B4a	AAG GGC CAT TTT CTC GCA GA	8181-8172	20	67.9	50.0
G2NS5B5s	TGC GCC CAC AAT GCT GGT	8593-8669	18	71.5	61.1
G2NS5B5a	ACC AGC ATT GTG GGC GCA	8669-8593	18	71.5	61.1
G2NS5B6s	ATG GGC TCG CAT GGT CCT	8923-8940	18	68.1	61.1
G2NS5B6a	AGG ACC ATG CGA GCC CAT	8940-8923	18	68.1	61.1
G2NS5B7a	ACG CGA CAC GCT GTG ATA A	9364-9346	19	65.6	52.6
G2NS5B8a	AGT AGG AGT AGG CCA AGG AGT A	9402-9381	22	50.0	50.0

TABLA 7. OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR LA REGIÓN NS5B PARA EL GENOTIPO 2 DEL VHC.

Oligonucleótidos diseñadora para la proteína NS5A del VHC					
Nombre de secuencia	5' a 3'	Posición en el genoma	# de bases	T _m (°C)	% de GC
G2NS5A1s	AGC GTG TGA CCC AAC TAC T	6177-6195	19	56.1	52.6
G2NS5A2s	TGC CTG GTC TCC CCT TTA TCT	6359-6380	21	57.7	52.4
G2NS5A3s	TGG TAT CAT GAC CAC ACG GT	6417-6437	20	56.0	50.0
G2NS5A3a	ACC GTG TGG TCA TGA TAC CA	6417-6437	20	56.0	50.0
G2NS5A4s	TCG GGA TGA GGT CTC GTT CT	6775-6794	20	57.5	55.0
G2NS5A4a	AGA ACG AGA CCT CAT CCC GA	6794-6775	20	57.5	55.0
G2NS5A5s	AAT CGT GGA AGA GGC CAG AT	7236-7255	20	56.1	50.0
G2NS5A5a	ATC TGG CCT CCT CCA CTA TT	7255-7236	20	55.2	50.0
G2NS5A6s	AGC TGG CCA TCA AGT CCT	7395-7377	18	56.5	55.6
G2NS5A6a	AGG ACT TGA TGG CCA GCT	7377-7395	18	56.5	55.6
G2NS5A7s	TTC TTT TCC TGG GTG GAG GG	6713-6732	20	57.3	55.0
G2NS5A7a	CCG TCC ACC CAG GAA AAG AA	6732-6713	20	57.3	55.0

La Figura 12 muestra la secuencia de referencia obtenida de GenBank (D00944.1), en la que se observa la posición de la hibridación *in silico* de los oligonucleótidos diseñados para la proteína NS5A. La secuencia nucleotídica se resalta en color rojo; asimismo, es posible visualizar la hibridación *in silico* de los oligonucleótidos diseñados para la obtención de la proteína NS5B en color azul (Figura 13).

```

6001 GCCTGGAATT CTGTCTCCGG GTGCCCTGGT GGTGGGAGTC ATCTGCGCGG CCATCCTGCG
6061 CCGACACGTG GGACCGGGGG AAGGCGCTGT CCAATGGATG AATAGGCTCA TTGCCTTTGC
6121 TTCCAGAGGA AACCACGTCG CCCCCACCCA CTACGTGACG GAGTCGGATG CGTCGCAGCG → NS5A1s
6181 TGTGACCCAA CTACTTGGCT CCCTTACCAT AACCAGCCTG CTCAGGAGAC TCCACAACTG
6241 GATTACTGAA GACTGCCCCA TCCCATCCAG CGGCTCGTGG CTCCGCGATG TGTGGGATTG
6301 GGTTTGCACC ATCCTAACAG ACTTTAAAAA CTGGCTGACC TCCAAATTGT TCCCAAAGAT → NS5A2s
6361 GCCTGGTCTC CCCTTATCT CTTGTCAAAA GGGGTACAAG GCGGTGTGGG CTGGCACTGG ← NS5A3s, NS5A3a
6421 TATCATGACC ACACGGTGT CTTGCGGGCG CAATATCTCT GGCAATGTCC GCCTGGGCTC
6481 CATGAGAATT ACGGGGCCCA AAACCTGCAT GAATATCTGG CAGGGGACCT TTCCCATCAA
6541 TTGTTACACG GAGGGCCAGT GCGTGCCGAA ACCCGCACCA AACTTTAAGA TCGCCATCTG
6601 GAGGGTGGCG GCCTCAGAGT ACGCGGAGGT GACGCAGCAC GGGTCATACC ACTACATAAC
6661 AGGACTTACC ACTGATAACT TGAAGTTC TTGCCAATA CCTTCTCCAG AGTTCTTTTC ← NS5A7s, NS5A7a
6721 CTGGGTGGAC GGAGTGCAGA TCCATAGGTT TGCCCCATA CCGAAGCCGT TTTTTCGGGA ← NS5A4s, NS5A4a
6781 TGAGGTCTCG TTCTGCGTTG GGCTTAATTC ATTTGTCTGC GGGTCTCAGC TCCCTTGCGA
6841 TCCTGAACCT GACACAGACG TATTGACGTC CATGCTAACA GACCCATCCC ATATCACGGC
6901 GGAGACTGCA GCGCGGCGTT TGGCACGGGG GTCACCCCG TCCGAGGCAA GTCCTCAGC
6961 GAGCCAGCTA TCGGCACCAT CGCTGCGAGC CACCTGCACC ACCCAGGCA AGGCCATGA
7021 TGTGGACATG GTGGATGCCA ACCTGTTTCA TGGGGGCGAT GTGACCCGGA TAGAGTCTGA
7081 GTCCAAAGTG GTCGTTCTGG ACTCTCTCGA CCCAATGGTC GAAGAAAGGA GCGACCTTGA
7141 GCCTTCGATA CCATCGGAAT ATATGCTCCC CAAGAAGAGA TCCCACCAG CCTTACCGGC
7201 TTGGGCACGG CCGTATTACA ACCCACCCT TGTGGAATCG TGGAAAGAGGC CAGATTACCA ← NS5A5s, NS5Aa
7261 ACCGGCCACT GTTGCGGGCT GCGCTCTCCC CCCCCTAAG AAAACCCCGA CGCCTCCCC
7321 AAGGAGACGC CGGACAGTGG GTCTGAGTGA GAGCTCCATA GCAGATGCC TACAACAGCT ← NS5A6s, NS5A6a
7381 GGCCATCAAG TCCTTTGGCC AGCCCCCCC AAGCGGCAT TCAGGCCTTT CCACGGGGC
7441 GGACGCAGCC GATTCCGGCA GTCGGACGCC CCCCGATGAG TTGGCCCTTT CGGAGACAGG
7501 TTCCATCTCC TCCATGCCCC CTCTCGAGGG GGAGCCTGGA GATCCAGACT TGGAGCCTGA
7561 GCAGGTAGAG CTTCAACCTC CCCCCAGGG GGGGGTGGTA ACCCCGGCT CAGGCTCGGG
7621 GTCTTGGTCT ACTTGCTCCG AGGAGGACGA CTCCGTCGTG TGCTGCTCCA TGTCATACTC ← NS5B1s, NS5B1a
7681 CTGGACCGGG GCTCTAATAA CTCCTTGTAG CCCCGAAAG GAAAAGTTGC CAATTAACCC

```

FIGURA 12. OLIGONUCLEÓTIDOS QUE FUERON DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR LA REGIÓN NS5A. SE MUESTRA LA UBICACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES EN LA SECUENCIA DE LA REGIÓN NS5A (SECUENCIA EN COLOR ROJO) DEL VHC, CADA OLIGONUCLEÓTIDO SE MUESTRA DE UN COLOR DISTINTO, ASÍ COMO EL NOMBRE ASIGNADO A CADA OLIGONUCLEÓTIDO.

```

7561 GCAGGTAGAG CTTCACCTC CCCCCAGGG GGGGGTGGTA ACCCCCGGCT CAGGCTCGGG
7621 GTCTTGGTCT ACTTGTCTCCG AGGAGGACGA CTCCTGCTGTG TGCTGCTCCA TGTCATACTC ← NS5B1s, NS5B1a
7681 CTGGACCGGG GCTCTAATAA CTCCTTGTAG CCCCAGAGAG GAAAAGTTGC CAATTAACCC
7741 CTTGAGCAAC TCCTGTTGC GATATCACAA CAAGGTGTAC TGTACCACAT CAAAGAGCGC ← NS5B2s, NS5B2a
7801 CTCATTAAGG GCTAAAAAGG TAACTTTTGA TAGGATGCAA GCGCTCGACG CTCATTATGA
7861 CTCAGTCTTG AAGGACATTA AGTACGCGC CTCCAAGGTC ACCGCAAGGC TTCTCACTTT
7921 AGAGGAGGCC TGCCAGTTAA CTCCACCCCA CTCTGCAAGA TCCAAGTATG GGTTTGGGGC
7981 TAAGGAGGTC CGCAGCTTGT CCGGGAGAGC CGTTAACAC ATCAAGTCCG TGTGGAAGGA
8041 CCTCCTGGAA GACACACAAA CACCAATTCC TACAACCATC ATGGCCAAAA ATGAGGTGTT
8101 CTGCGTGGAC CCCACCAAGG GGGGTAAGAA AGCAGCTCGC CTTATCGTTT ACCCTGACCT ← NS5B3s, NS5B3a
8161 CGGCCTCAGG GTCTGCGAGA AAATGGCCCT TTATGATATC ACACAAAAGC TTCCTCAGGC ← NS5B4s, NS5B4a
8221 GGTGATGGG GCTTCTTATG GATTCCAGTA CTCCTCCGCT CAGCGGGTGG AGTTTCTCTT
8281 GAAGGCATGG GCGGAAAAGA AAGACCCTAT GGGTTTTTCG TATGATACCC GATGCTTTGA
8341 CTCAACCGTC ACTGAGAGAG ACATCAGGAC TGAGGAGTCC ATATATCGGG CTTGTTCCCT
8401 GCCCGAGGAG GCCCACACTG CCATACACTC ACTGACTGAG AGACTTTACG TGGGAGGGCC
8461 CATGTTCAAC AGCAAGGGCC AGACCTGCGG GTACAGGCGT TGCCGCGCCA GCGGGGTGCT
8521 TACCACTAGC ATGGGGAACA CCATCACATG CTATGTGAAA GCCTTAGCGG CCTGTAAGGC
8581 TGCAGGGATA ATGCGGCCA CAATGCTGGT ATGCGGCGAT GACTTGGTTG TCATCTCAGA ← NS5B5s, NS5B5a
8641 GAGCCAGGGG ACCGAGGAGG ACGAGCGGAA CTGTAGAGCC TTCACGGAGG CTATGACAG
8701 GTATTCTGCC CCTCCTGGTG ACCCCCCCAG ACCGGAATAT GACCTGGAGC TGATAACATC
8761 TTGCTCCTCA AATGTGTCTG TGGCGTTGGG CCCACAAGGC CGCCGAGAT ACTACCTGAC
8821 CAGAGACCCT ACCACTCCAA TCGCCCCGGC TGCCCTGGGA ACAGTTAGAC ACTCCCCTGT
8881 CAATTCATGG CTAGGAAACA TCATCCAGTA CGCCCCAACC ATATGGGCTC GCATGGTCTT ← NS5B6s, NS5B6a
8941 GATGACACAC TTCTTCTCCA TTCTCATGGC CCAAGATACT CTGGACCAGA ACCTCAACTT
9001 TGAGATGTAC GGAGCGGTGT ACTCCGTGAG TCCCTTGGAC CTCCAGCCA TAATTGAAAG
9061 GTTACACGGG CTTGACGCTT TCTCTCTGCA CACATACTACT CCCACGAAC TGACACGGGT
9121 GGCTTCAGCC CTCAGAAAAC TTGGGGCGCC ACCCCTCAGA GCGTGGAAGA GCCGGGCACG
9181 TGCACTCAGG GCGTCCCTCA TCTCCCGTGG GGGGAGAGCG GCCGTTTGGC GCCGATATCT
9241 CTTCAACTGG GCGGTGAAGA CCAAGCTCAA ACTCACTCCA TTGCCGGAAG CGCGCCTCCT
9301 GGATTTATCC AGCTGGTTCA CTGTCCGGCG CGCGGGGGGC GACATTTATC ACAGCGTGTG ← NS5B7s
9361 SCGT GCCCGA CCCCGCTTAT TACTCCTTGG CCTACTCCTA CTTTTTGTAG GGGTAGGCT ← NS5B8s
9421 TTTCTACTC CCCGCTCGGT AGAGCGGCAC ACATTAGCTA CACTCCATAG CTAAGTGTCC
9481 CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
9541 TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

```

FIGURA 13. OLIGONUCLEÓTIDOS QUE FUERON DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR LA REGIÓN NS5B. SE MUESTRA LA UBICACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES EN LA SECUENCIA DE LA REGIÓN NS5B (SECUENCIA EN COLOR AZUL) DEL VHC, CADA OLIGONUCLEÓTIDO SE MUESTRA DE UN COLOR DISTINTO, ASÍ COMO EL NOMBRE ASIGNADO A CADA OLIGONUCLEÓTIDO.

Obtención de fragmentos de PCR

Para la obtención de las proteínas NS5A y NS5B se probaron cada uno de los oligonucleótidos iniciadores diseñados a diferentes temperaturas de hibridación, sin embargo, no todos funcionaron para el paciente P-1 y P-3, por lo que solo fue posible la obtención de un fragmento de 150pb de la proteína NS5A con los oligonucleótidos G2NS5A1s y G2NS5A3a. En el primer pozo se muestra un marcador de peso molecular de 100pb, seguido de las muestras P-1 y P-3 en los pozos dos y tres respectivamente (Figura 14).

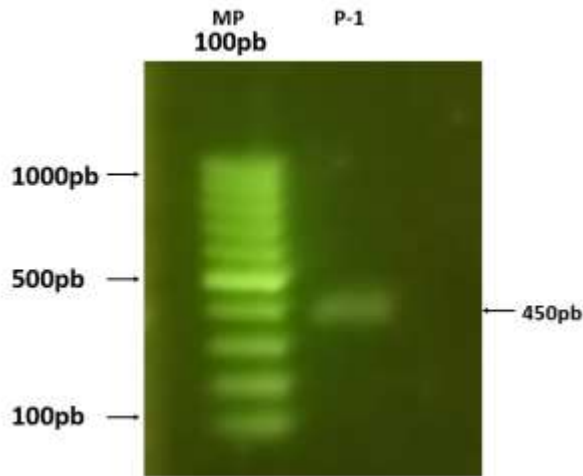


FIGURA 14. FRAGMENTOS OBTENIDOS CON LOS OLIGOS PARA LA PROTEÍNA NS5A

Para la proteína NS5B se obtuvo un fragmento de 439pb con los oligonucleótidos iniciadores G2NS5B3s y G2NS5B8a y los G2NS5B4s y G2NS5B5a (Figura 15), siendo estos últimos, utilizados como anidado del primer producto de PCR, obteniéndose únicamente un fragmento para el P1 en el segundo pozo del gel de agarosa, mientras que, en el primero pozo, se encuentra un marcador de peso molecular de 100pb.

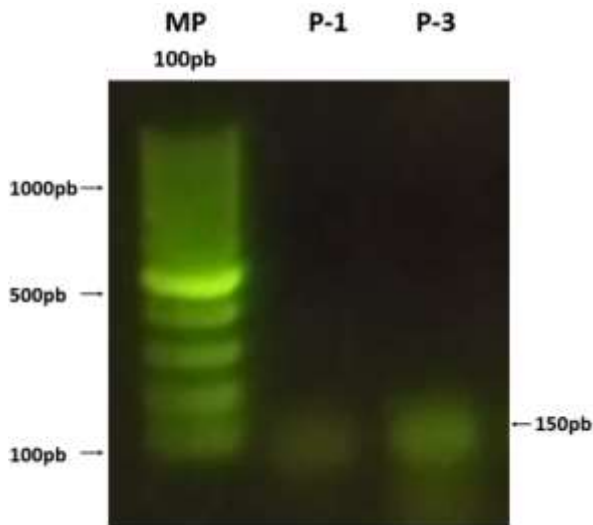


FIGURA 15. FRAGMENTO DE 439PB DE LA PROTEÍNA NS5B PERTENECIENTE AL PACIENTE 3.

Resultados de secuenciación

Luego de la obtención de los productos de PCR, estos fueron procesados mediante el método de secuenciación SANGER por el Laboratorio de Servicios Genómicos (LANGEBIO). Antes de ser enviados a secuenciar, los productos de PCR fueron purificados y determinada su concentración de acuerdo con las especificaciones del laboratorio (100ng en 20µl de producto de PCR y 10µM para los oligonucleótidos).

El resultado de la secuenciación del fragmento de 150pb de la región NS5A, en los pacientes P1 y P3 no fue identificada ninguna similitud.

Como parte de los resultados de secuenciación del producto de PCR de 439pb de la proteína NS5B del P1, fueron identificados 86 de los 450 nucleótidos, encontrando una similitud del 93% con la región *core* del n260 al n346, identificado como genotipo 2 (Figura 16).

```
>11.-P1NS5B_pG2NS5B4s
```

```
CAGGGTGGCTCCTGTCCCCTCGAGGTTCTCGTACTTCGTGGGGCCC
```

```
ID de la secuencia con la que se encontró identidad: MN209140, genotipo 2k/1b
```

```
Score:69.4 bits(37), Expect:3e-08, Identidad:43/46(93%), Gaps:0/46(0%)
```

```
Busqueda 1 CAGGGTGGCTCCTGTCCCCTCGAGGTTCTCGTACTTCGTGGGGCCC 46
```

```
|||||
```

```
Resultado 240 CAGGGTGGCTCCTGTCCCCTCGAGGTTCTCGTCCATCTTGGGGCCC 285
```

FIGURA 16. RESULTADO DE SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PROTEÍNA NS5B DEL P1. A) SECUENCIA LIMPIA COMO RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN. B) BLAST CON LA SECUENCIA MN209140.

Debido a estas discrepancias, nuevamente obtuvimos la región UTR de los pacientes P1 y P3 y fueron enviadas a secuenciación obteniéndose lo siguiente, el P1 fue identificado como genotipo 2k/1b, al ser realizado un BLAST en donde se obtuvo una identidad del 99% con la secuencia identificada como MK527508, la cual es caracterizada con el genotipo antes mencionado (Figura 17), y el control P3 genotipo 2b, con una identidad del 99% con la secuencia KM275478.1 (Figura 18). Además, en la secuencias se identificaron los nucleótidos donde cortan las enzimas de restricción para cada una de las muestras



FIGURA 17. RESULTADO DE SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PROTEÍNA UTR DEL P1. A) SECUENCIA LIMPIA COMO RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN. B) BLAST CON LA SECUENCIA MK527508.1.

A) >P3UTR_p940 GENOTIPO 2b
 ATGAGTGTTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA
 CCGGTGAGTACACCGGAATTACCGGAAAGACTGGGTCTTTCTTGGATAAACCCACTCTAT
 GTCCGGTCATTTGGGCATGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAA
 GGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCCTCGAGAGT

ID de la secuencia con la que se encontró identidad KM275478.1, genotipo 2b
 Score: 388 bits (210), Expect: 3e-103, Identities: 215/217 (99%), Gaps:1/217(0%)

B) Búsqueda 1 ATGAGTGTTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA 60
 |||
 Resultado 34 ATGAGTGTTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA 93

Búsqueda 61 CCGGTGAGTACACCGGAATTACCGGAAAGACTGGGTCTTTCTTGGATAAACCCACTCTA 120
 |||
 Resultado 94 CCGGTGAGTACACCGGAATTACCGGAAAGACTGGGTCTTTCTTGGATAAACCCACTCTA 153

Búsqueda 121 TGTCCGGTCATTTGGGCATGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAA 180
 |||
 Resultado 154 TGTCCGGTCATTTGGGCATGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAA 213

Búsqueda 181 AGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCCTCGAGAG 217
 |||
 Resultado 214 AGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGC-TCGAGAG 249

FIGURA 18. RESULTADO DE SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PROTEÍNA UTR DEL P3. A) SECUENCIA LIMPIA COMO RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN. B) BLAST CON LA SECUENCIA KM275478.1.

Como siguiente paso fue obtener iniciadores para la región *core* empleando secuencias de los genotipos 2a y 2b (Tabla 8), esto debido a que la proteína Core es específica para la determinación del genotipo de las muestras.

TABLA 8. NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LA REGIÓN CORE DEL VHC GENOTIPO 2A Y 2B.

Subtipo	ID de la secuencia		
2a	KC844048.1	JQ061472.1	KM587617.1
	M2327800.1	JQ061472.1	KY620352.1
	M2327784.1	KM349851.1	KM587618.1
2b	AF1770036	AF169005.1	AF238485
	AB047639.1	KC967476.1	KM587616.1
	KF676352.1	AF169004.1	LC368378.1
	KM577616.1		

Las secuencias anteriores fueron empleadas en la realización de oligonucleótidos específicos para las proteínas core de ambos genotipos, tanto 2a como 2b. La hibridación *in silico* de los oligonucleótidos se muestran a continuación (Figura 19) en la secuencia de referencia JX014307.1 obtenida en GenBank, así como las características de cada uno de los oligonucleótidos (Tabla 9).



FIGURA 19. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA OBTENER LA REGIÓN CORE. SE MUESTRA LA UBICACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES EN LA SECUENCIA DE LA REGIÓN CORE (SECUENCIA EN COLOR AZUL) DEL VHC, CADA OLIGONUCLEÓTIDO SE MUESTRA DE UN COLOR DISTINTO, ASÍ COMO EL NOMBRE ASIGNADO A CADA OLIGONUCLEÓTIDO

TABLA 9. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA OBTENER LA PROTEÍNA CORE PARA EL GENOTIPO 2A Y 2B DEL VHC.

Nombre de la secuencia	5' a 3'	Posición en el gen	Numero de bases	Tm (°C)
G2bPC1s	GAT AAA CCC ACT CTA TGC CCG	297-317	21	59
G2bPC2s	CTT GTG GTA CTG CCT GAT AG	376-395	20	59
G2bE1a	TCG AGC TGC C AAG TGA TGC T	1060-1041	20	60
G2aC1s	AAC GTG GGT AAG GTC ATC G	692-710	19	61
G2aC1a	CGA TGA CCT TAC CCA CGT T	710-692	19	61
G2aE2a	CAG TCR TTR GTC ACC ATG TA	960-941	20	59
G2aE1a	TTY CCC ACT TTC TCG CAG G	1023-1041	19	62

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados fueron los pares G2bPC1s y G2aE1a del cual se obtiene un producto de PCR de 788 pb, a partir de ese producto se realizó una PCR anidada con los oligonucleótidos G2bPC2s y G2bE1a, obteniéndose un producto de PCR de 684pb para las muestras P-1; realizado por duplicado en los pozos dos y tres, y P-3, en los pozos cuatro y cinco del gel de agarosa, también fue empleado un marcador de peso molecular de 100pb, en cual está presente en el primer pozo del gel (Figura 20).

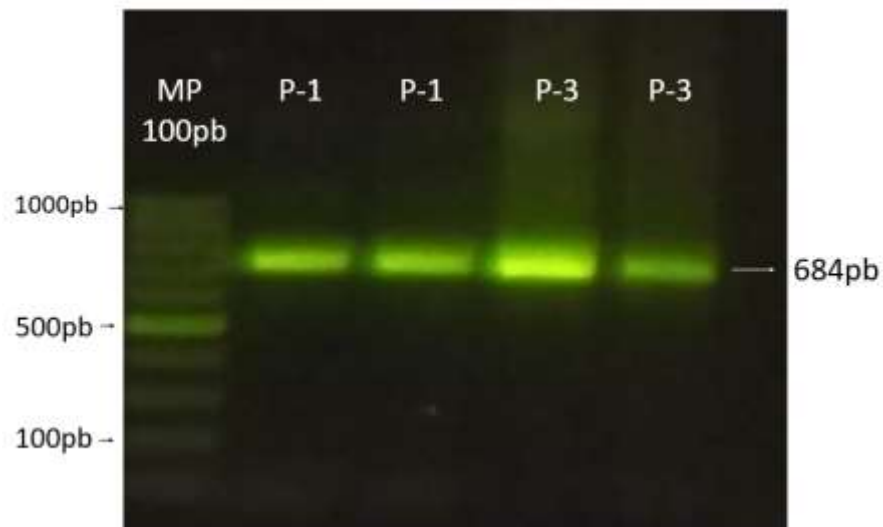


FIGURA 20. RESULTADO DE LA OBTENCIÓN DEL PRODUCTO PCR DE LA PROTEÍNA CORE.

Los productos de PCR de la proteína core fueron secuenciados para el P-1 y el P-3 (control), los resultados se muestran a continuación, de nuevo comprobando que el P-1 presenta una recombinante 2k/1b (Figura 21) mientras que el P3 fue caracterizado como genotipo 2b (Figura 22)

>3.-PICORE_pG2bPC2s

```
GGAGGTCTCGTAGACCGTGCATCATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAAAGAAACACTAACCGCCGCCACAG
GACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGCCAGATCGTTGGCGGAGTTTACTTGTTCGCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGC
GACGAGGAAGACTTCTGAACGGTCCCAGCCGCGTGGAAAGCGCCAGCCCATCCCTAAAGATCGGGCGCTCCACTGGCAAGTCTC
GGGGACGTCCAGGATACCCCTGGCCCTGTATGGGAATGAGGGACTCGGTTGGGCAGGGTGGTTCTGTCCCTCGAGGTTCT
CGCCCTTCGTGGGGCCCATCTGAACCCCGGCACAGGTCGCGCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACTCTCAAGTGGGGCTTTC
CGACCTCATGGGGTACATTCCCGTTGTTGGCGCCCGGTTGGTGGCGTAGCCAGGGCCCTCGCGCACGGCGTGAGGGTCTCGG
AGGACGGGATAAACTACGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCTTCTTAGCCCTTCTATCTTGCAATCACC
GTGCCGTTTCTGCCATACAGGTCAAGAACACAGTCCGACCATTACATGGCCCAAATGACTGCTCTAA
```

ID de la secuencia con la que se encontró identidad MK039720.1, genotipo 2k/1b

Score:889 bits(481), Expect: 0.0, Identidad:595/651(91%) Gaps:1/215(0%)

```
Búsqueda 1 GGAGGTCTCGTAGACCGTGCATCATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAA 60
Resultado 246 GGAGGTCTCGTAGACCGTGCATCATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAA 305
Búsqueda 61 GAAACACTAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGCCAGATCGTTGGCG 120
Resultado 306 GAAACACTAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGCCAGATCGTTGGCG 365
Búsqueda 121 GAGTTTACTTGTTCGCGCGCAGGGGCCAGGTTGGGTGTGCGCGCAGGAGAAAGACTT 180
Resultado 366 GAGTTTACTTGTTCGCGCGCAGGGGCCAGGTTGGGTGTGCGCGCAGGAGAAAGACTT 425
Búsqueda 181 CTGAACGGTCCCAGCCGCGTGGAAAGCGCCAGCCCATCCCTAAAGATCGGGCGCTCCACTG 240
Resultado 426 CTGAACGGTCCCAGCCGCGTGGAAAGCGCCAGCCCATCCCTAAAGATCGGGCGCTCCACTG 485
Búsqueda 241 GCAAGTCTTGGGACGTCCAGGATACCCCTGGCCCTGTATGGGAATGAGGGACTCGGTT 300
Resultado 486 GCAAGTCTTGGGACGTCCAGGATACCCCTGGCCCTGTATGGGAATGAGGGACTCGGTT 545
Búsqueda 301 GGCAGGGTGGTTCTCGTCCCTCGAGGTTCTCGCCCTTCTGTTGGGGCCCATCTGACCC 360
Resultado 546 GGCAGGGTGGTTCTCGTCCCTCGAGGTTCTCGCCCTTCTGTTGGGGCCCATCTGACCC 605
Búsqueda 361 GGCACAGGTCCGCCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACTCTCACGTGCGGCTTTGCCGACC 420
Resultado 606 GGCACAGGTCCGCCAATTTGGGTAAGGTCATCGATACTCTCACGTGCGGCTTTGCCGACC 665
Búsqueda 421 TCATGGGGTACATTCCCGTTGTTGGCGCCCGGTTGGTGGCGTAGCCAGGGCCCTCGCGC 480
Resultado 666 TCATGGGGTACATTCCCGTTGTTGGCGCCCGGTTGGTGGCGTAGCCAGGGCCCTCGCGC 725
Búsqueda 481 ACGGCGTGAGGCTCTGGAGGACGGGATAAACTACGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCT 540
Resultado 726 ACGGCGTGAGGCTCTGGAGGACGGGATAAACTACGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCT 785
Búsqueda 541 CTTTCTCTATCTTCTCTTAGCCCTTCTATCTTGCAATCAGGTTGCCCGTTTCTGCCATAC 600
Resultado 786 CTTTCTCTATCTTCTCTTAGCCCTTCTATCTTGCAATCAGGTTGCCCGTTTCTGCCATAC 845
Búsqueda 601 AGGTCAAGAACAACAGT--GACCATTACATGGCCACAAATGACTGCTCTAA 649
Resultado 846 AGGTCAAGAACAACAGT--TACATGGTCACCAATGATTGCTCTAA 894
```

FIGURA 21. RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO CORE DEL P1, ASÍ COMO EL RESULTADO DE BLAST CON LA SECUENCIA MK039720.1, CONFIRMANDO QUE ES RECOMBINANTE 2k/1b.

>5.-P3CORE_p02bPC2a GENOTIPO 2b

```
CGGGAGTCTCGTAGACCGTGCATCATGAGCACTAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACAAACCGCCGCCACAGGA
CGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGCTGCCCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGGCGCAGCA
GGAAGACTTCCGAGCGATCCCAGCCCGTGGGAGGCGCCAGCCCATCCCGAAAGATCGGCCTCCACCGGCAAGTCTCGGGAAAGG
CCAGGATATCCCTGGCCCTGTATGGAAACGAGGGCTGTGGCTGGGCAGGTTGGCTCCTGTCCCCCGGGCTCTCGTCTACTTG
GGSCCCCACTGACCCCGCATAGATCAGCAACCTGGGCAGAGTCATCGACACCATTACGTGTGGTCTTGCCGACCTCATGGGGT
ACATCCCCTCGTTGGCGCTCCAGTTGGAGGCGTTGCCAGAGCTCTGGCACATGGTGTAGGGTCTGGAGGACGGGATAAATTAT
GCAACAGGGAAATTTGCTGGTGTCTTTCTCTATCTTCTACTTGCTCTTCTGTGTCGATCACAGTGCCTGGTGTCTGCAGTGG
AGTCAGGAACATTAGCCCGCAGCTATTACGCCACTAATGACTGCTCAAACAGCAGCATC
```

ID de la secuencia con la que se encontró identidad MZ327784.1 , genotipo 2k/1b

Score:385 bits(208), Expect: 3e-102, Identidad:213/215(99%) Gaps:3/651(0%)

```
Búsqueda 10 CGGGA-GTCTCGTAGACCGTGCATCATGAGCACTAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAA 68
      |||
Resultado 241 CGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCATCATGAGCAAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAA 300

Búsqueda 69 AAGAAACACAAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCAGATCGTTGG 128
      |||
Resultado 301 AAGAAACACAAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCAGATCGTTGG 360

Búsqueda 129 TGGAGTTTACTTGCTGCCCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACGAGGAAGAC 188
      |||
Resultado 361 CGGAGTTTACTTGCTGCCCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACGAGGAAGAC 420

Búsqueda 189 TTCCGAGCGATCCAGCCCGTGGGAGGCGCCAGCCCATCCCGAAAGATCGGCCTCCAC 248
      |||
Resultado 421 TTCCGAGCGATCCAGCCCGTGGGAGGACGCCAGCCCATCCCGAAAGATCGGCCTCCAC 480

Búsqueda 249 CGGCAAGTCTCGGGAAAGGCCAGGATATCCCTGGCCCTGTATGGAAACGAGGGCTGTGG 308
      |||
Resultado 481 CGGCAAGTCTCGGGAAAGGCCAGGATATCCCTGGCCCTGTATGGAAACGAGGGCTGTGG 540

Búsqueda 309 CTGGGCAGGTTGGCTCCTGTCCCCCGGGCTCTCGTCTACTTGGGGCCCCACTGAACC 368
      |||
Resultado 541 CTGGGCAGGTTGGCTCCTGTCCCCCGGGCTCTCGTCTACTTGGGGCCCCACTGACCC 600

Búsqueda 369 CCGGCATAGATCAGCAACCTGGGCAGAGTCATCGACACCATTACGTGTGGTCTTGCCGA 428
      |||
Resultado 601 CCGGCATAGATCAGCAAATTTGGGTAGAGTCATCGATACCATTACGTGTGGTTTTGCCGA 660

Búsqueda 429 CCTCATGGGGTACATCCCGTCTGGGCGCTCCAGTTGGAGGCGTTGCCAGAGCTCTGGC 488
      |||
Resultado 661 CCTCATGGGGTACATCCCGTCTGGGCGCTCCAGTTGGAGGCGTCCAGAGCTCTGGC 720

Búsqueda 489 ACATGGTGTAGGGTCTGGAGGACGGGATAAATTATGCAACAGGGAAATTTGCTGGTTG 548
      |||
Resultado 721 ACACGGTGTAGGGTCTGGAGGACGGGATAAATTATGCAACAGGGAAATTTGCTGGTTG 780

Búsqueda 549 CTCTTTCTATCTTCTACTTGCTCTTCTGTGTCGATCACAGTGCCTGGTGTCTGCAGT 608
      |||
Resultado 781 CTCTTTCTATCTTCTTGTCTTCTTCTGTGTCGATCACAGTGCCTGGTGTCTGCAGT 840

Búsqueda 609 GGAAGTCAGGAACATTAGCCCGCAGCTATTACGCCACTAATGACTGCTCAAACAGCAGCAT 668
      |||
Resultado 841 GGAAGTAAGGAACATTAGTTCTAGCTACTACGCCACTAATGATTGCTCTAACAACAGCAT 900

Búsqueda 669 C 669
      |
Resultado 901 C 901
```

FIGURA 22. RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO CORE DEL P3, ASÍ COMO LA COMPARACIÓN CON LA SECUENCIA MZ327784.1, CONFIRMANDO QUE ES RECOMBINANTE 2B.

Después de analizar el BLAST de NS5B se determinó que la secuencia de la proteína obtenida no fue NS5B sino un fragmento de la proteína core, además y que el paciente presentó una recombinante del genotipo 2k/1b; por lo que se buscaron en NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, s/f) secuencias pertenecientes a dicha recombinante (Tabla10) y se obtuvo una secuencia consenso que subsecuentemente fue comparada con la secuencia consenso de los subtipos 2, 2a y 2b.

TABLA 10. ID DE SECUENCIAS DEL VHC RECOMBINANTE 2K/1B.

Subtipo	Número de identificación de GenBank				
2k/1b	MK527508	MK039720	FJ821465	HQ537006	KY780123
	MK527509.1	JX227952.1			

Las secuencias consenso de cada uno de los genotipos (2, 2a, 2b) y la recombinante 2k/1b fueron comparadas mediante el programa BioEdit 7.2.5.0 con la finalidad de identificar si la diferencia entre estos subtipos era relevante o si por el contrario presentaban gran similitud, a continuación, se muestra la comparación de estas secuencias consenso, tanto para la proteína NS5A (Figura 23) como para la proteína NS5B (Figura 24).

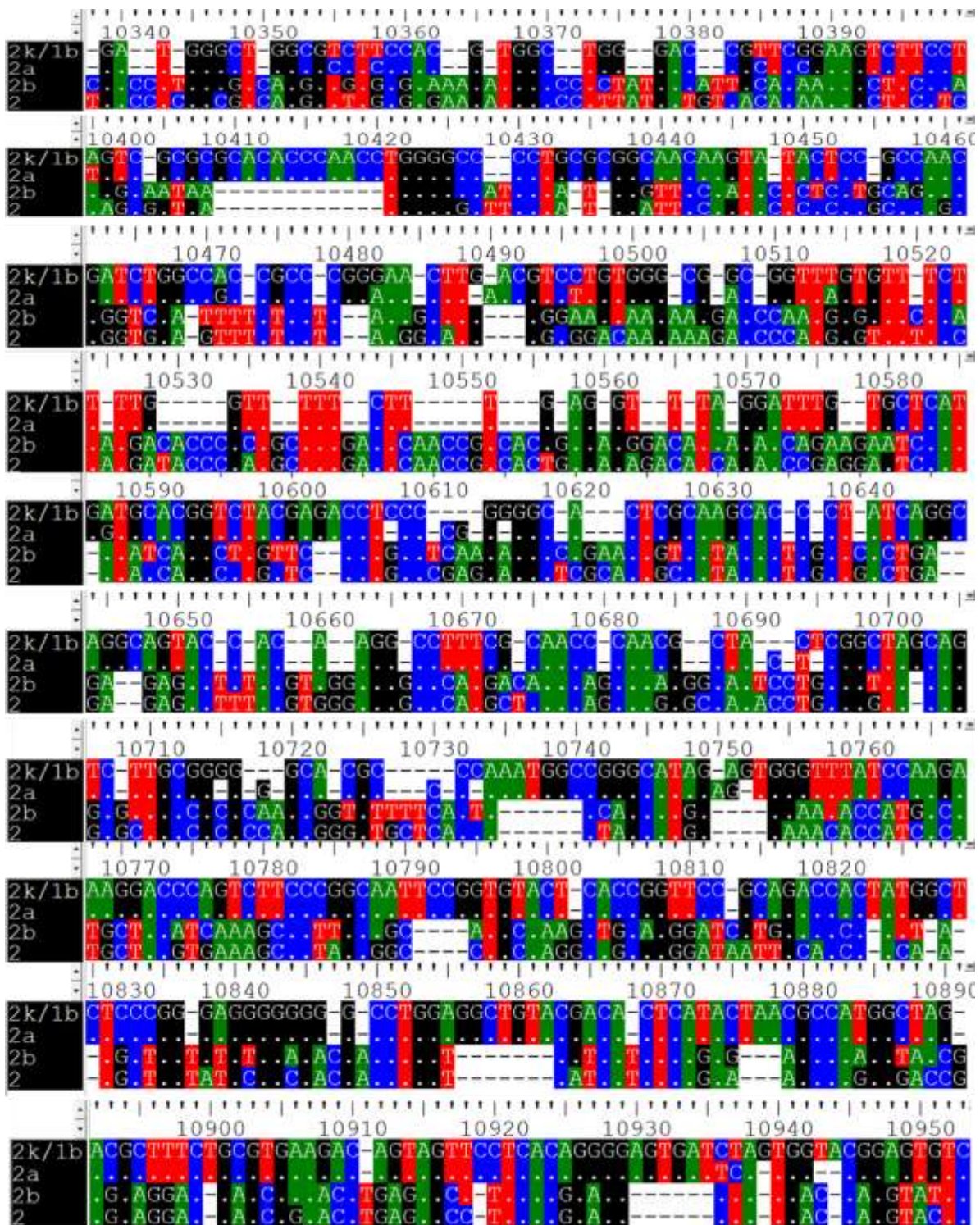


FIGURA 23. FRAGMENTO DEL ALINEAMIENTO ENTRE LAS SECUENCIAS CONSENSO DE LOS SUBTIPOS 2, 2A Y 2B, ASÍ COMO DE LA RECOMBINANTE 2K/1B PARA LA PROTEÍNA NS5A.

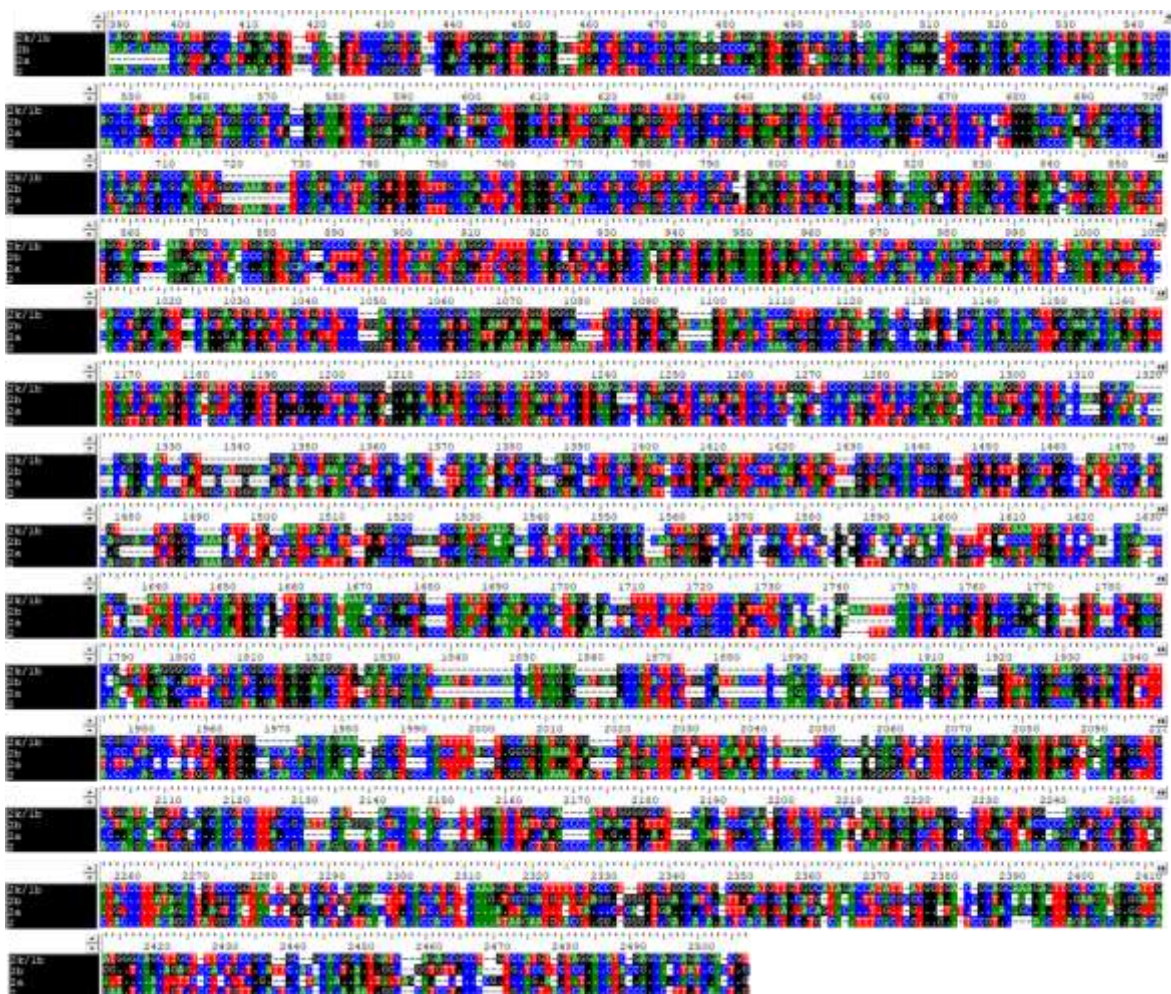


FIGURA 24. FRAGMENTO DEL ALINEAMIENTO ENTRE LAS SECUENCIAS CONSENSO DE LOS SUBTIPOS 2, 2A Y 2B, ASÍ COMO DE LA RECOMBINANTE 2K/1B PARA LA PROTEÍNA NS5B.

Obtención de estructuras proteicas

Obtención de estructuras proteicas NS5A y NS5B del VHC GT2

Se buscó en la base de datos de Protein Data Bank (PDB) proteínas cristalizadas para las proteínas NS5A y NS5B del virus de hepatitis C, no obstante, no se encontraron reportadas estructuras cristalizadas del genotipo 2 para VHC, por lo que fueron seleccionadas dos estructuras del genotipo 1b para ser utilizadas como referencia, teniendo estas el PDB ID 3FQQ en color azul para la proteína NS5A, un homodímero del dominio I (Figura 25) y 4TLR en color amarillo para NS5B, mostrándose una única cadena, con una estructura característica de las polimerasas (Figura 26).

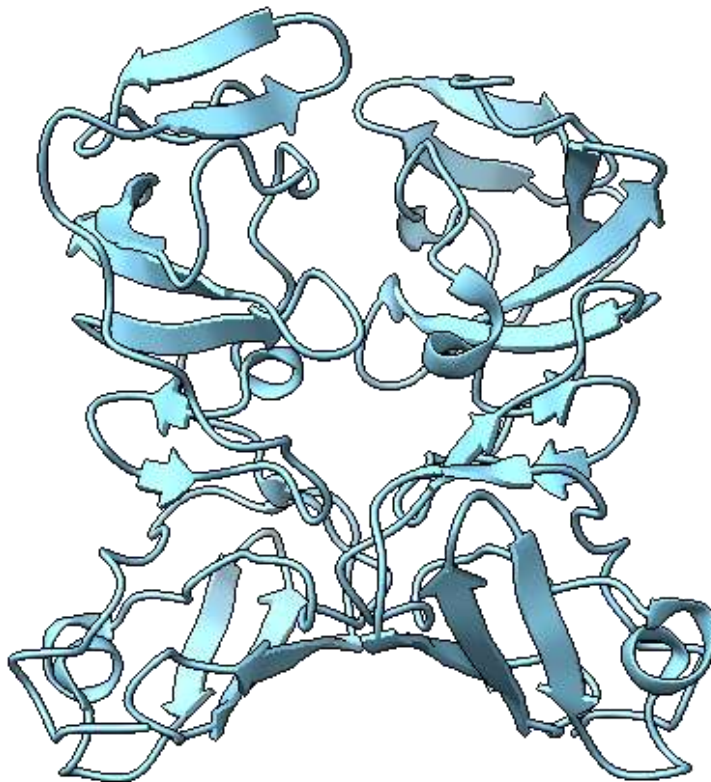


FIGURA 25. ESTRUCTURA CRISTALIZADA DE LA PROTEÍNA NS5A GENOTIPO 1B DEL VHC CON PDB: 3FQQ

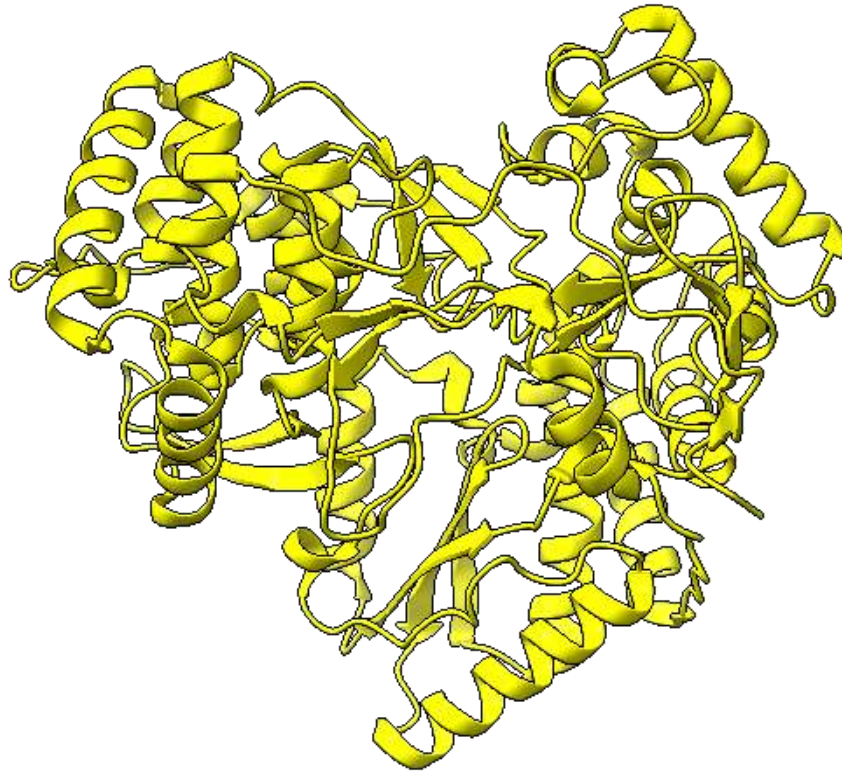


FIGURA 26. ESTRUCTURA CRISTALIZADA DE LA PROTEÍNA NS5B GENOTIPO 1B DEL VHC PDB: 4TLR.

Obtención de estructuras por homología

Con base en la información obtenida de la base de datos PDB y con ayuda de una secuencia de referencia para GT2 del VHC (GenBank: D00944.1) se realizaron modelados para las estructuras proteicas NS5A y NS5B utilizando el programa ITASSER, el cual se encarga de predecir la conformación de las estructuras proteicas mediante homología, obteniéndose cinco modelos distintos de cada proteína. Estos modelos fueron comparados con las estructuras de almacenadas en el PDB mediante sobre posicionamiento. Los modelos que presentaron mayor similitud estructural y un valor de RMSD menor fueron seleccionados para su análisis. En la Figura 27 se observa de color azul la proteína de PDB 3FQQ y en color rojo el modelo de ITASSER con un RMSD de 0.529 para la proteína NS5A y en color amarillo (Figura 28) la proteína cristalizada de PDB 4TLR mientras que en morado se presenta el modelo de ITASSER con un RMSD de 0.775 para la proteína NS5B (Yang et al., 2015). El valor de RMSD o distancia cuadrática media (root mean squared distance, por sus siglas en ingles), es la comparación cuantitativa de estructuras tridimensionales la cual se calcula mediante los átomos equivalentes entre dos estructuras, en donde un valor de cero representa estructuras idénticas, mientras que al aumentar el valor de RMSD determina que las estructuras proteicas comparadas presentan mayor diferencia estructural (Bolton et al., 2011; Yusuf et al., 2008).

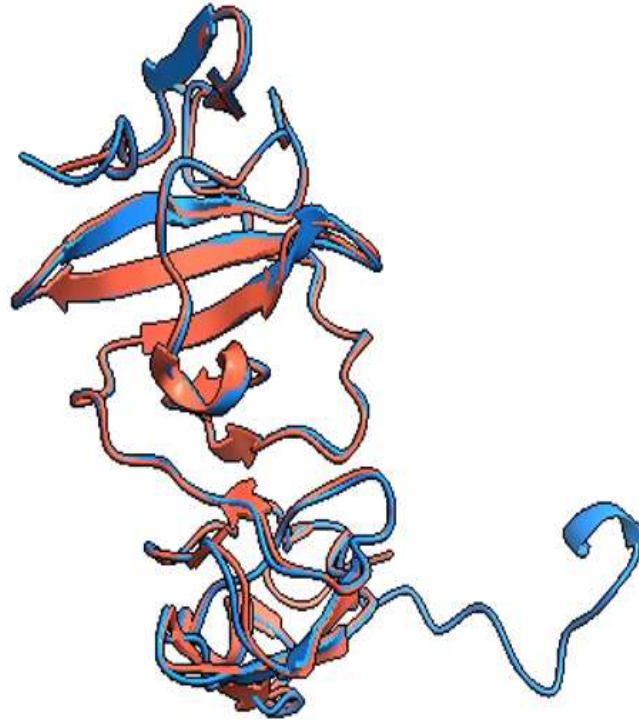


FIGURA 28. SUPERPOSICIONAMIENTO DE LA ESTRUCTURA OBTENIDA EN PDB:3FQQ (COLOR AZUL) Y LA ESTRUCTURA OBTENIDA POR HOMOLOGÍA (COLOR ROJO) DE LA PROTEÍNA NS5A DEL VHC.



FIGURA 27. SUPERPOSICIONAMIENTO DE LA ESTRUCTURA OBTENIDA EN PDB: 4TLR (COLOR AMARILLO) Y LA ESTRUCTURA OBTENIDA (COLOR MORADO) POR HOMOLOGÍA DE LA PROTEÍNA NS5B DEL VHC.

Localización de las SAR dentro de las proteínas NS5A y NS5B del VHC

Una vez obtenidos los modelos para cada una de las proteínas, fue posible localizar la ubicación dentro de la secuencia nucleotídica cada una de las sustituciones asociadas a resistencia reportadas en la literatura para el genotipo 2 (Tabla 2), de este modo se muestra a continuación a ambas proteínas, NS5A (en color rojo; Figura 29) y NS5B (de color morado; Figura 30) con sus respectivas SAR (color verde).

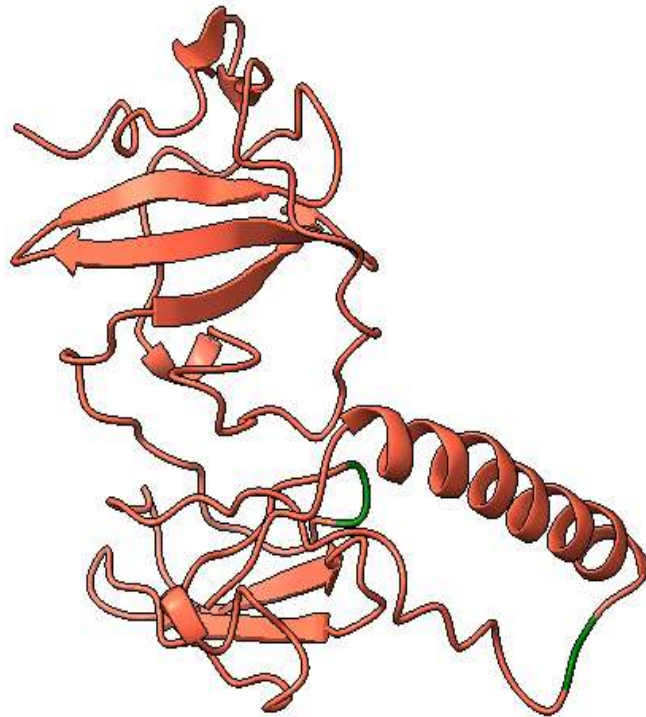


FIGURA 29. MODELO GENERADO POR HOMOLOGÍA DE LA PROTEÍNA NS5A (COLOR ROJO) DEL VHC CON SUS RESPECTIVAS SUSTITUCIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA (COLOR VERDE).

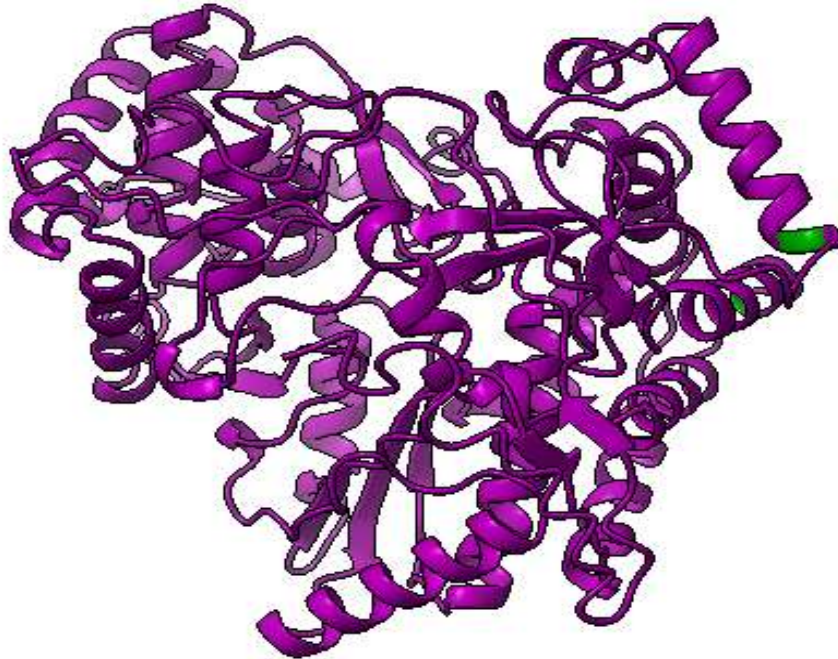


FIGURA 30. MODELO GENERADO POR HOMOLOGÍA DE LA PROTEÍNA NS5B (COLOR ROJO) DEL VHC CON SUS RESPECTIVAS SUSTITUCIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA (COLOR VERDE).

Así mismo, se muestra cada una de las SAR reportadas en la literatura para el genotipo 2 (Tabla 2) en NS5A (Figura 31), siendo las sustituciones L31M, C92R y Y93H y en NS5B (Figura 32) las sustituciones L159F y S282R en las que se muestra a ambas proteínas con los aminoácidos originales o de referencia a su secuencia (en color verde) y al mismo tiempo las sustituciones reportadas en la literatura (de color azul), con la finalidad de observar cómo la sustitución de un aminoácido por otro podría modificar la estructura conformacional de la proteína, impidiendo así la unión de los fármacos en el sitio de acción de estos, evitando así la función del fármaco y por tanto, generar un paciente no respondedor al tratamiento contra VHC.

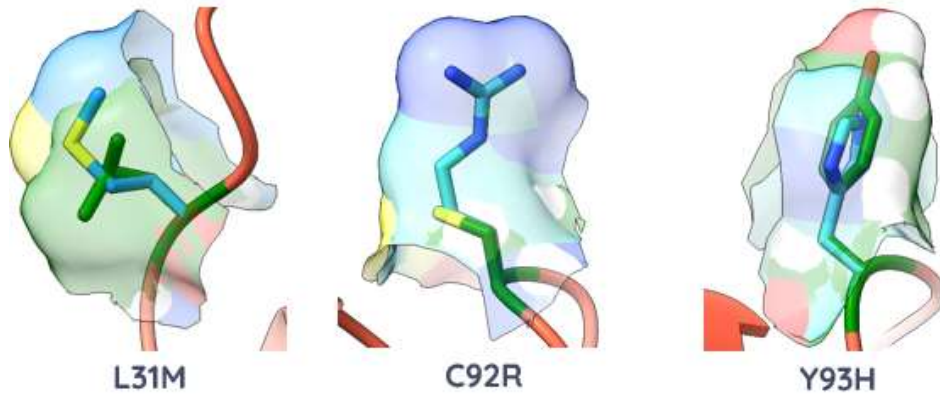


FIGURA 31. SUSTITUCIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA EN LA PROTEÍNA NS5A DEL VHC. DE COLOR VERDE SE MUESTRA AL AMINOÁCIDO DE REFERENCIA, MIENTRAS QUE EN COLOR AZUL SE PRESENTA LA SUSTITUCIÓN L31M, C92R Y Y93H.

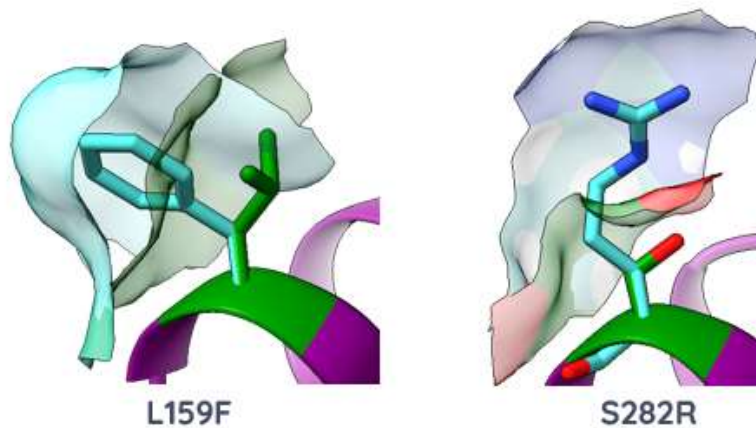


FIGURA 32. SUSTITUCIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA EN LA PROTEÍNA NS5B DEL VHC. DE COLOR VERDE SE MUESTRA AL AMINOÁCIDO DE REFERENCIA, MIENTRAS QUE EN COLOR AZUL SE PRESENTA LA SUSTITUCIÓN L159F Y S282R

Al determinarse que la muestra problema era una recombinante 2k/1b y no encontrarse estructuras reportadas de esta recombinante en PDB, se optó por predecir los modelos de las proteínas NS5A y NS5B, del mismo modo que los modelos para las proteínas del genotipo 2, fueron seleccionados aquellos que presentaran una mayor similitud estructural con los modelos generados anteriormente, así como un valor de RMSD menor, mostrándose en color naranja el modelo de dominio I de NS5A (Figura 33) y en color verde limón la proteína NS5B (Figura 34).

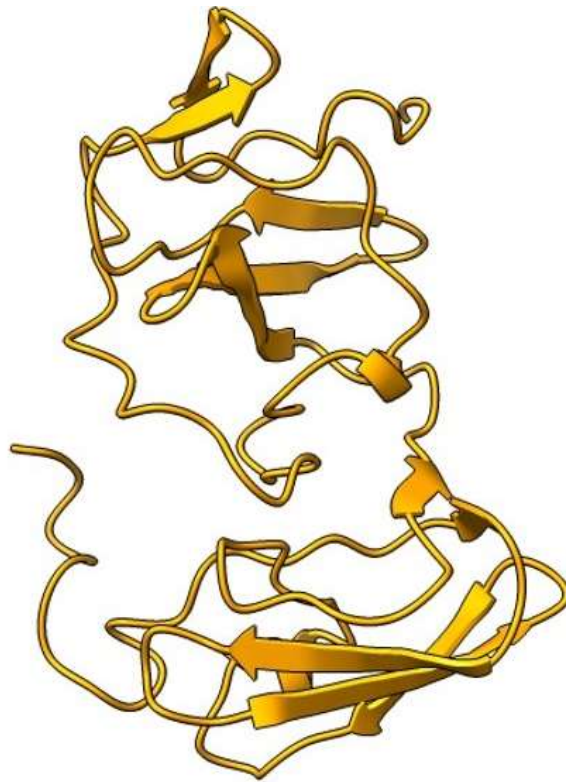


FIGURA 33. MODELO GENERADO POR HOMOLOGÍA PARA EL DOMINIO 1 DE LA PROTEÍNA NS5A DE LA RECOMBINANTE 2k/1b.

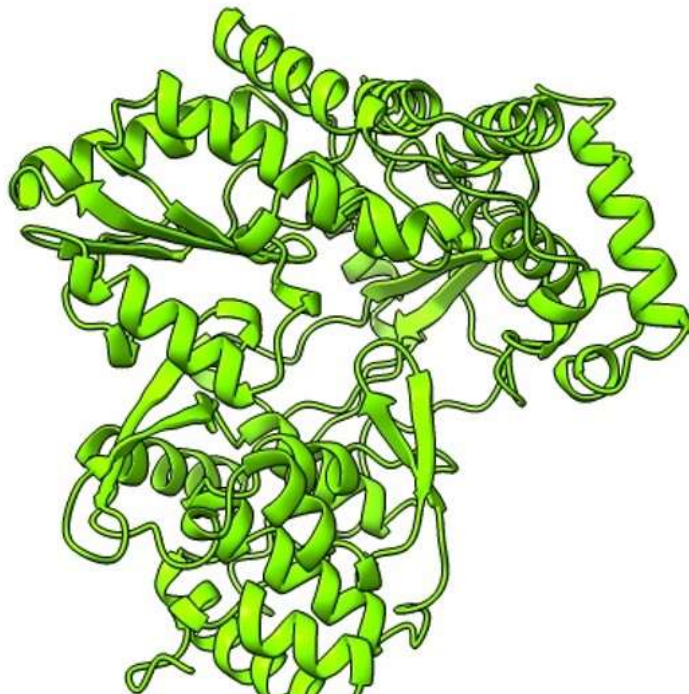


FIGURA 34. MODELO GENERADO POR HOMOLOGÍA PARA LA PROTEÍNA NS5B DE LA RECOMBINANTE 2k/1b.

Por último, se realizó una superposición de ambos modelos realizados por ITASSER, determinándose el valor de RMSD entre las estructuras, con la finalidad de poder observar si existía diferencia estructural entre el genotipo 2 y la recombinante 2k/1b. Para el superposicionamiento de las estructuras del dominio I de NS5A se determinó un RMSD de 0.284, en donde la proteína GT2 se representa de color azul, mientras que la recombinante 2k/1b se visualiza en color naranja (Figura 35).

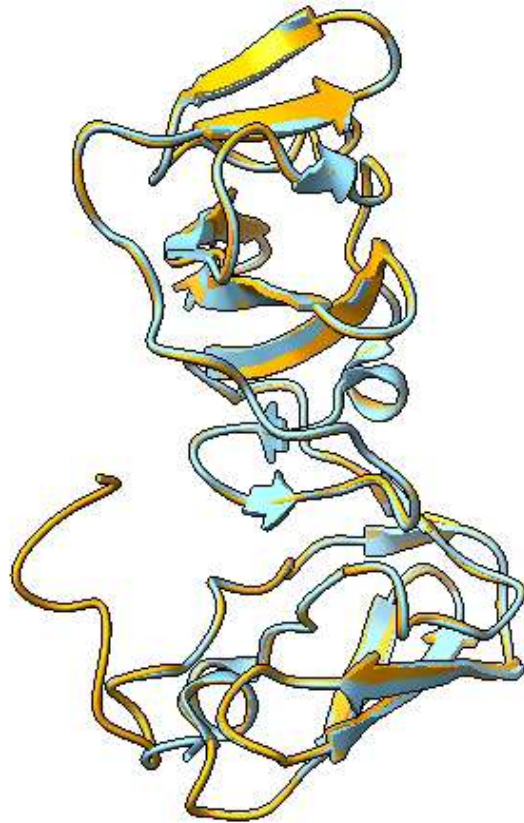


FIGURA 35. SUPERPOSICIONAMIENTO DEL DOMINIO I DE LA PROTEÍNA NS5A ENTRE EL GENOTIPO 2 (AZUL) Y EL MODELO DE LA RECOMBINANTE 2k/1b (NARANJA)

Para el superposicionamiento de los modelos de la proteína NS5B el valor de RMSD fue de 0.770, visualizándose el GT2 de color morado y la recombinante de color verde limón (Figura 36); esto mostro al final que no hay gran diferencia estructural por lo menos entre el dominio I de NS5A de ambos modelos, sin embargo, si existe una ligera diferencia estructural entre los modelos del GT2 y el GT2k/1b.

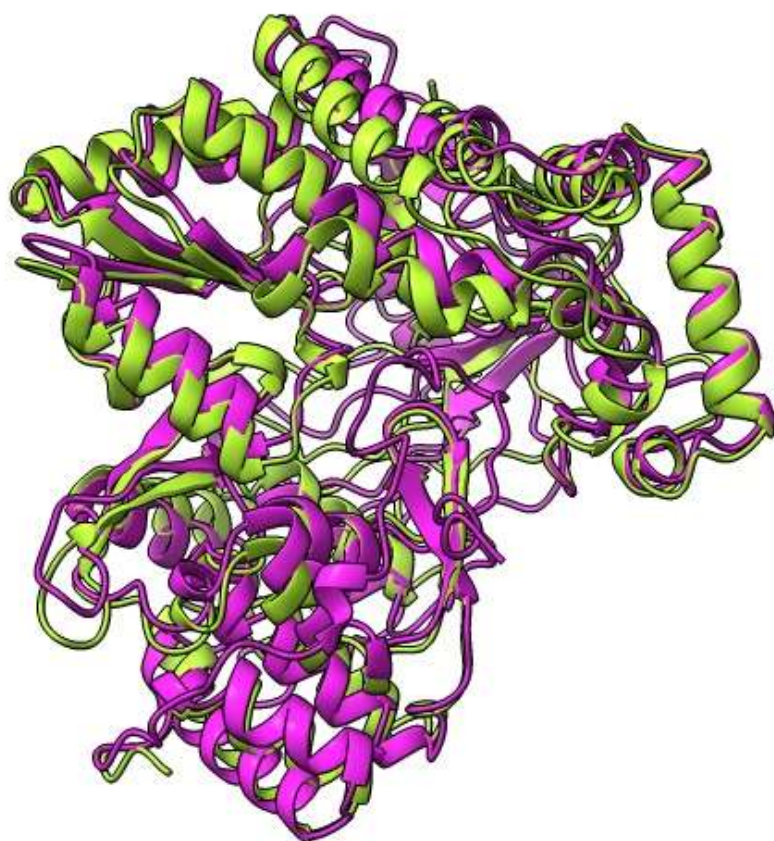


FIGURA 36. SUPERPOSICIONAMIENTO DE LOS MODELOS PARA LA PROTEÍNA NS5B GENOTIPO 2 (MORADO) Y LA RECOMBINANTE 2K/1B (VERDE LIMÓN).

DISCUSIÓN

El análisis de las mutaciones en las secuencias de nucleótidos de las proteínas virales NS5A y NS5B asociadas a resistencia al tratamiento con los inhibidores de acción directa pangenómicos obtenidas de un paciente denominado P-1 el cual no respondió al tratamiento con sofosbuvir/ velpatasvir se llevó a cabo, sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados debido a que no fue posible obtener las secuencias de las proteínas NS5A y NS5B a consecuencia del genotipo viral que presentaba la muestra. El P-1 antes del estudio presentaba la clasificación viral de genotipo 2 por un laboratorio particular.

El tratamiento conocido comercialmente con el nombre de Eplclusa es un antiviral utilizado en el tratamiento de personas con hepatitis C crónica, caracterizado por ser un medicamento pangotípico (Borgia et al., 2019). Sofosbuvir se trata de un antiviral dirigido a inhibir a la proteína viral NS5B, una polimerasa dependiente ARN, en tanto que velpatasvir es un inhibidor de la proteína viral NS5A implicada en el complejo de replicación del VHC (Bourlière et al., 2017).

El resultado del análisis de las secuencias codificantes para las proteínas virales NS5A y NS5B para comprender el por qué el P-1 no respondió al tratamiento con los AAD velpatasvir y sofosbuvir no fue posible debido a que los oligonucleótidos diseñados eran específicos para el genotipo 2 del VHC y no para la recombinante 2k/1b que se determinó presentaba el paciente no respondedor.

Al no poder obtener las secuencias de nucleótidos no fue posible identificar las SAR dentro del marco de lectura abierto, no obstante, fue posible identificar aquellas ya reportadas en literatura para el genotipo 2, tal es el caso del daclatasvir, en donde las sustituciones reportadas para la proteína NS5A son las sustituciones F28S, L31M, C92R y Y93H, mientras que para la NS5B se han reportado las sustituciones L159F y S282G/R/T (Howe et al., 2022; Lontok et al., 2015, Nakamoto et al., 2014).

Como consecuencia de lo anterior se obtuvieron y secuenciaron también las regiones *core* y UTR con la finalidad de identificar correctamente el genotipo viral de la muestra, ya que en otros trabajos se ha visto que la región UTR del virus es una región altamente conservada entre genotipos y por ello es empleada para la genotipificación del virus, así como la región *core*, ya que se ha identificado que presentan la variabilidad genética suficiente para poder discriminar entre diferentes subtipos (Chevaliez & Pawlotsky, 2009).

Por secuenciación de las regiones UTR 5' y de la proteína C de la cápside viral el paciente P-1 fue clasificado como genotipo recombinante 2k/1b. La forma recombinante 2k/1b del virus de hepatitis C, identificada por primera vez en el año 1999 en San Petersburgo (Hostager et al., 2019) siendo denominado KP1_2k/1b en lo que antiguamente se conocía como la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas

(URSS). La presencia de esta recombinante ha sido detectada en países como Rusia, Irlanda, Francia, Alemania, Georgia, Uzbekistán, entre otros, siendo Georgia el país con mayor prevalencia de casos con el 20% de prevalencia de los casos totales de VHC (Hostager et al., 2019; Zubkin et al., 2019). Otro dato importante que resaltar sobre esta recombinante es que no ha sido reportada en la República Mexicana, pero si en los Estados Unidos y Canadá (Raghwani et al., 2012; Susser et al., 2017)

La detección de recombinantes es un proceso difícil de realizar, debido a que son escasas sin mencionar que el proceso de genotipificación es específico para genotipos y subtipos. En la actualidad se han identificado solo cinco recombinantes naturales intergenotipo e intersubtipo (1a/1b, 2b/b, 2k/1b, 2i/6p y 2/5) (Fanciulli, 2024; González-Candelas et al., 2011)

El origen de la recombinante 2k/1b en un comienzo fue erróneamente asociado con la alta frecuencia de mutaciones originadas por la polimerasa viral NS5B que es incapaz de corregir mutaciones, más adelante se descubrió que esta recombinante es el resultado de la recombinación homóloga producida entre el ARN del VHC del genoma de los subtipos 2k (perteneciente a los genes estructurales del genoma del virus) y el subtipo 1b (genes no estructurales del virus) (Алексеевич et al., 2021).

Al parecer la no respuesta al tratamiento de P-1 con los antivirales de acción directa pangotípicos sofosbuvir/velpatasvir se debió a que se ha reportado que la recombinante 2k/1b suelen tener poca efectividad en este tipo de tratamientos (Алексеевич et al., 2021). Aunque se ha reportado respuesta viral sostenida para esta recombinante en pacientes hemodializados con glecaprevir /pibrentasvir inhibidores de las proteínas virales NS3/4A y NS5A respectivamente (Zubkin et al., 2019), otro estudio reporto a 25 pacientes alemanes con la recombinante 2k/1b recibieron tratamiento con sofosbuvir/ribavirina y el 93% presento recaída, posteriormente 13 recibieron terapia de rescate con daclatasvir/ sofosbuvir, paritaprevir/ombistasvir/dasabuvir o con ledipasvir/sofosbuvir±ribavirina solo 9 alcanzaron RVS (Susser et al., 2017). Estos antecedentes nos dan la respuesta del

por qué el P-1 no respondió al tratamiento con sofosbuvir/velpatasvir, por lo que una estrategia diferente en el tratamiento podría resultar efectiva en la RVS al VHC.

Por otro lado, el análisis a nivel estructural no se encontraron en la base de datos Protein Data Bank ninguna estructura 3D para el genotipo 2 de la proteína NS5A ni NS5B, por lo que se usó de referencia las estructuras del genotipo 1b y se optó por realizar un modelo propio para el genotipo 2. Del mismo modo no fue posible encontrar ni en la base de datos PDB ni en literatura modelos de referencia para la recombinante 2k/1b por lo que se optó por realizar un modelo por homología en ITASSER, estos modelos fueron elaborados desde cero con ayuda de las secuencias aminoacídicas de ambos genotipos, tanto el genotipo 2 como la recombinante 2k/1b.


Por último, es importante mencionar que la correcta genotipificación del virus es importante para determinar el tratamiento adecuado para todos aquellos que; ya que en otros estudios que ha demostrado que la presencia de la recombinante 2k/1b pueden ser erróneamente clasificados como genotipos 2, 2a o 2c, lo que podría menospreciar la cantidad de personas que presenten esta recombinante a nivel mundial (Kassela et al., 2019; Schuermans et al., 2016)

CONCLUSIONES

- La evidencia presentada anteriormente demuestra el que el paciente P-1 no respondió a los AAD pangénóticos sofosbuvir/velpatasvir presenta una recombinante del VHC conocida como 2k/1b y el genotipo 2.
- Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para las proteínas virales NS5A y NS5B con secuencias GT2, 2a y 2b, así como el diseño de oligonucleótidos para la proteína *core*.
- Se obtuvieron los fragmentos de los marcos de lectura abierta de las proteínas NS5A Y NS5B sin haberse encontrado identidad dentro de las bases de datos BLAST.

- Se obtuvieron las secuencias de las regiones *core* y UTR, el resultado de esta secuenciación permitió identificar que el paciente no respondedor fue mal genotipificado, siendo el genotipo correcto una recombinante 2k/1b.
- La falla al tratamiento con sofosbuvir/velpatasvir en este estudio puede estar asociado al error en la genotipificación del paciente, ya que se ha visto que las personas que presentan la recombinante 2k/1b.
- Se identificaron las sustituciones asociadas a resistencia causadas por el tratamiento con los AAD pangenotípicos sofosbuvir/velpatasvir en las proteínas NS5A y NS5B, tanto en las estructuras proteicas como en las secuencias nucleotídicas, encontrándose tres sustituciones asociadas a la proteína NS5A y el fármaco daclatasvir; un análogo de velpatasvir, L31M, C92R y Y93H y dos SAR para la proteína NS5B y el fármaco sofosbuvir, en los aminoácidos L159F y S282R, sin embargo, ninguna de estas SAR ha sido identificadas en la recombinante asociada al paciente, por lo que no fueron identificadas en dicha estructura proteica.

REFERENCIAS

- ★ Sofosbuvir  (s/f). Recuperado el 16 de febrero de 2024, de <https://www.vademecum.es/principios-activos-sofosbuvir-j05ap08-us>
- Adams, R. L., Pirakitikulr, N., & Pyle, A. M. (2017). Functional RNA structures throughout the Hepatitis C Virus genome. *Current opinion in virology*, 24, 79–86.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.04.007>
- Aguilera Guirao, A., Romero Yuste, S., & Regueiro, B. J. (2006). Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(4), 264–276.
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(06\)73773-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(06)73773-9)
- Barakat, K. H., Anwar-Mohamed, A., Tuszynski, J. A., Robins, M. J., Tyrrell, D. L., & Houghton, M. (2015). A Refined Model of the HCV NS5A Protein Bound to Daclatasvir Explains Drug-Resistant

- Mutations and Activity against Divergent Genotypes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(2), 362–373. <https://doi.org/10.1021/ci400631n>
- Bartlett, C., Curd, A., Peckham, M., & Harris, M. (2018). Visualisation and analysis of hepatitis C virus non-structural proteins using super-resolution microscopy. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31861-0>
- Bolton, E. E., Kim, S., & Bryant, S. H. (2011). PubChem3D: Conformer generation. *Journal of Cheminformatics*, 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-4>
- Borgia, S. M., Dearden, J., Yoshida, E. M., Shafran, S. D., Brown, A., Ben-Ari, Z., Cramp, M. E., Cooper, C., Foxton, M., Rodriguez, C. F., Esteban, R., Hyland, R., Lu, S., Kirby, B. J., Meng, A., Markova, S., Dvory-Sobol, H., Osinusi, A. O., Bruck, R., ... Gane, E. J. (2019). Sofosbuvir/velpatasvir for 12 weeks in hepatitis C virus-infected patients with end-stage renal disease undergoing dialysis. *Journal of Hepatology*, 71(4), 660–665. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.05.028>
- Bourlière, M., Gordon, S. C., Flamm, S. L., Cooper, C. L., Ramji, A., Tong, M., Ravendhran, N., Vierling, J. M., Tran, T. T., Pianko, S., Bansal, M. B., de Ledinghen, V., Hyland, R. H., Stamm, L. M., Dvory-Sobol, H., Svarovskaia, E., Zhang, J., Huang, K. C., Subramanian, G. M., ... Zeuzem, S. (2017). Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir for Previously Treated HCV Infection. *New England Journal of Medicine*, 376(22), 2134–2146. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613512>
- Chevaliez, S., & Pawlotsky, J.-M. (2009). Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. *Annals of Hepatology*, 8(1), 7–12. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31804-6](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31804-6)
- Du, L., & Tang, H. (2016). An insight into the molecular characteristics of hepatitis C virus for clinicians. *Saudi Medical Journal*, 37(5), 483–491. <https://doi.org/10.15537/smj.2016.5.14178>
- Duvnjak, M., Pavić, T., Tomasić, V., Lerotić, I., & Virović, L. (2005). [Hepatitis C--treatment of untreated (naive) patients]. *Acta medica Croatica*, 59(5), 453–461.

- Echeverría, N., Moratorio, G., Cristina, J., & Moreno, P. (2015). Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World Journal of Hepatology*, 7(6), 831–845. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i6.831>
- Eltahla, A. A., Luciani, F., White, P. A., Lloyd, A. R., & Bull, R. A. (2015). Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance. *Viruses*, 7(10), 5206–5224. <https://doi.org/10.3390/v7102868>
- Fanciulli, C. (2024). *Coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis C en España: Tendencias epidemiológicas y características clínicas*. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/102340>
- Gao, M., O'Boyle, D. R., & Roberts, S. (2016). HCV NS5A replication complex inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 30, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.07.014>
- González-Candelas, F., López-Labrador, F. X., & Bracho, M. A. (2011). Recombination in Hepatitis C Virus. *Viruses*, 3(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/v3102006>
- Goonawardane, N., Ross-Thriepland, D., & Harris, M. (2018). Regulation of hepatitis C virus replication via threonine phosphorylation of the NS5A protein. *The Journal of General Virology*, 99(1), 62–72. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000975>
- Hepatitis C Online*. (s/f). Recuperado el 3 de febrero de 2023, de <https://www.hepatitisc.uw.edu/>
- Hepatitis C Virus Databases*. (s/f). HCV sequence database: Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R. The Los Alamos HCV Sequence Database. *Bioinformatics*(2005), 21(3):379-84. Recuperado el 3 de febrero de 2023, de <https://hcv.lanl.gov/content/index>
- Hostager, R., Ragonnet-Cronin, M., Murrell, B., Hedskog, C., Osinusi, A., Susser, S., Sarrazin, C., Svarovskaia, E., & Wertheim, J. O. (2019). Hepatitis C virus genotype 1 and 2 recombinant genomes and the phylogeographic history of the 2k/1b lineage. *Virus Evolution*, 5(2), vez041. <https://doi.org/10.1093/ve/vez041>
- Houghton, M. (2019). Hepatitis C Virus: 30 Years after Its Discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(12), a037069. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037069>

- Howe, A. Y. M., Rodrigo, C., Cunningham, E. B., Douglas, M. W., Dietz, J., Grebely, J., Popping, S., Sfalcin, J. A., Parczewski, M., Sarrazin, C., de Salazar, A., Fuentes, A., Sayan, M., Quer, J., Kjellin, M., Kileng, H., Mor, O., Lennerstrand, J., Fourati, S., ... Garcia, F. (2022). Characteristics of hepatitis C virus resistance in an international cohort after a decade of direct-acting antivirals. *JHEP Reports*, 4(5), 100462. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100462>
- Jin, Z., Leveque, V., Ma, H., Johnson, K. A., & Klumpp, K. (2013). NTP-mediated nucleotide excision activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(5), E348–E357. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214924110>
- Kassela, K., Karakasiliotis, I., Kokkiou, E., Souvalidou, F., Mimidis, P., Veletza, S., Panopoulou, M., Koskinas, J., Mimidis, K., & Mavromara, P. (2019). Intergenotypic 2k/1b hepatitis C virus recombinants in the East Macedonia and Thrace region of Greece. *Annals of Gastroenterology*, 32(1), 88–92. <https://doi.org/10.20524/aog.2018.0322>
- Kershenovich, D., Higuera-de-la Tijera, F., Flores, N., Cerda-Reyes, E., Castro-Narro, G., Aceves, G., Ruiz-Lujan, R., Ramos-Medina, S., Linares, J., Azamar-Alonso, A., Mendez-Navarro, J., & Chirino-Sprung, R. (s/f). Hepatitis C screening and detection program in a large population: Epidemiological transition and characterization of the disease. *Liver International*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/liv.15570>
- Koutsoudakis, G., Forns, X., & Pérez-del-Pulgar, S. (2013a). Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterología y Hepatología*, 36(4), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.11.005>
- Koutsoudakis, G., Forns, X., & Pérez-del-Pulgar, S. (2013b). Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterología y Hepatología*, 36(4), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.11.005>

- Li, H.-C., Yang, C.-H., & Lo, S.-Y. (2021). Hepatitis C Viral Replication Complex. *Viruses*, *13*(3), 520.
<https://doi.org/10.3390/v13030520>
- Lontok, E., Harrington, P., Howe, A., Kieffer, T., Lennerstrand, J., Lenz, O., McPhee, F., Mo, H., Parkin, N., Pilot-Matias, T., & Miller, V. (2015). Hepatitis C virus drug resistance–associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology*, *62*(5), 1623–1632.
<https://doi.org/10.1002/hep.27934>
- López-Jiménez, A. J., Clemente-Casares, P., Sabariego, R., Llanos-Valero, M., Bellón-Echeverría, I., Encinar, J. A., Kaushik-Basu, N., Froeyen, M., & Mas, A. (2014). Hepatitis C virus polymerase–polymerase contact interface: Significance for virus replication and antiviral design. *Antiviral Research*, *108*, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.04.009>
- Mariantonietta, P., Antonio, R., Lorenzo, O., & Nicola, C. (2019). Efficacy of 12-weeks velpatasvir plus sofosbuvir-based regimen in HCV-naive subjects with mild fibrosis: A meta-analysis. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis*, *90*(2), 187–196. <https://doi.org/10.23750/abm.v90i2.8374>
- McCauley, J. A., & Rudd, M. T. (2016). Hepatitis C virus NS3/4a protease inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, *30*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.07.015>
- Melendez-Mena, D., Mendoza-Torres, M. A., Sedeño-Monge, V., García, V. H. G. y, Rivera-García, E., Sánchez-Reza, L., Domínguez, M. del C. B., Guzmán-Flores, B., Martínez-Laguna, Y., Espinoza, J. M. C., Galindo-Santiago, I., Flores-Alonso, J. C., Vallejo-Ruiz, V., Cortes-Hernandez, P., Reyes-Leyva, J., Sosa-Jurado, F., & Santos-López, G. (2021). Effectiveness, tolerability and safety of Direct Acting Antivirals in Mexican individuals with Hepatitis C virus genotype-1 and previous pegylated interferon and ribavirin therapy. *PeerJ*, *9*, e12051.
<https://doi.org/10.7717/peerj.12051>
- Moradpour, D., Penin, F., & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1645>

- Nakamoto, S., Kanda, T., Wu, S., Shirasawa, H., & Yokosuka, O. (2014). Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(11), 2902–2912.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i11.2902>
- National Center for Biotechnology Information. (s/f). Recuperado el 20 de mayo de 2024, de
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Neufeldt, C. J., Joyce, M. A., Buuren, N. V., Levin, A., Kirkegaard, K., Jr, M. G., Tyrrell, D. L. J., & Wozniak, R. W. (2016). The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites. *PLOS Pathogens*, *12*(2), e1005428. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005428>
- Perales, C., Chen, Q., Soria, M. E., Gregori, J., Garcia-Cehic, D., Nieto-Aponte, L., Castells, L., Imaz, A., Llorens-Revull, M., Domingo, E., Buti, M., Esteban, J. I., Rodriguez-Frias, F., & Quer, J. (2018). Baseline hepatitis C virus resistance-associated substitutions present at frequencies lower than 15% may be clinically significant. *Infection and Drug Resistance*, *Volume 11*, 2207–2210.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S172226>
- Pérez-Hernández, J. L., Arce-Salinas, C. A., Lehmann-Mendoza, R., Torre-Delgadillo, A., Castro-Narro, G. E., Cerda-Reyes, E., Ramos-Gómez, M. V., Juárez-Chavez, L., Dehesa-Violante, M., Muñoz-Espinosa, L. E., Cisneros-Garza, L. E., Aiza-Haddad, I., Velarde-Ruiz Velasco, J. A., Contreras-Omaña, R., García-Casarreal, N., Carmona-Castañeda, A., & Higuera-de-la-Tijera, F. (2022). Sofosbuvir-velpatasvir en pacientes mexicanos con hepatitis C: Una revisión retrospectiva. *Revista de Gastroenterología de México*, *87*(1), 52–58.
<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2020.10.004>
- Preciado, M. V., Valva, P., Escobar-Gutierrez, A., Rahal, P., Ruiz-Tovar, K., Yamasaki, L., Vazquez-Chacon, C., Martinez-Guarneros, A., Carpio-Pedroza, J. C., Fonseca-Coronado, S., & Cruz-Rivera, M. (2014). Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral

- therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), 15992–16013.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.15992>
- Raghwani, J., Thomas, X. V., Koekkoek, S. M., Schinkel, J., Molenkamp, R., van de Laar, T. J., Takebe, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., Rambaut, A., & Pybus, O. G. (2012). Origin and Evolution of the Unique Hepatitis C Virus Circulating Recombinant Form 2k/1b. *Journal of Virology*, 86(4), 2212–2220. <https://doi.org/10.1128/JVI.06184-11>
- Razavi-Amoli, S.-K., & Alipour, A. (2022). Hepatitis C Virus Coinfection in People With Human Immunodeficiency Virus in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(10), ofac477. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac477>
- Ross-Thriepland, D., & Harris, M. (2015). Hepatitis C virus NS5A: Enigmatic but still promiscuous 10 years on! *Journal of General Virology*, 96(4), 727–738. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000009>
- Salvatierra, K. (2017). Epidemiología molecular del virus de la hepatitis C. *Infectio*, 21(2).
<https://doi.org/10.22354/in.v21i2.655>
- Sandmann, L., Schulte, B., Manns, M. P., & Maasoumy, B. (2019). Treatment of Chronic Hepatitis C: Efficacy, Side Effects and Complications. *Visceral Medicine*, 35(3), 161–170.
<https://doi.org/10.1159/000500963>
- Sandoval-Ramirez, J. L., Mata-Marín, J. A., García, G. H., & Gaytán-Martínez, J. E. (2015). Responses to peginterferon alfa-2a vs alfa-2b plus ribavirin in a Mexican population with chronic hepatitis C. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(03), Article 03.
<https://doi.org/10.3855/jidc.5284>
- Scheel, T. K. H., & Rice, C. M. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature medicine*, 19(7), 837–849. <https://doi.org/10.1038/nm.3248>
- Schuermans, W., Orlent, H., Desombere, I., Descheemaeker, P., Van Vlierberghe, H., Geerts, A., Verhelst, X., Reynders, M., & Padalko, E. (2016). Heads or Tails: Genotyping of Hepatitis C Virus

- Concerning the 2k/1b Circulating Recombinant Form. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1384. <https://doi.org/10.3390/ijms17091384>
- Sedeño-Monge, V., Laguna-Meraz, S., Santos-López, G., Panduro, A., Sosa-Jurado, F., Jose-Abrego, A., Meléndez-Mena, D., Muñoz-Ramírez, M. A., Cosme-Chávez, M., & Roman, S. (2021). A comprehensive update of the status of hepatitis C virus (HCV) infection in Mexico—A systematic review and meta-analysis (2008–2019). *Annals of Hepatology*, 20, 100292. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2020.100292>
- Sesmero, E., & Thorpe, I. F. (2015). Using the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase as a Model to Understand Viral Polymerase Structure, Function and Dynamics. *Viruses*, 7(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/v7072808>
- Stefano, M. D., Faleo, G., Mohamed, A. M. F., Morella, S., Bruno, S. R., Tundo, P., Fiore, J. R., & Santantonio, T. A. (s/f). *Resistance Associated Mutations in HCV Patients Failing DAA Treatment*.
- Steinmann, E., & Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C Virus P7—A Viroporin Crucial for Virus Assembly and an Emerging Target for Antiviral Therapy. *Viruses*, 2(9), 2078–2095. <https://doi.org/10.3390/v2092078>
- Susser, S., Dietz, J., Schlevogt, B., Zuckerman, E., Barak, M., Piazzolla, V., Howe, A., Hinrichsen, H., Passmann, S., Daniel, R., Cornberg, M., Mangia, A., Zeuzem, S., & Sarrazin, C. (2017). Origin, prevalence and response to therapy of hepatitis C virus genotype 2k/1b chimeras. *Journal of Hepatology*, 67(4), 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.027>
- Tabata, K., Neufeldt, C. J., & Bartenschlager, R. (2020). Hepatitis C Virus Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(3), a037093. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037093>
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E., & Rice, C. M. (2004). The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48576–48587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407787200>

- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145–154.
<https://doi.org/10.1002/bmb.20461>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yin, C., Goonawardane, N., Stewart, H., & Harris, M. (2018). A role for domain I of the hepatitis C virus NS5A protein in virus assembly. *PLOS Pathogens*, 14(1), e1006834.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006834>
- Yusuf, D., Davis, A. M., Kleywegt, G. J., & Schmitt, S. (2008). An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48(7), 1411–1422. <https://doi.org/10.1021/ci800084x>
- Zubkin, M. L., Shchepetkova, G. S., Balkarova, O. V., Chervinko, V. I., & Kryukov, E. V. (2019). Successful Hepatitis C Virus Eradication in a Hemodialysis Patient With 2k/1b Chimera Genotype: A Case Report and Literature Review. *Gastroenterology Research*, 12(3), 176–180.
<https://doi.org/10.14740/gr1171>
- Алексеевич, А. И., Д.и, Т., А.р, М., & М.к, И. (2021). ВЫЯВЛЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ RF1_2K/1B ВИРУСА ГЕПАТИТА С В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ. *Клиническая лабораторная диагностика*, 66(2), Article 2.

ANEXOS

Extracción de ARN viral de muestras de pacientes con VHC

La extracción del ARN obtenido de las muestras de suero de los pacientes fue realizada con el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, No. de catálogo 52904) siguiendo la metodología del fabricante como se muestra a continuación.

1. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml se adicionaron 560 μ L de buffer AVL con 5.6 μ L de carrier RNA.
2. Se adicionaron 140 μ L de plasma al buffer AVL del paso 1 y mezclar por vortex durante 15s.
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugar brevemente.
4. Adicional 560 μ L de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar por vortex durante 15 segundos y centrifugar brevemente.
5. Con cuidado colocar 630 μ L de la solución preparada previamente en el paso 5 en la columna QIAamp mini con un tubo colector de 2 ml. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo colector y descartar el tubo colector que contiene el filtrado. Repetir el proceso de centrifugado solo si el volumen de la mezcla inicial fue mayor a 630 μ L.
6. Con cuidado abrir la tapa de la columna y adicionar 500 μ L de buffer AW1. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Con cuidado colocar la columna en un nuevo tubo colector y descartar el tubo con el filtrado.
7. Con cuidado abrir la tapa de la columna y adicional 500 μ L de buffer AW2. Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima (20,000xg; 14,000 rpm) por 3 minutos.
8. Recomendación: Colocar la columna en un nuevo tubo colector, y descartar el tubo anterior con el filtrado. Centrifugar nuevamente a velocidad máxima por 1 minuto.

9. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga nuevo y estéril de 1.5 ml. Descartar el tubo colector anterior. Con cuidado abrir la columna y adicionar 60 μ L de buffer AVE a temperatura ambiente. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
10. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.
Una simple elución con 60 μ L de buffer AVE es suficiente para alcanzar una eficiencia del 90% del ARN viral. Para aumentar en un 10% la eficiencia, puede realizarse una doble elución usando 2 x 40 μ L de buffer AVE.

Nota: El ARN obtenido, fue almacenado a -80°C para su uso posterior.

Obtención de ADN a partir de ARN viral por retrotranscripción (RT)

La síntesis de la primera hebra de cDNA a partir de molde de ARN monocatenario mediado por una transcriptasa reversa (RT). El ARN utilizado para la obtención de ADN fue obtenido previamente a partir de muestras de plasma de los pacientes con VHC. Las muestras utilizadas fueron la (nombre de las muestras)

La obtención del ADN complementario fue obtenida con ayuda del kit comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, No. de catálogo M7502) siguiendo las especificaciones del fabricante, los reactivos fueron colocados en un tubo estéril libre de nucleasas y agregando en el orden que se muestra en la Tabla 11.

TABLA 11. COMPONENTES PARA LA OBTENCIÓN DE ADN A PARTIR DE ARN MEDIANTE KIT

Componentes	Volumen
ARN molde	8 μ L
Oligos iniciadores	1 μ L

Agua (libre de nucleasas)	3 μ L
Buffer 5X	4 μ L
Iniciador de RNasa RiboLock (20U/ μ L)	1 μ L
Mezcla de dNTP's 10 nM	2 μ L
Rever Aid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptasa (200 U/ μ L)	1 μ L
Volumen final	20 μ L

Genotipificación del VHC por RFLP

La determinación de la genotipificación de los pacientes se realizó mediante la restricción enzimática del fragmento de 251 pb mediante la acción de las enzimas de restricción *MvaI* (Fermentas) / *HinFI* (Promega) y *ScrFI* (BioLabs). Para cada una de las enzimas fue utilizado un amortiguador, temperatura y tiempo adecuados.

Para la reacción realizada con las enzimas *MvaI* / *HinFI* las cuales buscan diferencias entre los genotipos 1 a 6, cortando en las secuencias CCAGG y CCTGG destacando la diferencia entre los genotipos 1 y 6 y 2 y 5 respectivamente con la enzima *MvaI*; la secuencia GAATC para la identificación del genotipo 3 y 4 mediante la enzima *HinFI*, fueron utilizados los reactivos como se muestra conforme a la Tabla12. La temperatura de incubación fue de 37°C durante 16 horas.

TABLA 12. COMPONENTES PARA LA REALIZACIÓN DE LA GENOTIPIFICACIÓN POR FRLP.

Componentes	Volumen
Agua desionizada	9.3 μ L
Buffer Tango 10X	2.0 μ L
BSA acetilada	0.20 μ L
<i>Mva</i> I 10u/ μ L	0.50 μ L
<i>Hin</i> FI 10 u/ μ L	0.50 μ L
cADN 251 pb	7.5 μ L
Volumen final	20 μ L

Para la reacción con la enzima *Scr*FI la cual corta con las secuencias CCAGG, CCGGG y CCCGG buscando diferenciar entre los subtipos 2a, 2b y 3a, 3b, utilizando los reactivos como se indica en la tabla 13, con una temperatura de incubación de 37°C por un periodo de 16 horas.

TABLA 13. REACCIÓN DE GENOTIPIFICACIÓN POR RFLP CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *SCR*FI.

Componentes	Volumen
Agua desionizada	10 μ L

Buffer 4	2.0 μ L
<i>ScrFI</i> 10u/ μ L	0.50 μ L
cADN 251 pb	7.5 μ L
Volumen final	20 μ L

Los productos de restricción enzimática fueron visualizados en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% con amortiguador TAE 1X a 80 V por 50 minutos con SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, No. de catálogo S33102)

Listado de reactivos

Buffer TAE 50X

REACTIVOS
Tris
Acetato
EDTA

Nota: El buffer TAE fue utilizado al 1X