



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

TRABAJO REALIZADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION DE
INMUNOLOGIA E INFECTOLOGIA, DEL CENTRO MEDICO
NACIONAL "LA RAZA" DEL INSTITUTO MEXICANO DEL
SEGURO SOCIAL

**RELACION DE LA PROTEINA NS3 (HELICASA) Y
LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CONTRA EL
VIRUS DE LA HEPATITIS C**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA

RAMOS MARTINEZ GISELA



DIRECTOR: DRA. GLORIA MA. CALDERON RODRIGUEZ

ASESOR: Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO

MEXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Investigación de Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social por las facilidades para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gloria Ma. Calderón Rodríguez directora de este trabajo por haberme permitido ser parte de esta investigación y por su asesoría.

A la Dra. Ma. de la Luz Martínez Rodríguez y a la A. L. Virginia Córdoba Mendoza por sus enseñanzas, su apoyo en el trabajo experimental y por su amistad.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi hija Eratzin Ileri quien ha sido el motor que me ha impulsado para lograr mis objetivos, y espero pequeña mía que esto te sirva como aliciente en tu vida para saber que puedes lograr todo lo que te propongas sin importar cuantas sean las adversidades y que en tu vida puedes crecer como Madre, como Esposa, como Profesionista pero ante todo se una gran mujer.

A mis padres por darme la vida y las herramientas para salir adelante, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles; a ti mamá te agradezco por ser mi amiga y por tus consejos que me ayudaron a seguir cuando creía ya no poder, gracias por confiar en mí aun cuando todo era oscuro. Y a ti papá gracias por tus consejos y tus muchos regaños que me sirvieron para dar lo mejor de mí, para sacar el coraje y la entereza.

A mis hermanos Adrián y Roberto con quienes he compartido mis alegrías y tristezas, gracias por su ayuda y su apoyo, sin los cuales no hubiera podido lograrlo.

TABLA DE CONTENIDO.

1. ABREVIATURAS	
2. RESUMEN	1
3. INTRODUCCION	2
4. MARCO TEORICO	4
4.1 Generalidades del Virus de la Hepatitis C	4
4.2 Ciclo de replicación	6
4.3 Hepatitis C	7
3.3.1 Vía de Transmisión	7
3.3.2 Manifestaciones clínicas	8
3.3.3 Diagnóstico y Tratamiento	8
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
6. OBJETIVOS	11
6.1 Objetivo general	11
6.2 Objetivos particulares	11
7. HIPÓTESIS	12
8. DISEÑO EXPERIMENTAL	13
8.1 Tipo de estudio	13
8.2 Población de estudio	13
8.3 Criterios de inclusión	13
8.4 Criterios de exclusión	14
8.5 Material y equipo	14
9. DIAGRAMA DE FLUJO	15
10. METODOLOGÍA	16
10.1 Pacientes	16
10.2 Obtención de plasma	16
10.3 Aislamiento de RNA viral a partir del plasma	16

10.4 Síntesis de cDNA	17
10.5 Técnica de PCR	17
10.6 Purificación de los fragmentos de PCR a partir de geles preparativos	19
10.7 Cuantificación de DNA por espectrofotometría	20
10.8 Secuenciación	20
10.9 Análisis de las secuencias	21
11. RESULTADOS	22
11.1 Porcentaje de similitud de los 11 VHC aislados de pacientes respondedores y pacientes no respondedores, con respecto a la cepa de referencia HCV-JT	22
11.2 Alineación de 11 VHC aislados de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con INF α contra la cepa HCV-JT en bases	24
11.3 Alineación de 11 VHC aislados de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con INF α contra la cepa HCV-JT en aminoácidos	26
11.4 Alineación de 10 VHC aislados de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con INF α contra la cepa HCV-JT en aminoácidos	27
11.5 Alineación de los 11 VHC aislados de pacientes respondedores y no respondedores en aa comparados con HCV-JT	29
11.6 Alineación de los 11 VHC aislados de pacientes respondedores y pacientes no respondedores en aminoácidos comparados con la cepa consensus	30
11.7 Alineación de VHC aislados en aa de pacientes que mantienen el ORF comparados contra cepa HCV-JT y cepa consensus	31
11.8 Alineación de los 3 VHC aislados que pierden su ORF contra HCV-JT y cepa consensus	34
11.9 Alineación de VHC aislados de pacientes respondedores al tratamiento con INF α comparados con HCV-JT y cepa consensus	35
11.10 Alineación de VHC aislados de pacientes que no responden al tratamiento con INF α contra HCV-JT y cepa consensus	36
11.11 Alineación de pacientes respondedores y pacientes no respondedores al tratamiento con INF α contra cepa consensus	37

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
13. CONCLUSIONES	42
14. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	43
15. ANEXO	44
16. BIBLIOGRAFÍA	46

1. ABREVIATURAS

aa	aminoácido
°C	grados centígrados
ER	retículo endoplásmico
HCV	Virus Hepatitis C
INF α	interferón alfa
INF-PEG	interferón pegilado
ISDR	región de sensibilidad al interferón
mM	milimolar
μ l	microlitros
μ g	microgramos
ng	nanogramos
NS	proteína no estructural
nt	nucleótido
ORF	marco de lectura abierto
pb	pares de bases
PCR	reacción encadena de la polimerasa
PKR	proteína cinasa celular R
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SRV	respuesta virológica sostenida
VHC	

2. RESUMEN

El virus de la hepatitis C (VHC) representa uno de los patógenos más importantes para la salud humana y se estima que alrededor de 170 millones de personas en el mundo están infectadas por este virus. El VHC es un virus de RNA altamente dinámico que explota todos los mecanismos conocidos de variabilidad genética para asegurar su supervivencia; ha sido caracterizado en 6 genotipos principales y en varios subtipos siendo el genotipo 1b uno de los más agresivos pues de los pacientes que reciben tratamiento con INF α más ribavirina, sólo el 50% presenta respuesta. Lo cual ha hecho que grupos de investigadores se concentren en estudios donde se asocia la resistencia del virus en dos de sus regiones E2 y NS5 con la respuesta al tratamiento. Sin embargo, pese a los muchos estudios que se han hecho en estas regiones del virus, las conclusiones a las que se han llegado son controversiales.

Actualmente, estudios han reportado que la región NS3 del VHC puede ser un blanco importante para el desarrollo de nuevos fármacos en pacientes que no responden al tratamiento. Sin embargo, no se ha determinado si la región NS3 del VHC participa activamente en la falta de respuesta al tratamiento; el presente trabajo se basó en las diferencias que se presentan en la región NS3 del VHC genotipo 1b y su relación con la respuesta al tratamiento con INF α más ribavirina; se trabajó con el plasma de 11 pacientes, 5 respondedores y 6 no respondedores al tratamiento convencional, de los cuales se secuenció la región NS3 helicasa y se comparó con el virus HCV-JT. Encontrando mutaciones de aminoácidos que corroboran la variabilidad genómica que presenta el virus de la hepatitis C y su capacidad para soportar éstos cambios sin que se afecte su infectividad. No obstante, las diferencias entre los aislados virales de esta región no son suficientes para determinar si estas variabilidades tienen que ver con la respuesta al tratamiento. Solo nos habla de diferencias entre los virus mexicanos con respecto a la cepa japonesa pero no muestra cambios que pudieran relacionarse con la respuesta al tratamiento mediada por NS3 helicasa.

3. INTRODUCCIÓN

Actualmente la hepatitis viral C se considera una de las infecciones virales crónicas de mayor prevalencia en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud, estima que alrededor del 3% de la población mundial ha sido infectada con el virus de la hepatitis C (VHC) y que aproximadamente 170 millones de personas (1) son portadores crónicos (el 20-40% de estos individuos progresarán hacia cirrosis y de estos el 4% hacia hepatocarcinoma) (2, 3, 4, 5). Las áreas de alta prevalencia incluyen los países del Lejano Oriente, la cuenca Mediterránea y ciertas áreas de África (6) y, Europa Oriental (3). En Estados Unidos se estima que 2.7 millones de personas son portadores del virus (7), mientras que en Francia hay alrededor de 600 000 y en España existen entre 300 000 y 800 000 personas infectadas (2,8).

En México se han realizado estudios de prevalencia en grupos seleccionados de la población por ejemplo entre 1994-1998 en el Banco de Sangre del Hospital Médica Sur se determinó la prevalencia del VHC en 9099 donadores, encontrando un 0.47% de portadores del VHC (8). De 1995 a 1998 en Jalisco se analizó a 3904 donadores de dos bancos de sangre y se encontró una prevalencia del VHC de 0.35%. En un estudio realizado en 511 115 donadores del Banco Central de Sangre del CMN Siglo XXI de 1995 al 2002, se encontró una prevalencia del VHC del 0.31% (9) y más recientemente en un estudio realizado en el 2004 en el Banco Central de Sangre del CMN La Raza hubo una prevalencia del 0.195% en 5105 donadores (10).

Recientemente en el 2007 se hizo un estudio para determinar la prevalencia de los genotipos del VHC en un grupo que incluyó 421 pacientes con anticuerpos C positivos, tomados de 22 hospitales de 10 estados de la República Mexicana: Ciudad de Culiacán, Torreón, Monterrey, Ciudad Obregón, Tijuana, Ciudad de México, Guadalajara, León, Puebla y Veracruz. En donde se encontró una prevalencia del 70.55% para el genotipo 1, del cual el 40.1% correspondió al genotipo 1b, 17.81% al 1a y 11.64% para el genotipo 1b/1^a; el 30% restante tuvieron genotipos diferentes al 1(11). Sin embargo no existen datos sobre la prevalencia por el VHC determinados en grupos extensos de población abierta.

La susceptibilidad al VHC es general en los humanos ya que todavía no existe vacuna debido a la gran variabilidad genética del virus a nivel de su envoltura (12,13).

El VHC ha sido caracterizado en 6 genotipos principales y en varios subtipos designados con las letras a, b, c, etc. (1) siendo el 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3c los responsables del 90% de infecciones en Europa, USA y Japón; y el genotipo 4 en Egipto (3).

De los pacientes con genotipo 1b que están en tratamiento (INF α más ribavirina) para la infección por el VHC, sólo el 50% de ellos presenta respuesta al tratamiento

(1, 14); lo cual hace necesario buscar nuevas alternativas (15,16). Se ha observado en diversos estudios la vinculación de diferentes regiones del VHC con la resistencia al tratamiento (14).

La NS3 proteasa es esencial para la replicación viral y es uno de los blancos más prometedores para la terapia específica anti-VHC (17), actualmente se están realizando los primeros ensayos en humanos con el inhibidor molecular BILN 2061 que es específico para la proteasa NS3 y está disponible por vía oral (18). Así mismo, el VX-950 es otro inhibidor que está actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento (19).

No se ha determinado si la región NS3 participa activamente en la falta de respuesta al tratamiento, sin embargo dado que puede ser un blanco importante para el desarrollo de nuevos fármacos en pacientes que no responden al tratamiento (20), resulta necesario conocer si esta variabilidad se debe a las diferencias que se presentan en la región NS3 del VHC (21).

Actualmente se habla de que la región E2 presenta una secuencia hipervariable localizada cerca del extremo terminal 5' que parece tener que ver con la resistencia al tratamiento, a través de un mecanismo de síntesis de anticuerpos neutralizantes que probablemente funcionan como señuelo ayudando al virus a escapar del sistema inmune (1) .

Otros estudios relacionan a la región NS5A con la resistencia al tratamiento (14) mediante un mecanismo propuesto a través de la interacción de ISDR (región de sensibilidad al interferón) de NS5A con la PKR (proteína kinasa R) (22,23,1,14).

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Generalidades del Virus de la Hepatitis C.

El VHC pertenece al genero hepacivirus dentro de la familia *flaviviridae* (14, 24), el humano es el único huésped que naturalmente puede ser infectado por el virus, aunque en forma experimental se ha infectado al chimpancé (25,12).

EL VHC es una partícula con un diámetro de 55-65 nm que posee una envoltura lipoproteica con pequeñas proyecciones de aproximadamente 6 nm y con una nucleocápside de probable simetría icosaédrica.

Su genoma esta compuesto por un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de 9500 nucleótidos (nt) aproximadamente, presenta un solo marco de lectura abierta (ORF) que da lugar a una poliproteína precursora de 3010-3033 aminoácidos que posteriormente es procesada por proteasas virales y celulares en 10 diferentes productos, es decir, en 3 proteínas estructurales: la core, E1 y E2; p7 y, 6 proteínas no estructurales: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (4,15,16,26).Figura 1

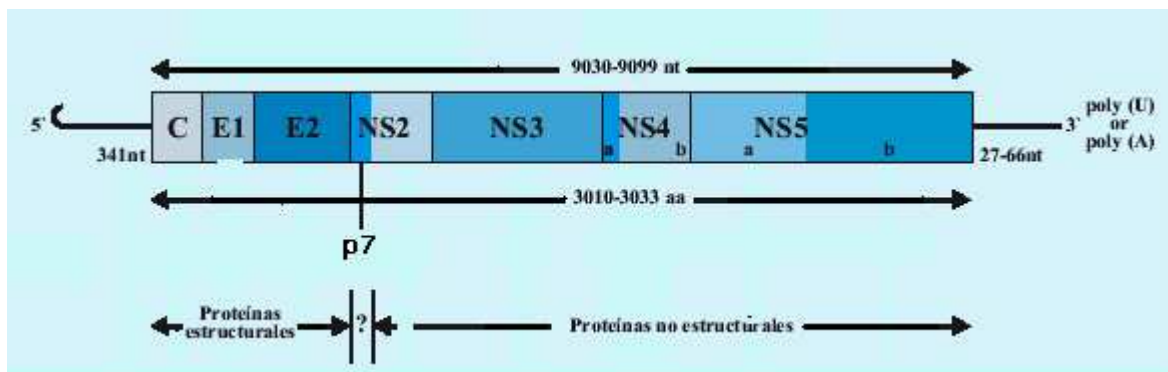


Figura 1. Diagrama del genoma del VHC. Se muestra la ubicación de las proteínas estructurales y no estructurales, así como las dos regiones no codificantes del genoma.

Las proteínas estructurales son C, E1 y E2 y las no estructurales son p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A Y NS5B (15, 27, 1) Figura 1. Las proteínas estructurales forman la cápside viral y sus glicoproteínas, mientras que las proteínas no estructurales son las responsables de la replicación del genoma viral (26,28). Además existen dos regiones no codificantes 5'UTR involucrada en la traducción del genoma viral, la cual presenta un sitio interno denominado IRES que permite la entrada del ribosoma, ahí se encuentra el codon de iniciación AUG y, la 3'UTR involucrada en la replicación y expresión del genoma (27, 1, 28).

La proteína C o core tiene como función principal el ensamble de la nucleocápside, las glicoproteínas E1 y E2 forman la envoltura del virus (28), pero E2 presenta una secuencia hipervariable localizada cerca del extremo terminal 5' que parece tener que ver con la resistencia al tratamiento (1) y, p7 es un canal de iones esencial para la efectividad del VHC.

La NS3 esta formada por dos dominios con actividades enzimáticas distintas: el dominio amino terminal con actividad serina proteasa que se requiere para el procesamiento adecuado de la región que comprende desde NS3 hasta NS5B y el dominio carboxilo terminal con actividad de nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y helicasa esenciales en el proceso de desenrollamiento del RNA durante la replicación (15,26). Figura 2

NS4A es un cofactor que activa a la proteinasa NS3; y NS5A juega un papel importante en la replicación viral (28) y se le ha relacionado con la resistencia al tratamiento con INF α más ribavirina, pero esto es todavía controversial. Y por ultimo la NS5B que es la RNA polimerasa dependiente de RNA esencial para la replicación del virus.

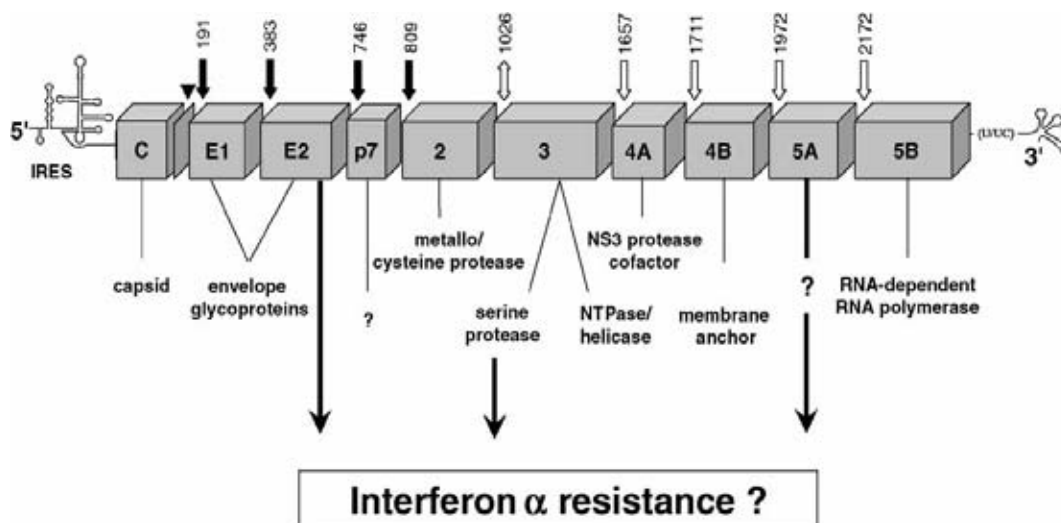


Figura 2. Organización del genoma del VHC. Las flechas negras indican los sitios de corte que se llevan a cabo por las proteasas del huésped y las flechas blancas indican los sitios de corte de las proteasas virales. Las proteínas E2, NS3/4A y NS5A se ha sugerido que contribuyen con mecanismos de resistencia al tratamiento con INF α . (14)

4.2 Ciclo de replicación del VHC.

La infectividad del VHC es pH-dependiente y restringida a los hepatocitos; la entrada del virus es a través de un transporte endosomal, un compartimiento de pH bajo y la fusión con la membrana endosomal. Las glicoproteínas E1 y E2 participan en la unión del virus a la célula huésped (29); una vez que el virus ha entrado a la célula y se ha liberado el genoma de RNA viral (30), la región IRES (sitio interno de entrada ribosomal) promueve la traducción de la región codificante para dar lugar a la poliproteína, que es procesada para generar las proteínas maduras, en la membrana del retículo endoplásmico (ER) de la célula. De ellas, la proteína NS5B, al presentar actividad RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp); es la pieza central de la maquinaria replicativa que usa el genoma viral como molde para la transcripción de una molécula de RNA complementaria de cadena negativa. La cadena negativa sirve, por su parte, como molde para la síntesis de nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva, que pueden ser empleadas para traducirse, replicarse o bien, empaquetarse en los virus progenie. Figura 3

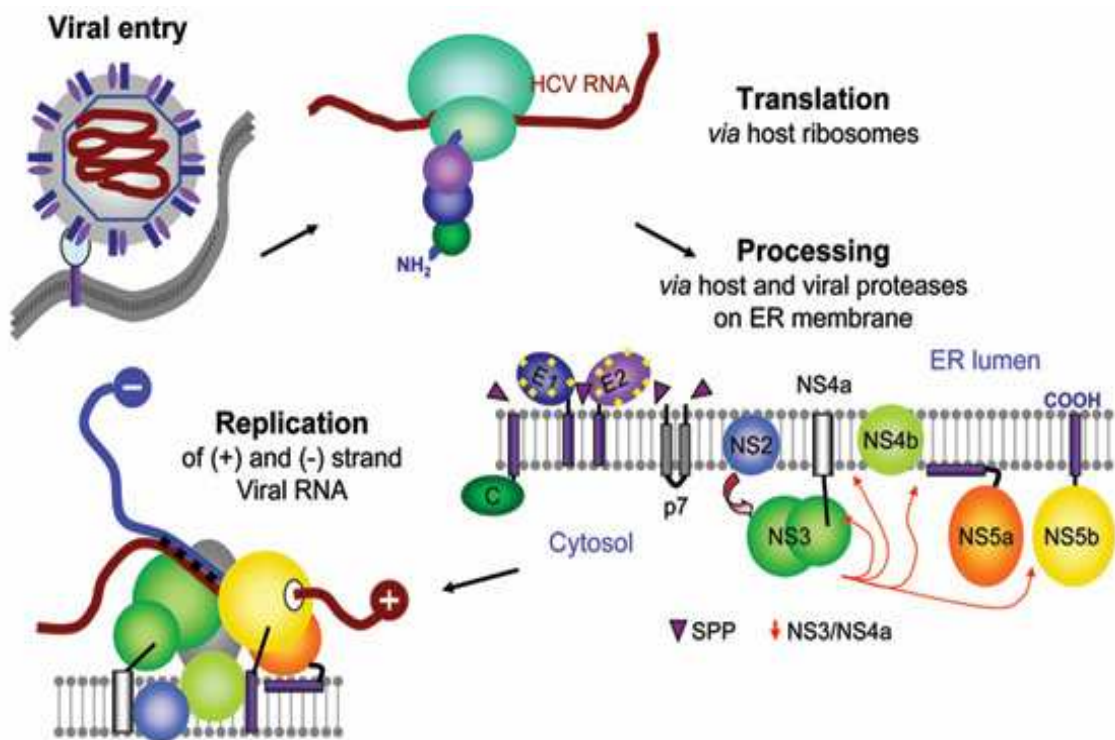


Figura 3. Ciclo de vida del VHC

Finalmente, las proteínas estructurales junto con las copias de RNA son empaquetadas como partículas virales infecciosas y liberadas al medio extracelular a través del aparato secretor de la célula y son capaces de infectar nuevas células (31, 32).

4.3 Hepatitis C.

El virus de la hepatitis C provoca una enfermedad inflamatoria que afecta al hígado causando la destrucción de pequeñas zonas del tejido hepático y esta incluido en el grupo de las hepatitis virales en donde, también se encuentran la hepatitis A, B, D, E y G.

4.3.1 Vía de Transmisión.

La vía de transmisión del virus de la hepatitis C puede darse mediante dos formas, ya sea por vía parenteral ó por vía no parenteral. La vía de transmisión parenteral es la principal fuente de contagio en la hepatitis C y puede ser por:

- Transfusiones (hepatitis postransfusionales) aunque la determinación de anti-VHC en donaciones sanguíneas ha disminuido el riesgo.
- Hemodiálisis con una prevalencia del 20% en donde el número de transfusiones y el tiempo de hemodiálisis es proporcional a la probabilidad de adquirir la infección.
- Adicción a drogas parenterales que es la primera causa de infección en adultos jóvenes generalmente al compartir jeringuillas.
- Transplante de órganos
- Tatuajes, acupuntura, pendientes, piercing (2, 3, 33).

Entre las no parenterales se describen:

- Vertical que acontece de madre a hijo durante el parto, aunque es rara y ocurre en un 5% de mujeres con elevada viremia y en un 20% de aquellas que también están coinfectadas con el VIH debido a un incremento de la carga viral del VHC a consecuencia de la inmunodepresión.
- Sexual, con un riesgo del 5% en prostitutas y varones homosexuales con múltiples parejas (2,3).

4.3.2 Manifestaciones clínicas.

a mayoría de los pacientes con hepatitis crónica están asintomáticos y la enfermedad hepática se identifica al explorarlo por otro motivo, como una revisión de rutina, una enfermedad intercurrente o una donación voluntaria de sangre (2). Entre los pacientes sintomáticos los principales síntomas que presentan son pérdida del apetito, náuseas y vómitos, fiebre, cansancio y fatiga, dolores en articulaciones (25), manchas en la piel, orina oscura (coluria) e ictericia (ojos y piel amarillentos) (2, 3, 34).

4.3.3 Diagnóstico y Tratamiento.

El diagnóstico de la infección por VHC es fundamentalmente virológico. Se basa en la detección de anticuerpos anti-VHC mediante un test ELISA (34), o de forma cuantitativa y cualitativa, determinando la presencia de RNA del VHC mediante técnicas de PCR y mediante biopsia hepática (2, 33).

El tratamiento sugerido para tratar la enfermedad ha ido modificándose a través de los años, primero en 1986 al comunicarse que la administración de interferón alfa ($INF\alpha$) contra el VHC podría inducir cambios sustanciales, se empezó a utilizar el $INF\alpha$ (28) pero los resultados de la monoterapia (3-5 millones de unidades MU 3 veces por semana durante 6-12 meses) fueron decepcionantes, pues sólo el 50% de los pacientes respondían y de estos un 15-20% se mantenían. Por lo que en la actualidad sólo se utiliza esta terapia para pacientes con contraindicaciones para recibir ribavirina.

La ribavirina es un nucleósido sintético, hidrosoluble con aceptable biodisponibilidad por vía oral, con actividad antiviral pero por si sola no modifica significativamente las concentraciones de RNA-VHC en el suero (36), sin embargo, al administrarla simultáneamente con $INF\alpha$ ($INF\alpha$ 3 MU 3 veces por semana y 1000-1200mg de ribavirina fraccionada en 2 tomas diarias por 24 o 48 semanas) se observó que aumentaba la efectividad del tratamiento, mismo que actualmente se administra (34, 37, 19).

Posteriormente el $INF\alpha$ -PEG que es muy estable y que a diferencia del $INF\alpha$ sólo que tiene amplios períodos de ventana en donde casi no existe $INF\alpha$ y el virus puede replicarse; presenta una eliminación lenta, en donde se consiguen concentraciones prolongadas de entre 140 y 170 horas (alrededor de una semana) con efectos secundarios similares a los observados con $INF\alpha$ (38). Por lo que la terapia combinada de $INF\alpha$ -PEG 180 μ g/kg/semana más 800mg de ribavirina ha proporcionado mejores resultados.

No obstante la utilización de INF en monoterapia proporciono información acerca de los tipos de respuesta al tratamiento y de los factores predictivos de la respuesta a este (2). Tabla 1.

Tabla 1. Factores predictivos de respuesta al tratamiento con INF.

Buena respuesta:	Mala respuesta:
Infección por VHC genotipo 2 o 3 Baja viremia Fibrosis hepática ausente o moderada Edad menor de 40 años Sexo femenino Transaminasas elevadas	Infección por VHC genotipo 1 o 4 Viremia elevada Fibrosis hepática marcada o cirrosis Raza negra Edad más avanzada

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aproximadamente 170 millones de personas en el mundo están infectadas por el VHC y de los pacientes que están en tratamiento (INF α más ribavirina), el 50% de ellos no presentan respuesta a dicho tratamiento; lo cual se ha asociado principalmente al genotipo 1b.

No se ha determinado si la región NS3 participa activamente en la falta de respuesta al tratamiento, pero se ha reportado que puede ser un blanco importante para el desarrollo de nuevos fármacos en pacientes no respondedores. Por lo que resulta necesario conocer si la respuesta al tratamiento con INF α en los pacientes, se debe a las diferencias que se presentan en la región NS3 del VHC. ¿Es importante conocer la variabilidad genética en la región NS3 del VHC para determinar el tratamiento en los pacientes VHC-infectados?

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Secuenciar la región que codifica para el extremo carboxilo de la proteína NS3 del VHC y determinar si la variabilidad genética está relacionada con la respuesta al tratamiento por el INF α más la ribavirina.

6.2 Objetivos Particulares

Realizar la técnica de PCR (1ª y 2ª PCR) para la región estudiada de NS3.

Secuenciar los fragmentos obtenidos a partir de los productos de PCR para la región carboxilo de NS3.

Analizar las secuencias para determinar la variabilidad genética de la región NS3 (helicasa) de pacientes respondedores (PR) y pacientes no respondedores (PNR) al tratamiento.

7. HIPÓTESIS

La variabilidad genética de la región NS3 del virus de la hepatitis C modifica la actividad de la helicasa e induce que la respuesta del paciente al tratamiento por el $\text{INF}\alpha$, disminuya su efectividad

8. DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1 Tipo de estudio

Experimental, retrolectivo y transversal.

8.2 Población de estudio

- a) Pacientes infectados con VHC genotipo 1b que respondan al tratamiento convencional con INF α y ribavirina.
- b) Pacientes infectados con el VHC genotipo 1b que no respondan al tratamiento con INF α y ribavirina

Entendiendo por paciente respondedor aquel individuo con hepatitis C que no tiene RNA del VHC detectable, que presenta una disminución de la alanin amino transferasa (ALT) sérica dentro de los límites de referencia normales y una disminución de dos unidades en el índice de Knodell, después de haber terminado su esquema de tratamiento con dosis de 3 millones de unidades de INF α -2b lunes, miércoles y viernes y 400 mg de ribavirina cada 8 horas durante un año.

Y por paciente no respondedor aquel individuo con hepatitis C que después del tratamiento con dosis de 3 millones de unidades de INF α -2b, lunes, miércoles y viernes y 400 mg de ribavirina cada 8 horas durante un año, muestra RNA de VHC detectable y una elevada ALT sérica durante el curso de la terapia, así como ninguna mejoría en el daño hepático.

8.3 Criterios de inclusión

Se seleccionaron para el estudio los plasmas de pacientes que cumplieron con:

- Pruebas de ELISA (EIA-3) para el VHC positivas
- Antígenos codificados por el virus de Hepatitis C (RIBA) positivos
- Hepatitis C crónica activa, determinada por biopsia
- Ausencia de anticuerpos y antígeno contra Hepatitis B
- Que no presentaron anticuerpos antinucleares
- Virus de hepatitis C genotipo 1b
- Que fueron tratados con INF α y ribavirina en dosis de 3 millones de INF α -2b lunes, miércoles y viernes y 400 mg de ribavirina cada 8 horas durante un año.

Las muestras de los pacientes fueron tomadas en el período que comprende de 2002-2003.

8.4 Criterios de exclusión

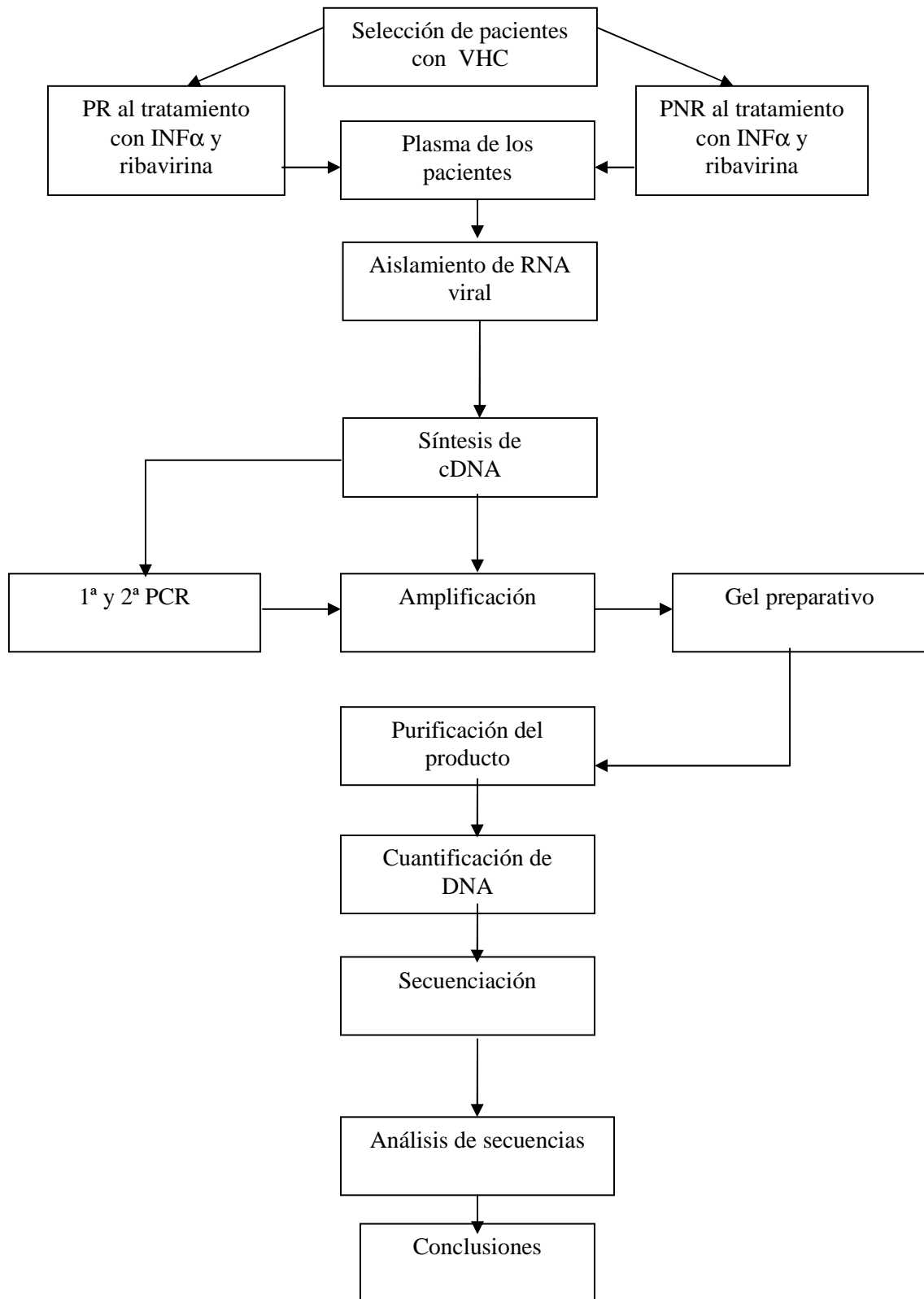
Fueron excluidos todos aquellos pacientes que presentaron alguno de los siguientes criterios:

- Alcoholismo
- Adicción a drogas hepatotóxicas
- Que no terminaron el tratamiento
- Respondedores o no respondedores con genotipos diferentes al 1b

8.5 Material y equipo

- Plasma de pacientes respondedores
- Plasma de pacientes no respondedores
- Microcentrifuga. MicroCentrifugette 4214-V1, No. Serie 059-0255
- Centrifuga clínica, HERMLE Labortechnik Z 233 MK-2, No. Serie 52000090
- Balanza analítica, Denver Instrument Company M-220, No. Serie P 0103879
- Eppendorf Vacufuge, Netheler Linz GMBH, No. Serie 5301 01176
- Cámara de electroforesis, Horizon 58. GIBCO BRL Horizontal Gel, Electrophoresis Apparatus. No. Serie 00228053
- Transiluminador, Kodak EDAS 290 GVM30, serie SYGV/2597 SYNGENE Adivision of the synoptics
- Termociclador, Biometra T Gradient Thermoblock, No. Serie I 409220
- Pipetas Finnpiette, ThermoLabsystems
- Tubos con EDTA, BD Franklin Lakes NJ USA 5ml BD Vacutainer K3 EDTA 9 mg
- Ultra congelador REVCO, Termo Electron Corporation ULT 1786 -3-A40, No. Serie N 11 S-236780-NS
- Tubos eppendof

9. DIAGRAMA DE FLUJO



10. METODOLOGÍA

10.1. Pacientes

De cada uno de los pacientes seleccionados en el Hospital de Infectología CMN “La Raza”, que cumplieron con los criterios de inclusión antes mencionados; se obtuvieron muestras de sangre, por punción venosa, en tubos con EDTA como anticoagulante para posteriormente obtener el plasma. Cabe señalar que este estudio fue realizado a ciegas por lo que los tubos se etiquetaron con números sin anotarles a que grupo pertenecían y con este número se trabajo hasta el análisis de resultados.

10.2. Obtención de plasma

Los tubos con las muestras de sangre se centrifugaron en una centrifuga clínica (HERMLE Labortechnik Z 233 MK-2, No. Serie 52000090) a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C para obtener el plasma que se almacenó en alícuotas de 500 µl a -80°C en un ultra congelador REVCO.

Se trabajo con el plasma de 11 pacientes que fueron positivos para EIA-3 y RIBA, y que además presentaban el genotipo 1b.

10.3. Aislamiento de RNA viral a partir del plasma.

Para el aislamiento de RNA se utilizó el estuche “QIAmp Viral RNA Mini” de la marca QIAGEN, utilizando columnas de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 1.- Pipetear 500 µl de regulador AVL, al que previamente se le adiciona el acarreador de RNA, en un tubo eppendorf de 1.5ml
- 2.- Añadir 140 µl de plasma del paciente, descongelado a temperatura ambiente.
- 3.- Agitar durante 20 seg. en el vortex con el fin de liberar el RNA de la cápside, dejar incubar en reposo por 10 minutos.
- 4.- Añadir 560 µl de etanol absoluto, mezclar durante 15 seg., centrifugar brevemente para eliminar el líquido de la tapa.
- 5.- Colocar 630 µl de la solución en una columna, centrifugar un minuto a 8000 rpm en una microcentrifuga* a temperatura ambiente.
- 6.- Desechar el tubo que contiene el filtrado y sustituirlo por un tubo limpio.
- 7.- Repetir el paso anterior hasta que toda la solución sea filtrada.
- 8.- Lavar la columna con 500 µl de regulador W1, centrifugar a 8000 rpm durante un minuto.
- 9.- Lavar con 500 µl de regulador W2 y centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos.

- 10.- Colocar la columna en un tubo limpio y repetir la centrifugación.
- 11.- Eluir el RNA con 40 µl de agua inyectable, centrifugar a 8000rpm un min y recolectar la solución en un tubo limpio.
- 12.- Repetir el paso anterior, el RNA obtenido se almaceno a -80°C.

*Todas las centrifugaciones se realizaron en una microcentrifuga MicroCentrifugette 4214-V1, No. Serie 059-0255.

10.4. Síntesis de cDNA

La síntesis del cDNA se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MV RT de la marca Promega:

- 1.- Colocar en un tubo de PCR 16 µl del RNA del paciente y 1 ml de iniciadores universales (hexanucleotidos 10X Roche)
- 2.- Incubar a 60°C por 5 minutos
- 3.- Añadir 8 µl de la siguiente mezcla:
5 µl de regulador de enzima 5X
1 µl de dNTP 10mM (Promega)
1 µl de inhbidor deRNAsa (Promega)
1 µl de enzima M-MV-RT (Promega)
- 4.- Incubar a 37°C por 1 hora
- 5.- Guardar el cDNA a -20°C hasta su uso

10.5. Técnica de PCR

Se realizo la técnica de PCR con la enzima Taq polimerasa y los iniciadores 7 sentido (5'-atatgtgatgaatgccactca-3'), 7 antisentido (5'-tttgaacggctcctagcctgt-3') y 7 nester (5'-gtatgagacacttccacattt-3').

La región amplificada abarca del nucleótido 4268 al 5145 que comprende parte de la secuencia que codifica para la proteína NS3. Las condiciones para la amplificación de la 1ª PCR y PCR semianidada se muestran en las Tablas 2 y 3

Tabla 2. Condiciones para 1ª PCR

Componentes	Volumen μl
Regulador PCR 10X	5
MgCl ₂ 25mM	3
dNTP 10 mM	1
Iniciador 7 sentido	2
Iniciador 7 antisentido	2
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0.2
cDNA	2
Agua	34.8

Tabla 3. Condiciones para PCR semianidada

Componentes	Volumen μl
Regulador PCR 10X	5
MgCl ₂ 25mM	3
dNTP 10 mM	1
Iniciador 7 sentido	2
Iniciador 7 semianidada	2
Taq polimerasa 1 U/ μ l	0.2
1ª PCR	2
Agua	34.8

En ambas PCRs se utilizó el mismo programa:

94°C	11 min
94°C	30 seg
55°C	30 seg
*72°C	60 seg
72°C	3 min
4°C	Pausa
*regresar al paso 2 y repetir 34 ciclos	

Para corroborar que hubo amplificación se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en regulador TBE 1X con bromuro de etidio, y se corrió con TBE 1X a 75 volts; posteriormente se examinaron en un procesador de imágenes.

Una vez lograda la amplificación, la purificación se hizo empleando geles preparativos de agarosa al 1% con bromuro de etidio que se desarrollaron a 60 volts, la banda seleccionada se extrajo cortando la agarosa y purificando el DNA amplificado.

10.6. Purificación de los fragmentos de PCR a partir de geles preparativos.

Se utilizó el equipo de QIAGEN “QIAquick gel extraction” que se basa en la separación por cromatografía de adsorción. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1. Pesar el fragmento de agarosa en un tubo eppendoff.
2. Adicionar 3 volúmenes de regulador QG, por volumen de gel.
3. Incubar a 50°C por 10 minutos (o hasta que el gel se disuelva completamente). Para ayudar a disolver el gel, mezclar en el vortex 2-3 minutos durante la incubación.
4. Una vez disuelto el gel, comprobar que el color de la solución permanezca amarillo.
5. Adicionar a la muestra del gel, un volumen de isopropanol y mezclar.
6. Colocar la columna en un tubo de recolección de 2ml.
7. Agregar 730µl de la muestra a la columna y centrifugar a 10,000rpm durante un minuto.
8. Añadir el volumen restante y repetir el paso anterior hasta terminar con toda la muestra.
9. Añadir 750µl de regulador PE a la columna, centrifugar a 14,000rpm por 3 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante y centrifugar nuevamente a 14,000rpm durante 1 minuto.
11. Eluir con 50µl de agua inyectable, incubar 20 minutos a temperatura ambiente, centrifugar a 10,000rpm durante 10 minutos.
12. Recibir la solución en un tubo eppendoff perfectamente bien etiquetado.
13. Montar un gel de electroforesis para observar la integridad y pureza de la banda.
14. Guardar la muestra a -80°C.

*Todas las centrifugaciones se realizaron en una microcentrifuga MicroCentrifugette 4214-V1, No. Serie 059-0255

10.7 Cuantificación de DNA por espectrofotometría

Se hizo una dilución 1:100 de cada una de las muestras purificadas y se determino la absorbancia a una longitud de onda de 260nm. Para al final tener una concentración de 20ng de DNA por muestra para poder secuenciar.

Todas las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Electrón Corporation.

10.8. Secuenciación.

Las reacciones para la secuenciación cíclica se realizaron utilizando el equipo “ABI Prism Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction” de Applied Biosystems junto con el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo
96°C	10 seg
50°C	5 seg
60°C	4 min

El programa se repite por 25 veces.

El producto obtenido de la PCR de secuenciación se purificó, utilizando columnas “Dye Ex Spin para Dye terminator renewal”, que se basa en el principio de tamices moleculares cuyo procedimiento a continuación se describe:

1. Mezclar suavemente en el vortex las columnas con el gel, para resuspender el mismo.
2. Aflojar un poco la tapa de la columna.
3. Cortar la punta de la columna y colocarla en un tubo de recolección.
4. Centrifugar a 3000rpm por 3 minutos.
5. Agregar cuidadosamente a la columna la solución de PCR de secuenciación, a purificar.
6. Centrifugar a 3000rpm por 3 minutos.
7. Recibir el eluido en un tubo eppendoff limpio.
8. Secar totalmente la muestra por calentamiento a una temperatura de 42°C.

*Todas las centrifugaciones se realizaron en una microcentrifuga MicroCentrifugette 4214-V1, No. Serie 059-0255

10. 9. Análisis de las secuencias

Con las secuencias obtenidas se calculo la similitud que existe entre los virus de cada uno de los pacientes con respecto al HCV-JT (D11168), reportado en el “Genbank” que es un virus perteneciente a una cepa japonesa que ha sido muy estudiada y; con una cepa consensus que es una cepa que el programa MULTALIN proporciona y selecciona de entre muchas cepas que tiene en su base de datos, esta cepa puede provenir de Europa, Asia, América, África etcétera. MULTALIN elige la cepa que tenga mayor similitud con las cepas que se van a analizar. Se utilizó el programa Bioedit versión 5.0.9 y el software: “Multiple sequence alignment with hierarchical clustering”.

11. RESULTADOS

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de similitud de los virus aislados con respecto a la cepa de referencia. En el grupo de pacientes respondedores se encuentran las secuencias 3, 37, 77, 81 y 85; y en el grupo de pacientes no respondedores están las secuencias 1, 4, 10, 11, 15 y 17.

Secuencia	Grupo	% de similitud
1	PNR	97
3	PR	96
4	PNR	94
10	PNR	79
11	PNR	10
15	PNR	88
17	PNR	94
37	PR	51
77	PR	87
81	PR	94
85	PR	85

Tabla 4. Porcentajes de similitud de los 11 VHC aislados de pacientes respondedores (PR) y no respondedores (PNR), con respecto a la cepa de referencia HCV-JT. Estos porcentajes fueron calculados de las secuencias que están en aminoácidos.

A partir del cDNA se obtuvo el producto de PCR que es de un tamaño aproximado de 877pb y en la figura 4 se muestra la electroforesis de los productos de PCR de algunas muestras de pacientes amplificadas.

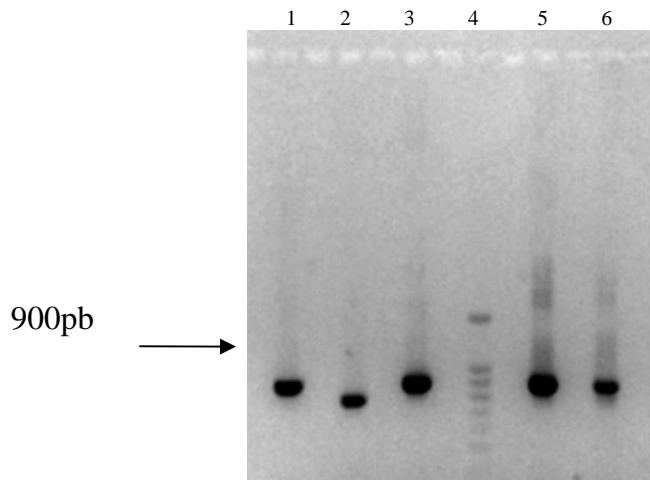


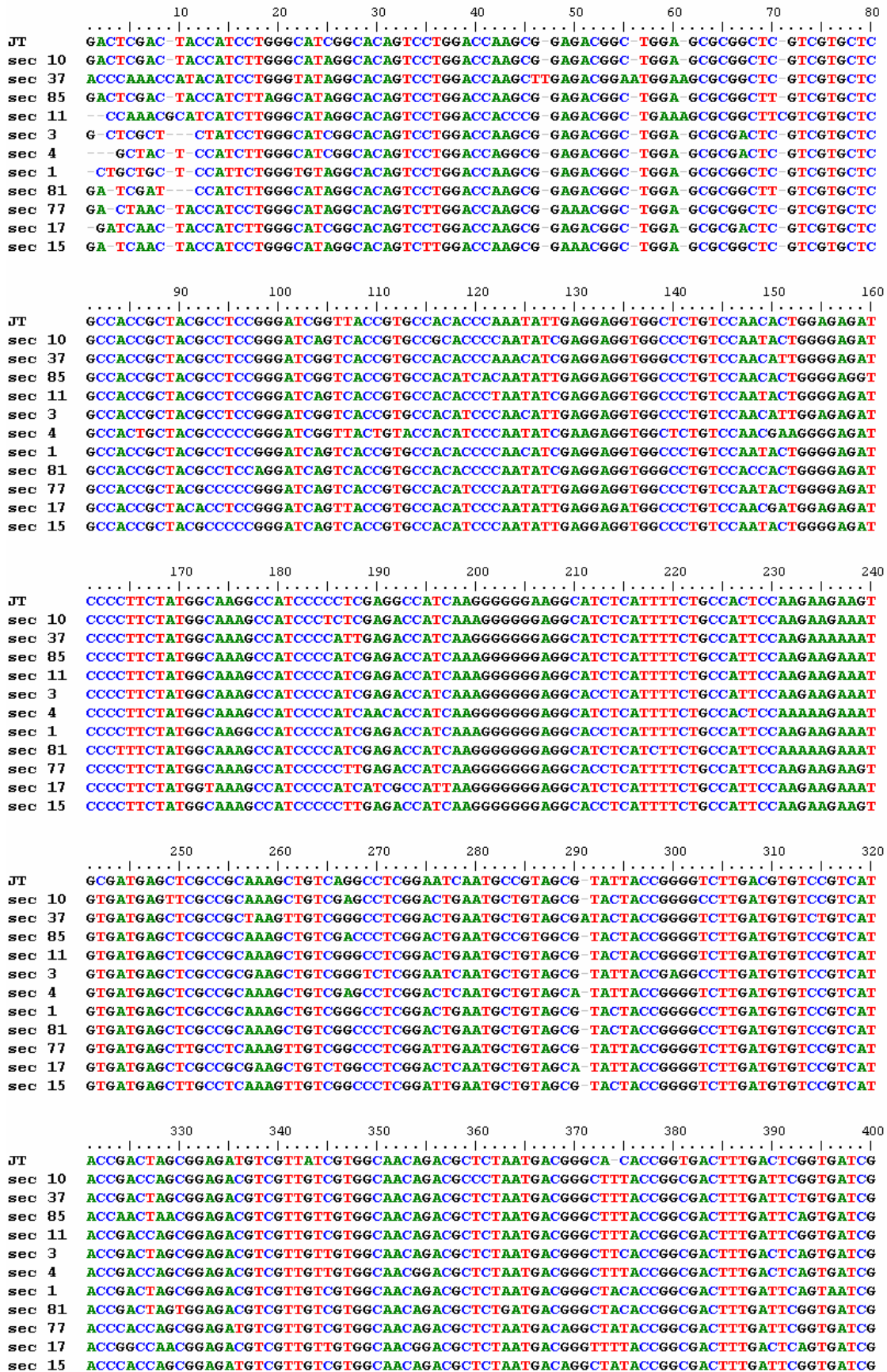
Figura 4. Electroforesis del producto de PCR de la región NS3 helicasa de VHC aislados de pacientes. 1, 2, 3, 5,6 VHC aislados de pacientes y 4 marcador de tamaño molecular de 100pb.

Posteriormente de las 11 muestras que se secuenciaron, se analizaron los electroferogramas de cada una de ellas y por medio del programa Bioedit se alinearon, tanto en bases como en aminoácidos, para compararlas con la cepa prototipo HCV-JT. Como se muestra en las figuras 5 a 7.

Lo mismo se hizo con el programa MULTALIN en donde además, de comparar con la cepa HCV-JT, también se comparo con la cepa concensus. Ver figuras 8 a 14.

En la figura 5 se muestra la alineación en bases de los 11 VCH aislados, comparados con el HCV-JT, Bioedit, en donde cada color corresponde a una base en particular (ver anexo) y nos permite observar la similitud que hay con el HCV-JT a lo largo de toda la región secuenciada, además, de observar aquellos cambios de base que se presentan en cada uno de los virus aislados. Sin embargo, como es sabido la unión de diferentes bases (tripletes) pueden originar un mismo aminoácido (aa), por lo que es en la alineación de aa en donde se observa si estas bases en realidad están originando un cambio en las secuencias que las haga diferir de la cepa prototipo.

Figura 5. Alineación de 11 VHC aislados de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con INF α , contra la cepa HCV-JT en bases.




```

      410      420      430      440      450      460      470      480
JT      . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . |
sec 10  ACTGCAACACATGTGTCACCCAGACAGTCGATTTTCAGCTTGG - TCCCACC - TTCACCATTTGAGACGACGACCGTGCCCCA
sec 37  ACTGCAATACATGTGTCACCCAGACAGTCGATTTTCAGTTTGGACCCACC - TTCACCATTTGAGACGACGACCGTGCCCCA
sec 85  ACTGTAATACATGTGTCACCCAAACAGTCGACTTCAGCTTGGATCCCACC - TTCACCATTTGAGACAAACCCGTGCCCCA
sec 11  ACTGTAATACATGTGTCACCCAAACAGTCGACTTCAGCTTGGATCCCACC - TTCACCATTTGAGACGACGACCGTGCCCCA
sec 3    ACTGCAACACATGTGTCACCCAAACAGTCGATTTTCAGCTTAGACCCACC - TTCACCATCGAGACGACGACCGTGCCCTA
sec 4    ACTGTAACACATGTGTTACCCAGACAGTCGATTTTCAGCTTGGACCCACC - TTCACCATCGAGACGACGACCGTGCCCCA
sec 1    ACTGCAATACATGTGTCACCCAGACAGTCGACTTCAGCTTGGACCCACC - TTCACCATTTGAAACGACGACCGTGCCCCA
sec 81   ACTGTAACACATGTGTCACCCAGACAGTCGACTTCAGCTTGGACCCACC - TTCACCATTTGAGACGACGACCGTGCCCCA
sec 77   ACTGCAACACATGCGTCATCCAGACAGTCGATTTTTCAGCTTGGACCCACC - TTCACCATTTGAGACGACGACCGTGCCCCA
sec 17   ACTGTAATACATGCGTCACCCAGACAGTCGATTTTCAGCTTGGACCCACC - TTCACCATCGAGACAAACCCGTGCCCCA
sec 15   ACTGCAACACATGCGTCATCCAGACAGTCGATTTTTCAGCTTGGACCCACC - TTCACCATTTGAGACGACGACCGTGCCCCA

```

```

      490      500      510      520      530      540      550      560
JT      . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . |
sec 10  AGACGCGGTG - TCGCGCTCACAACGGCGAGGCAAGGACTGGCAGGGGTA - GGGGAGGCATCTACA - GGTTTGTGA - CTCCG
sec 37  AGACGCGGTG - TCGCGCTCACAACGGCGAAGTAAGACTGTTAAGGGCA - AGGCGGGCATCTACAAGGTTTGTGA - CTC - A
sec 85  AGACGCGGTG - TCGCGCTC - CAACGCGGGGTAAGACTGTTAGGGGCA - AGAACGGCATCTACA - GGTTTGTGA - CTCCA
sec 11  AGACGCGGTG - TCGCGCTCACAACGGCGAGGTAAGGACTGTTAGGGGCA - GGGGGGGCATCTACA - GGTTTGTGA - CTCCA
sec 3    AGATGCGGTG - TCGCGCTCACAACGGCGAGGCAAGGACTGTTAGGGGCA - GGAGAGGCATCTACA - GGTTTGTGA - CTCCA
sec 4    AGACGCGGTG - TCACGCTCGCAGCGGGAGGCAAGGACTGTTAGGGGCA - GGATGGGCATCTACA - GGTTTGTGA - CTCCA
sec 1    AGACGCGGTG - TCGCGCTCGCAGCGGGGTAAGGACTGTTAGGGGCA - GGGGAGGCATCTACA - GGTTTGTGA - CTCCA
sec 81   AGACGCGGTG - TCGCGCTCGCAGCGGGAGGCAAGGACTGTTAGGGGCA - GGAAAAGCATCTACA - GGTTTGTGA - CTCCA
sec 77   AGACTCGGTG - TCGCGCTC - CAACGCGGAGGTAAGACTGTTAGGGGCA - GGGGGGGCATCTACA - GGTTTGTGA - CCCC
sec 17   AGACGCGGTG - TCACGCTCGCACAACGGCGAGGCAAGGACTGTTAGGGGCA - GGGGGGGCATCTACA - GGTTTGTGA - CTCCA
sec 15   AGACTCGGTG - TCGCGCTC - CAACGCGGAGGTAAGACTGTTAGGGGCAAGGGGGGGCATCTACAAGGTTTGTGA - CCCC

```

```

      570      580      590      600      610      620      630      640
JT      . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . |
sec 10  GGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTTCTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 37  GGAGAACGGCCCTCGGGTAAGTTTCGATTTCTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 85  AGAAAACGGCCCTCGGG - CATGTTTCGATTTCTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 11  GGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTTCTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 3    GGAGAACGACCCCTCGGGTATGTTTCGATTTCTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 4    GGCAGCGGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTTCTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 1    GGAGAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTTCTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 81   GGAGAACGGCCCTCG - CATGTTTCGATTTCTCGGTCCTGTGTGAGTGTATGACGC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 77   AGAAAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTTCTCGGTCCTTGTGAGTGTATGACCC - GGGCTGTGCTTGGTATGAGCTCA
sec 17   GGAAAACGGCCCTCGGG - CATGTTTCGATTTCTCGG - CTTGTGCGAATGCTATGACCC - GGGTGGGGCTTGGTACCAACTTA
sec 15   AGAAAACGGCCCTCGGGCATGTTTCGATTTTTCGTCCTTTTGTGAGTGTATGACCC - GGGCTTTGCTTTGTACAAACTTA

```

```

      650      660      670      680      690      700      710      720
JT      . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . |
sec 10  CGCCCCGT - GAGACTACAGTCAGG - TTGCGGGCTTACCTGAATACACCA - GGGTTGCCG - TCTGCC - AGGACCATC - TG
sec 37  CCCCCCCCAGAAAACTTTGTAAAG - TTGCGGGCTTACTTAAA - ACACCA - AGGTTGCC - TTTGCC - AAGAACATTTT
sec 85  CGCCCGC - GAGACCTCGGTTAGG - TTGCGG - CTTAC - TAAATACACAA - GGTTCCTC - TGC - CA - AGACCATC - TG
sec 11  CCACCGCC - GAGACCTCAGTTAGG - TTGCGGGCTTAC - TTAATACACAG - GGTTCGCC - TCTGCC - AGACCATC - TG
sec 3    CGCCCTCT - GAGACCTCGGTCAG - CTGCGGGCTTACCTAAATACACCA - GGGTTGCCG - TCTGTC - AGGACCATC - TG
sec 4    CACCCGCC - GAGACCTCGGTTAGG - TTGCGGGCTTACCTAAATACACCA - GGGTTGCCG - TCTGCC - AGGACCATC - TG
sec 1    CGCCCTGCT - GAGACCTCTGTTAGG - ATGCGGGCTTACCTAAATACACCA - GGGTTGCCG - TCTGCCAGGACCATCTT
sec 81   C - CCCGCC - GAAACCTCGGTTAAA - ATGCGG - CTTACCTAAATACACCAAGGCTTGC - TCTGCC - AGGACCATC - TG
sec 77   CCCCCCC - GAGACCAAGTTAG - CTGCGGGCTTACCTAAATACACCA - GGGTTGCCG - TTTGGC - AAGAACATCT - G
sec 17   CACCCCC - AGACCTCGGTCAGG - GTGCGGGCTTACCTAAATACACCAAGGCTTGC - TCTGCC - AGGACCATC - TG
sec 15   CCCCCC - GAGAC - ACAATTTAAA - CTG - GGGCTTAC - TAAATACAC - A - AGGTTGCCG - TTTG - C - AAGAACATCT - G

```

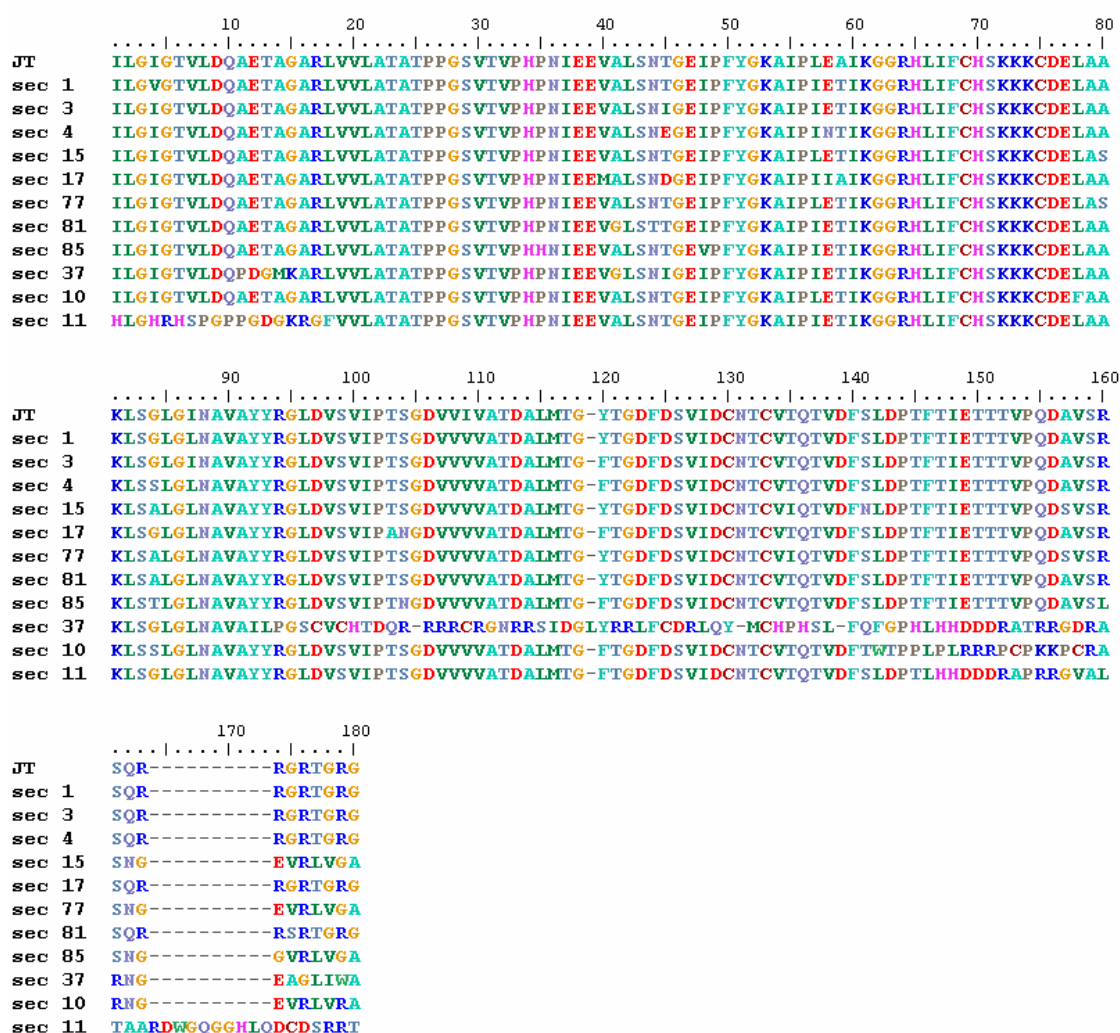
```

      730
JT      . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . |
sec 10  GAGTTCTGGGAAAAGGCTC
sec 37  GAATTTTGGGAAAAGGCTC
sec 85  GAGTTCTG - GGAACGCC
sec 11  GAGT - CTG - GAAAGCGTC
sec 3    GAGTTCTGGGAGAGCGTC
sec 4    GAGTTTGGGAGAGCGTC
sec 1    GAGTTCTGGGAGAGTGTGTC
sec 81   GAGTTCTGGGAAAAGGCTC
sec 77   GAGTTTGGGAAAAGG - T
sec 17   GAGTTTGGGAAAAGGCTC

```

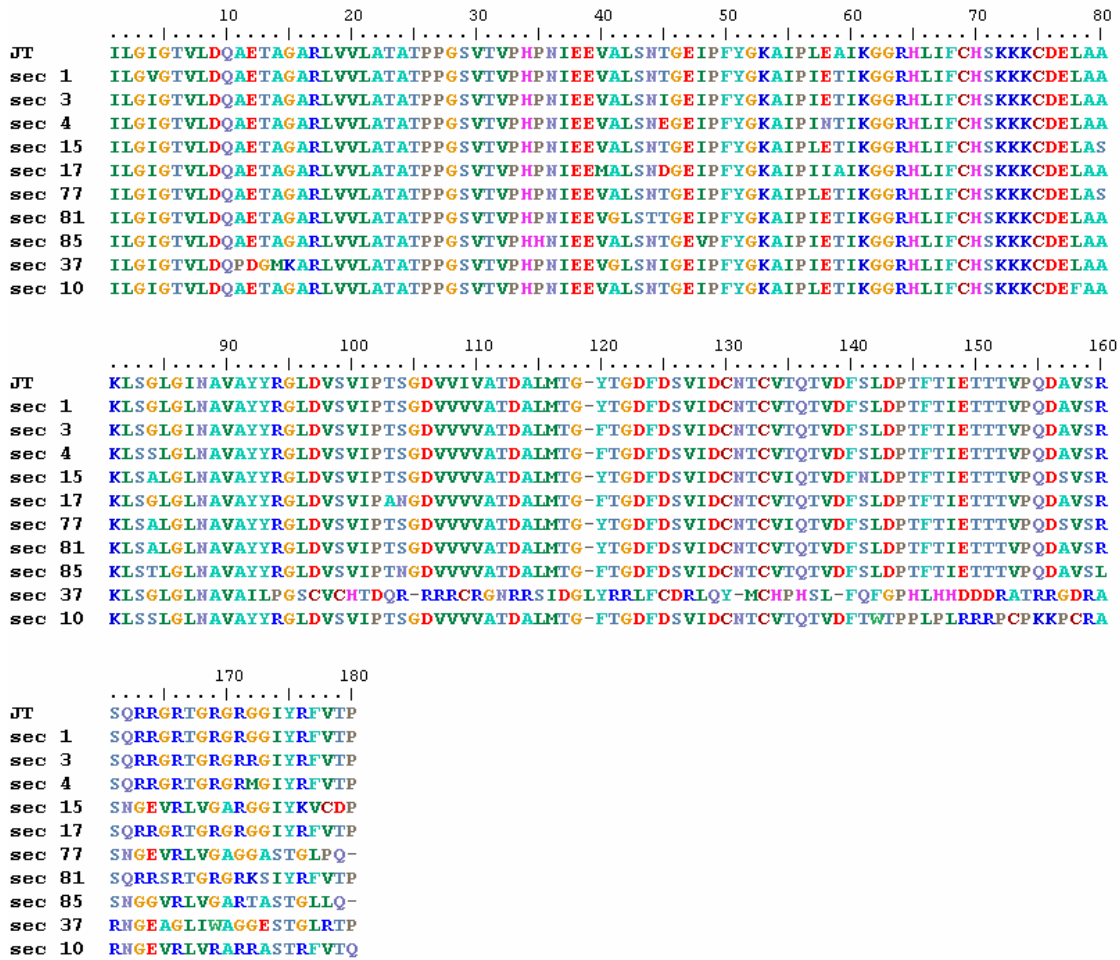
La figura 6 por Bioedit, muestra la alineación en aa de VHC aislados contra la cepa prototipo, nuevamente cada letra de color diferente indica un aminoácido en particular (ver anexo). A lo largo de la secuencia se observa una homología de color que nos permite ver que no hay gran variación de los aa con respecto a la cepa de referencia, pero si se presentan cambios puntuales que en la figura 8 se precisan con mayor facilidad.

Figura 6. Alineación de 11 VHC aislados de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con INF α , contra la cepa HCV-JT en aminoácidos.



En la figura 7 se omitió la secuencia 11 para poder observar con mayor facilidad la similitud que presentan las secuencias con respecto a la cepa HCV-JT, ya que esta muestra 10 aminoácidos que no están presentes en ninguna secuencia.

Figura 7. Alineación de 10 VHC aislados de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con INF α contra cepa HCV-JT en aminoácidos.



En la figura 8 y 9 se aprecian los cambios que presentan los VHC aislados con respecto al HCV-JT en las posiciones: 57 donde hay un cambio de leucina a isoleucina, 59 de alanina pasan a treonina, 87 que pasa de isoleucina a leucina y 119 de tirosina a fenilalanina. Cabe señalar que en la posición 57 de las tres secuencias que conservan la leucina que esta presente en el virus HCV-JT, dos corresponden a pacientes respondedores (secuencias 10 y 15) y una a un paciente respondedor (secuencia 37).

La secuencia 11 inicia con un marco de lectura diferente y sus primeros 19 aminoácidos no alinean con ninguna de las secuencias que ahí se encuentran, después recupera su ORF pero lo vuelve a perder junto con la secuencia 10 después de los 140 aminoácidos; la secuencia 37 también pierde su marco de lectura pero mucho antes que estas, a los 92 aminoácidos.

En estas figuras se observa que tanto la secuencia 15 como la secuencia 77 presentan los mismos cambios puntuales de aminoácidos en la posición A80S, G84A, T134I, A156S, R163E, G164V, T166L, G167V, R168G, G169A. Sin embargo pertenecen a grupos diferentes, pues uno es respondedor y el otro no.

Lo mismo ocurre con las secuencias 17 y 85, la primera es de un paciente no respondedor y la segunda pertenece a un paciente respondedor, ambas en la posición 104 tienen un cambio de aa con respecto a la HCV-JT y cepa consensus, en lugar de serina (S) presentan asparragina (N).

Otras 5 secuencias presentan cambios puntuales, la secuencia 3 en la posición 45 tiene isoleucina (I) en vez de treonina (T), la secuencia 4 tiene un cambio de ácido glutámico (E) en vez de treonina en la posición 45 y, en la posición 84 tiene serina en vez de glicina (G). La secuencia 17 cambia en las siguientes posiciones V40M, T45D, T103A, S104N; mientras que la secuencia 81 lo hace en A41G, N44T, G84A; la secuencia 10 en L78F, G84S; la secuencia 85 en P35H, G84T, S104N; y por último la secuencia 37 en A41G, T45I.

En la figura 10 se eliminaron los VHC aislados que pierden su marco de lectura y se volvió a alinear con la finalidad de poder observar mejor los cambios y similitudes de estos virus aislados con respecto al HCV-JT y la cepa consensus.

Figura 8. Alineación de los 11 VHC aislados de PR y PNR en aminoácidos comparados contra JT.

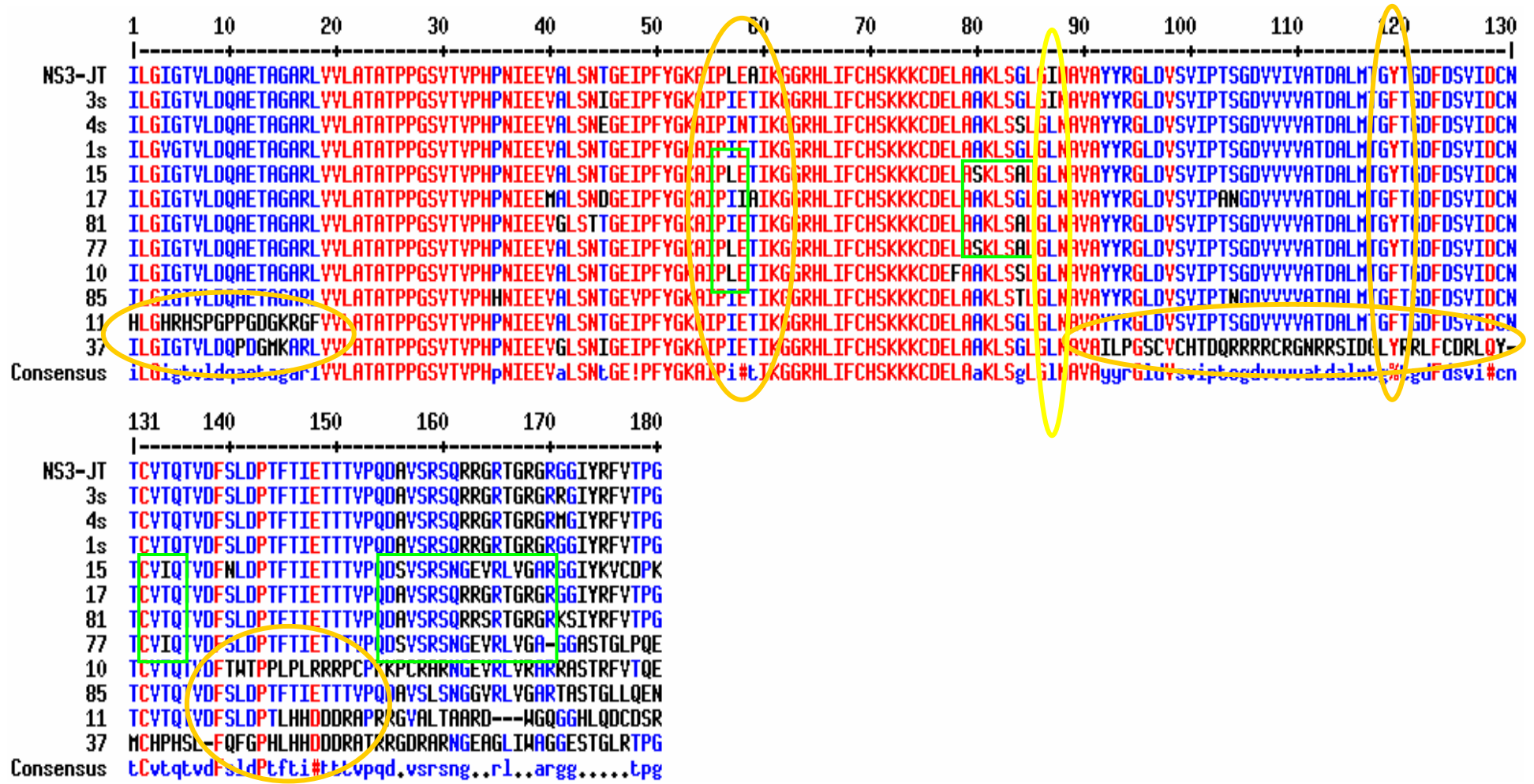


Figura 9. Alineación de los 11 VHC aislados de PR y PNR en aminoácidos comparados con la cepa consensus.

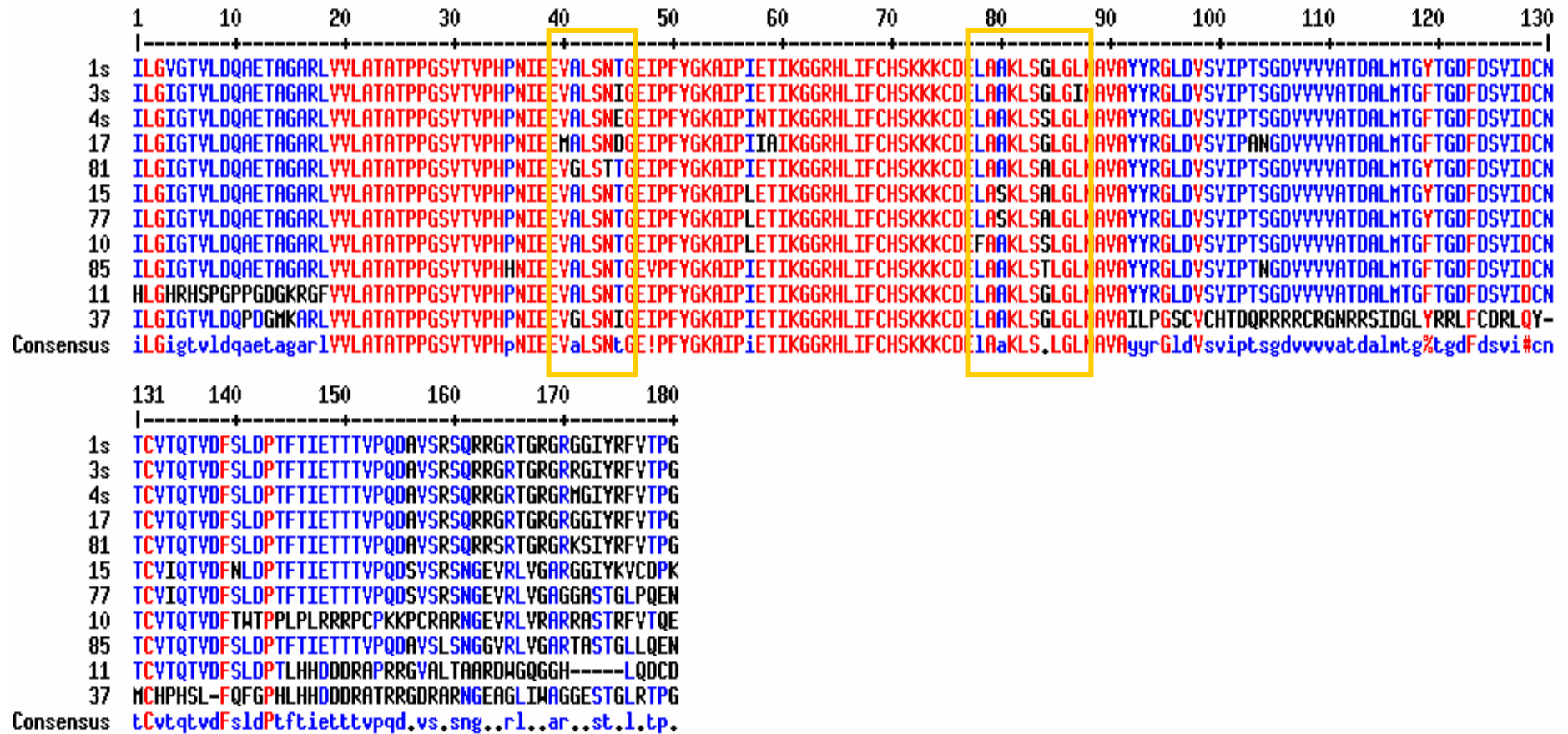
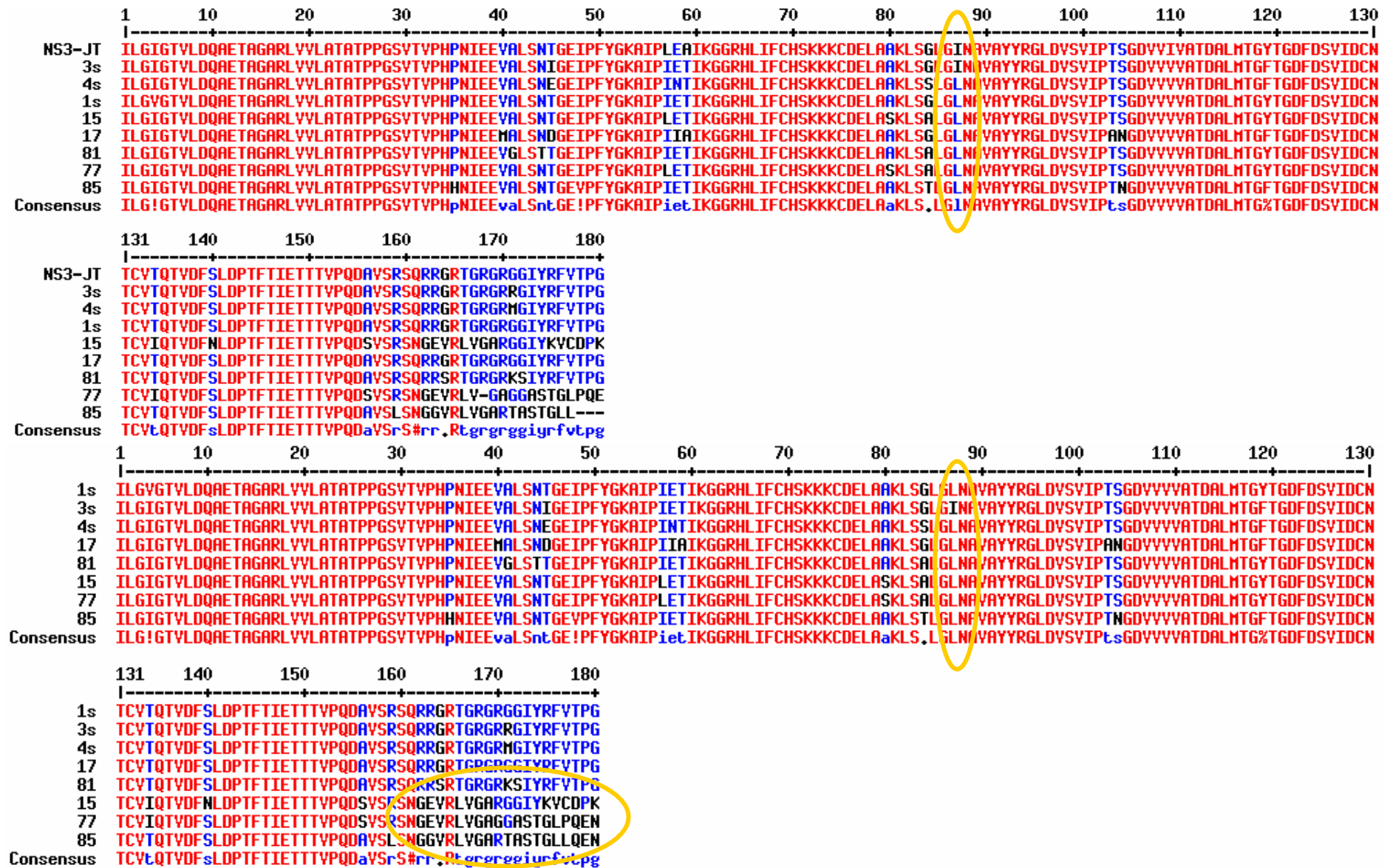


Figura 10. Alineación de 8 VHC aislados de PR y PNR en aminoácidos que mantienen el mismo ORF comparados contra cepa JT y cepa consensus.



En la figura 11, en las tres secuencias estudiadas: 10, 11 y 37 se observan cambios muy marcados. Tanto la secuencia 10 como la secuencia 37 pierden su marco de lectura (ORF) en la posición 140 y 92 respectivamente, mientras que la secuencia 11 inicia con otro ORF y lo recupera en la posición 10, pero nuevamente en la posición 145 vuelve a perder su marco de lectura.

Al analizar la secuencia en bases de cada una de estas, se observo que en la secuencia 10 hubo una delección, entre la posición 429-430 falta una guanina, que completa un aa con el triplete GCT que en la cepa HCV-JT si esta presente. Se inserto esta guanina para corroborar que efectivamente era la causante de que el ORF se perdiera y al cambiar a aminoácidos se observo que el marco de lectura se recuperaba.

En la secuencia 11 también, se analizo la secuencia en bases y en la posición 449 hay una citosina insertada, que no existe en el HCV-JT y que al eliminarla y hacer el cambio a aminoácidos permite que el marco de lectura no se pierda.

Por ultimo, en la secuencia 37 en la posición 290 de la secuencia en bases hay una adenina insertada que no existe en las otras secuencias estudiadas, ni en la cepa prototipo y que al eliminarla y pasar a aminoácidos permite que el ORF no se pierda.

De estas 3 secuencias que pierden su marco de lectura, dos corresponden a pacientes no respondedores 10 y 11, mientras que la secuencia 37 es de un paciente respondedor, esta ultima presenta dos cambios puntuales G41A y I45T que no aparecen en los pacientes no respondedores.

En la figura 12 se muestra la alineación del grupo de pacientes respondedores contra el HCV-JT y contra la cepa consensus. Se hizo la alineación por separado para observar si había alguna diferencia en una u otra alineación.

En la posición 57 la cepa japonesa tiene una leucina que solo aparece en un VHC aislado de un paciente respondedor, mientras que los 4 VHC aislados restantes presentan un cambio de aminoácido en esta posición, en lugar de leucina tienen isoleucina y cabe señalar que la cepa consensus también presenta este cambio.

En la posición 59 el HCV-JT tiene alanina (A) y en los VHC aislados es sustituida por treonina, al igual que en la cepa consensus.

En la posición 87 sólo un VHC aislado presenta el mismo aminoácido que la cepa JT (isoleucina), mientras que los 4 virus aislados restantes y la cepa consensus tienen leucina.

En la posición 119 el HCV-JT y las secuencias 37, 77 y 81 conservan la tirosina (Y) pero las secuencias 3 y 85 han cambiado este aminoácido por fenilalanina (F).

En la posición 161 la cepa JT y las secuencias 3 y 81 conservan glutamina (Q), mientras que 37, 77, 85 han cambiado a asparragina (N).

En la figura 13 se muestra el grupo de los pacientes no respondedores alineados contra HCV-JT y contra cepa consensus por separado, esta separación se hizo con la finalidad de poder observar si había un cambio en estas secuencias que no estuviera presente en el grupo de los pacientes respondedores y que nos indicara algo que se relacionara con la respuesta al tratamiento. Sin embargo se observan los mismos cambios que se presentan en el otro grupo. Así, en las posiciones 59, 87 y 119 hay cambios. En la secuencia 57 cuatro de las seis secuencias cambian de leucina a isoleucina como se observa en el grupo de los PR, en la 59 cinco cambian de alanina a treonina, en la posición 87 ninguna conserva el aa presente en la cepa JT todas junto con consensus han cambiado de isoleucina a leucina y en 119 cuatro secuencias cambian de tirosina a fenilalanina.

En la figura 14 se muestran los 2 grupos tanto el de pacientes respondedores como el de pacientes no respondedores y en ambos se presentan los mismos cambios de aminoácidos.

Figura 11. Alineación de 3 VHC aislados de 1 PR (37) y 2 PNR (10 y 11) en aminoácidos que pierden ORF comparados contra cepa JT y cepa consensus.

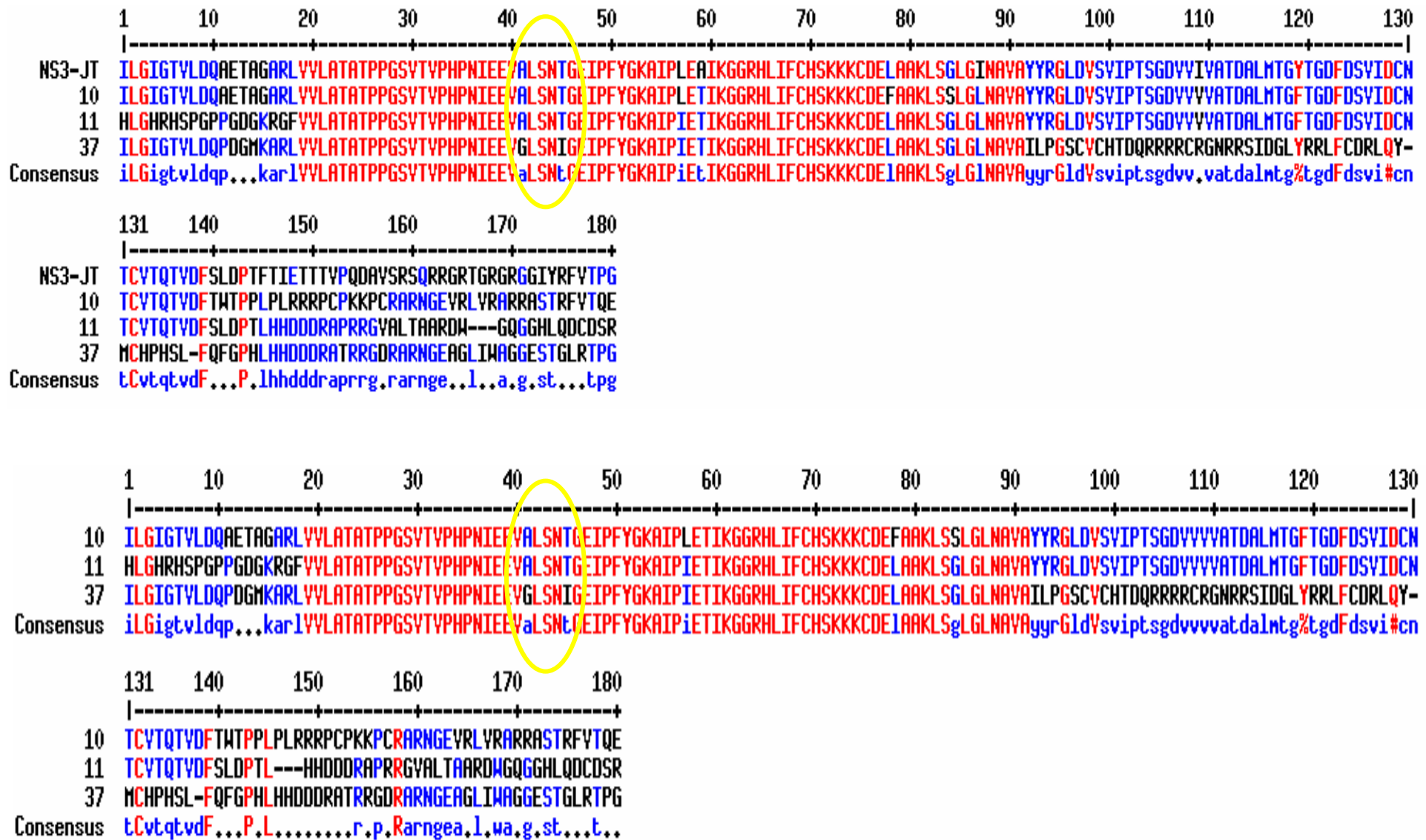


Figura 12. Alineación de 5 VHC aislados de pacientes respondedores al tratamiento con INF α contra cepa HCV-JT y contra cepa consensus.

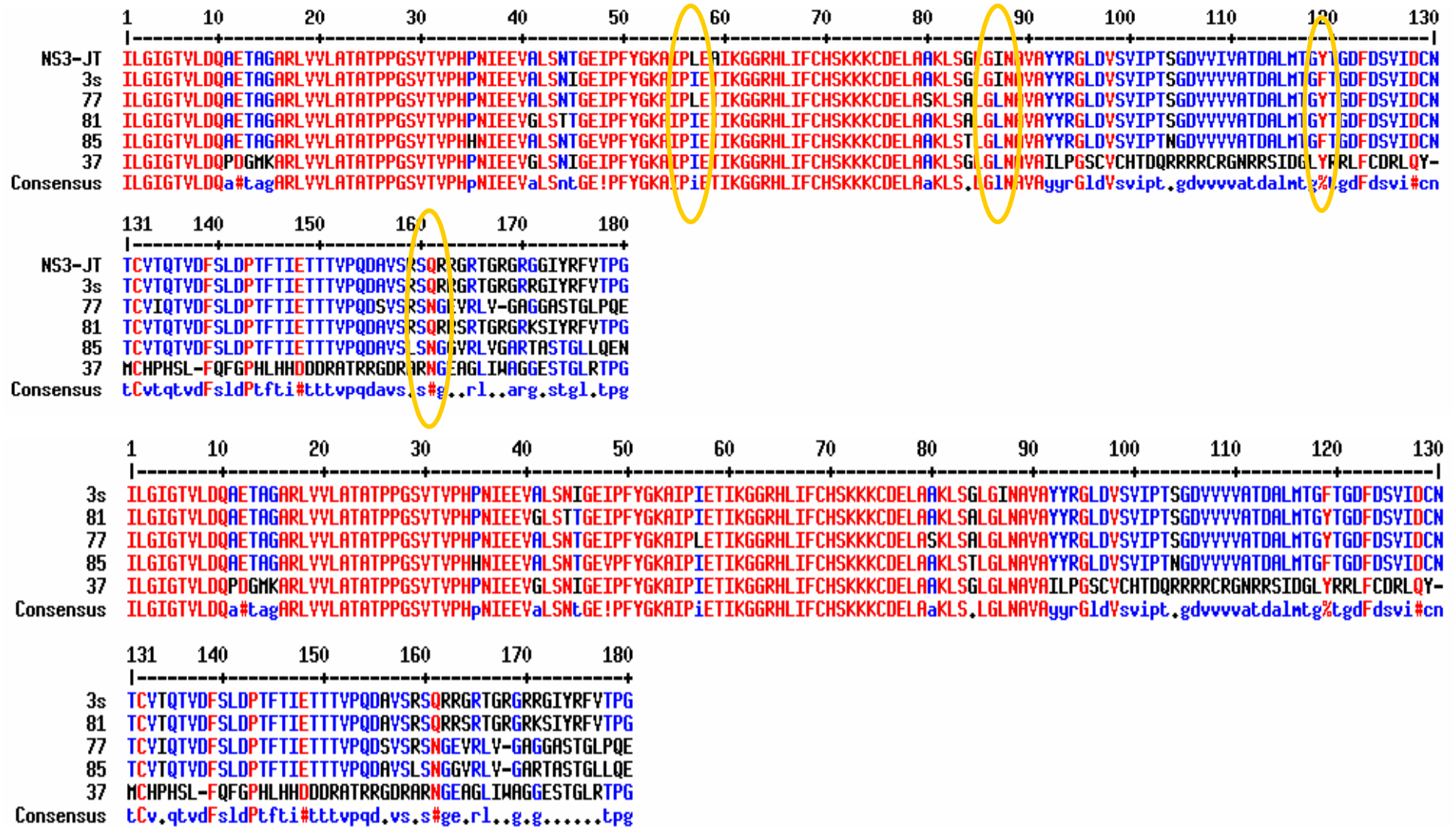


Figura 13. Alineación de 6 VHC aislados de pacientes no respondedores al tratamiento con INF α contra cepa HCV-JT y cepa consensus.

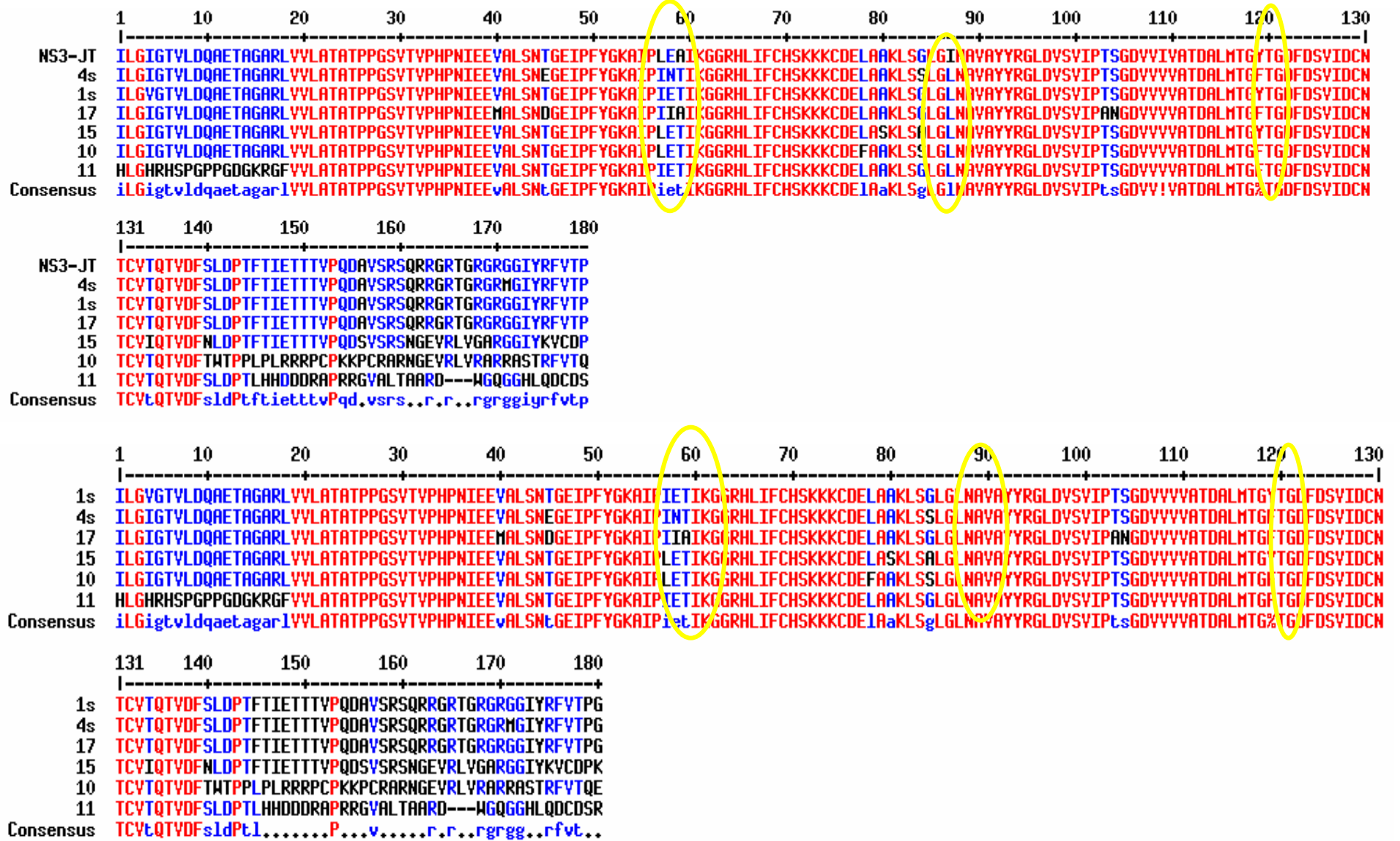


Figura 14. a) Alineación de pacientes respondedores al tratamiento con INF α contra cepa consensus y b) pacientes no respondedores al tratamiento con INF α contra cepa consensus

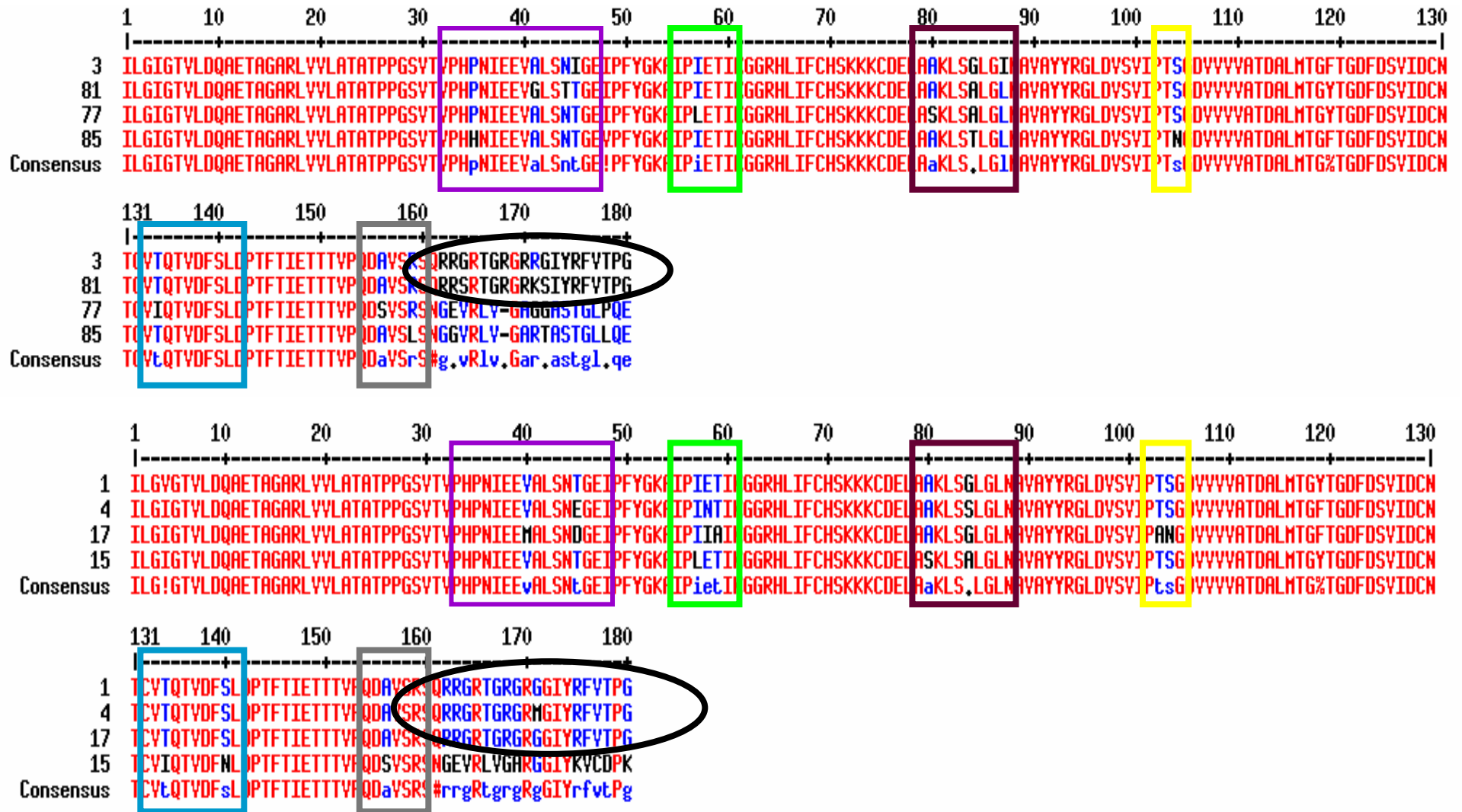


Tabla 5. Comparación de las secuencias con el HCV-JT y entre si.

GRUPO PR	% SIMILITUD CON HCV-JT	CAMBIOS DE AA CON RESPECTO A HCV-JT EN LA POSICION:					SECUENCIAS QUE PRESENTAN MISMOS CAMBIOS DE AA	CAMBIOS PUNTALES DE CADA SECUENCIA
		57	59	87	119	161		
		L—I	A—T	I—L	Y—F	Q—N		
3 81 77	96 94 87	NO		NO	NO	NO	A80S, G84A, T134I, A156S, R163E, G164V T166L,G167V,R168G G169A S104N	T45I A41G, N44T, G84A
85 37*	85 51				NO			P35H, G84T, S104N A41G, T45I
GRUPO PNR								
4 1 17 15	94 97 94 88	NO	NO		NO		S104N A80S, G84A, T134I, A156S, R163E, G164V T166L,G167V,R168G G169A	T45E, G84S V40M, T45D, T103A,S104N
10* 11*	79 10				NO			L78F, G84S

* Secuencias que pierden su ORF, la sec 10 en la posición 140, la sec 11 en la posición 10 y 145 y la sec 37 en la posición 92
NO = son las secuencias que conservan el mismo aa que HCV-JT

12. DISCUSIÓN

La parte fundamental de este trabajo se basó en el análisis del virus de la hepatitis C genotipo 1b mexicano, a partir de aislados de dos grupos de pacientes infectados que respondieron y que no respondieron al tratamiento convencional, para así poder determinar las diferencias entre estos pacientes, su relación con la proteína NS3 (helicasa) del VHC y su relación con la respuesta al tratamiento.

En recientes análisis filogenéticos en Centro y Sudamérica se ha revelado la presencia de aislados del genotipo 1 con un linaje genético diferente de los subtipos mayores del mismo genotipo, lo cual indica una diversificación del VHC en estas regiones (39,40); lo mismo sucede en otras áreas geográficas del mundo con otros genotipos del VHC como en Francia en donde el genotipo 4 se ha diversificado (41), en Moldavia con el genotipo 2 (42) y Somalia con el genotipo 3 (43), todo esto nos habla de los grandes cambios o variaciones que presenta este virus y de los impactos que estas tienen en el tratamiento y la persistencia de este patógeno.

Al hacer el análisis de los virus mexicanos se observaron diferencias con el virus HCV-JT en las posiciones L57I, A59T, I87L, Y119F que bien podrían ser características de nuestra población, pues aparece el mismo cambio de aminoácido en cada una de ellas. Se ha hablado de que este virus explota todos los mecanismos conocidos de variabilidad genética para asegurar su supervivencia (1) y estos cambios al parecer no afectan su función, además, su evolución es un proceso altamente dinámico en cuanto a genotipos se refiere, dependiendo de la zona geográfica que se este estudiando, creándose una substancial diversidad genética entre los mayores genotipos del virus de la hepatitis C (44). Así que es de esperarse, que haya algunas diferencias en cuanto a las secuencias de un virus americano con respecto a un virus asiático aunque se trate del mismo genotipo, pues se están comparando dos razas diferentes. De hecho al obtener los porcentajes de similitud de los virus mexicanos aislados con respecto a la cepa HCV-JT, se observa que están por arriba del 85% de similitud con respecto a esta cepa japonesa; señalándose que el porcentaje más alto lo tiene un paciente no respondedor (secuencia 1 con 97% de similitud) que clínicamente son los de mayor importancia pues todos los datos que puedan aportar son útiles en la mira a un mejor tratamiento.

Un punto importante fue excluir en esta comparación, las secuencias que pierden su marco de lectura porque al perder su ORF hay una diferencia de aa tan grande que parecería que se están comparando dos ORF diferentes y por tal razón la similitud entre estos virus va a ser muy baja lo que se traduce en porcentajes bajos.

No obstante, este virus puede presentar cambios que no necesariamente tengan que ver con la zona geográfica, sino con el individuo que se está infectando, es decir, con las características individuales que presenta cada paciente a nivel de su sistema inmunológico, así algunas de las divergencias en las secuencias pueden representar cambios seleccionados fenotípicamente que son asociados con la adaptación para la replicación en individuos con diferentes respuestas inmunes para la infección (44) y esto es lo que podría estar pasando con 5 de las secuencias estudiadas (la secuencia 3, 4, 10, 17, 37, 81 y 85) de los virus mexicanos aislados que presentan cambios puntuales únicos, que no se están repitiendo en otras secuencias.

En un estudio reciente se han observado algunas mutaciones en NS3 para evadir al HCV del sistema inmune y posteriormente en algunos casos, el HCV vuelve a cambiar al aminoácido original (45); lo cual le sirve como escape a la expresión de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I del huésped, sugiriendo que hay un conflicto entre la evolución para escapar del sistema inmune y la limitación funcional en la proteína, que es más marcado en NS3 que en cualquiera de las otras proteínas del VHC-1b (45, 46).

También se obtuvo una pérdida del marco de lectura en los virus aislados de las secuencias 10, 11 y 37 en donde se observa la ausencia o presencia de bases que no aparecen en la secuencia de la cepa prototipo ni en las demás secuencias analizadas. Lo cual sugiere que pudo haber deleciones e inserciones de nucleótidos en estas secuencias que provocaron su pérdida del ORF. Se sabe que la RNA polimerasa dependiente de RNA juega un papel muy importante en la replicación del genoma, sin embargo su actividad replicativa no da una fidelidad de copias como lo hacen las DNA polimerasas, por lo que presentan tasas de error mucho mayores y en este caso la polimerasa del VHC NS5B no presenta actividad correctora de errores (47,48). Esta situación estaría muy relacionada con lo que pudo haber ocurrido en este caso y así pensar que es factible que se presentara una deleción o inserción de nucleótidos (nt), en las tres secuencias que presentan este comportamiento. Lo que llama más la atención sin embargo, es la secuencia 37 que pertenece a un paciente respondedor al tratamiento, ya que podría ser semejante a lo que se ha reportado en pacientes sometidos al tratamiento con INF α más ribavirina que responden adecuadamente, pero después de terminada la terapia es frecuente que presenten una recaída (pacientes refractarios) (49,50).

El tratamiento para pacientes con enfermedades refractarias es más difícil y menos estudiado (51,52). Por arriba del 80% de los pacientes con hepatitis C son refractarios al tratamiento con INF α , estos pacientes probablemente no son beneficiados por altas dosis o por una larga duración del INF (53). La adición de ribavirina ha mostrado que provee un tipo de respuesta sostenida en algunos de estos pacientes que presentan recaídas (53,50). En un protocolo para pacientes refractarios

que se hizo en el 2006 utilizando altas dosis de INF α -2b más ribavirina contra bajas dosis, el 34% de los pacientes refractarios al VHC genotipo 1 dieron una respuesta virológica sostenida (SRV) a altas dosis y no tuvieron virus detectables a las 24 semanas, no obstante solo la mitad de ellos presentaron títulos virales indetectables a las 24 semanas de conseguir una respuesta virológica sostenida (51). Estas características de los no respondedores son más acentuadas en pacientes infectados con genotipo 1 y 4 (54). Desafortunadamente, en el caso del paciente 37, no se siguió monitoreando por lo que no fue posible saber si siguió sin presentar carga viral, o si bien, se ha convertido en un paciente refractario y actualmente presente una carga viral alta. Por lo que resulta importante conocer si los pacientes que inician tratamiento con buena respuesta y posteriormente presentan recaídas, pudieran tener mutaciones como las presentadas por este paciente y que pudieran estar ayudando al virus a escapar del tratamiento.

Finalmente, al analizar las secuencias de los virus aislados y observar que tanto la secuencia 15 como la secuencia 77 y la secuencia 17 con la 85 presentaban los mismos cambios puntuales de aminoácidos, se pensó que podrían pertenecer al mismo grupo. Sin embargo al pertenecer a grupos diferentes, no se puede pensar que estos cambios tengan que ver con la respuesta al tratamiento. Finalmente estas condiciones nos indican que presentan cambios puntuales y que estas alteraciones en la secuencia, no alteran la factibilidad del virus pues su maquinaria puede seguir trabajando adecuadamente.

13. CONCLUSIONES.

Las diferencias observadas en las secuencias de pacientes respondedores con respecto a los pacientes no respondedores, no son suficientes para determinar si estas variabilidades tienen que ver con la respuesta al tratamiento. Es conveniente analizar una población más extensa para ver si efectivamente estos cambios se presentan con mayor frecuencia y sobre todo ver si son cambios que aparecen en los pacientes que presentan recaídas.

Las mutaciones de aminoácidos presentes en las secuencias de los VHC aislados corroboran la variabilidad genómica que presenta el virus de la hepatitis C y su capacidad para soportar éstos cambios sin que se afecte su infectividad.

En general ambos grupos presentan los mismos cambios de aminoácidos. Lo cual nos habla de diferencias entre los virus mexicanos con respecto a la cepa prototipo HCV-JT que es una cepa japonesa, pero no muestra cambios que pudieran relacionarse con la respuesta al tratamiento mediada por NS3 helicasa.

14. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.

Los cambios de aminoácidos que presentan los VHC aislados en las posiciones L57I, A59T, I87L y Y119F con respecto al HCV-JT sugieren cambios específicos de la cepa mexicana con respecto a la cepa japonesa, por lo que resulta interesante realizar un estudio con un número de pacientes mayor, para corroborar si efectivamente estos cambios siguen presentándose en los virus mexicanos y que puedan ser más que mutaciones características de nuestra población.

Es necesario también ver que es lo que sucede con otras regiones que pueden influir en la respuesta al tratamiento como son E2 y NS5 al mismo tiempo que se estudia la NS3, pues existen estudios de cada una de estas regiones con respecto a la respuesta al tratamiento, pero no hay estudios en donde se analicen estas tres regiones en conjunto.

15. ANEXO.

Bases nucleótidos

Nucleótidos	Color	Símbolo
Adenina	Verde	A
Timina	Rojo	T
Guanina	Negro	G
Citosina	Azul	C

Aminoácidos

Nombre	Simbología antigua	Simbología nueva	Grupo al que pertenecen
Glicina	Gly	G	Aminoácidos alifáticos
Alanina	Ala	A	
Valina	Val	V	
Leucina	Leu	L	
Isoleucina	Ile	I	
Prolina	Pro	P	Aminoácidos aromáticos
Fenilalanina	Phe	F	
Tirosina	Tyr	Y	
Triptófano	Trp	W	
Cisteína	Cys	C	Aminoácidos azufrados
Metionina	Met	M	
Serina	Ser	S	Aminoácidos hidroxilados
Treonina	Thr	T	
Lisina	Lys	K	Aminoácidos básicos
Arginina	Arg	R	
Histidina	His	H	
*Ac. Aspártico	Asp	D	Aminoácidos ácidos
*Ac. Glutámico	Glu	E	
Asparragina	Asn	N	Amidas de*
Glutamina	Gln	Q	

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol*. 2000; 32(1): 98-112
2. Sanantonio T, Wiegand J, Tilman Gerlach J. Acute hepatitis C: Current status and remaining challenges. *J Hepatol*. 2008; 49(4) 625-33
3. Aguilera Guirao A, Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(4): 264-76
4. Xiao-Dong L, Lijun S, Rashu B, Pineda G, Hepatitis C virus protease NS374A cleaves mitochondrial antiviral signalling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Immunology* 2005; 102(49): 17717-17722
5. Kazutaka Kurokohchi, Toshitaka Akatsuka, C. David Pendleton. Use of recombinant Protein To Identify a motif- Negative Human Cytotoxic T-cell Epitope Presented by HLA-A2 in the hepatitis C virus NS3 region. *Journal of Virology* 1996; 70 (1): 232-240
6. Duraisamy G, Zuridah H, Ariffin MY. Prevalence of hepatitis C virus antibodies in blood donors in Malasia. *Med J Malaysia* 1993; 48:313-16.
7. Williams A, Dodd R. The serology of hepatitis C virus in relation to post-transfusion hepatitis. *Ann Clin Lab Sci* 1990; 20:192-99
8. Mendez-Sánchez N, Baptista-González H, Sánchez-Gómez RH, Bordes-Aznar J, Uribe-Esquivel M. Prevalencia de hepatitis B y C en donadores de sangre en un hospital de tercer nivel de la ciudad de México. *Salud pública Mex* 1999; 41 (6): 475-78
9. María Rebeca F. Rivera- López, Celia Zavala-Méndez, Alfonso Arenas-Esqueda. Prevalencia de seropositividad para VIH, hepatitis B y C en donadores de sangre. *Gac Méd Méx* 2004; 140 (6): 657-660
10. Benítez-Arvizu G, Cortez-Gómez R, Novelo-Garza BA, Malagón-Martínez A, Guerra-Márquez A, Alvarado-Maldonado MC. Prevalencia del virus de hepatitis C en el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza. *Rev. Med. IMSS* 2006; 94 (3): 227-33

11. Dehesa-Violante M, Bosques-Padilla F, Kershenubich-Stalnikowitz D. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Mexican patients. *Rev Gastroenterol Mex.* 2007; 74 (4): 344-48
12. Angela M. I. Lam, David Keeney and David N. Frick. Two Novel Conserved Motifs in the hepatitis C Virus NS3 Protein Critical for Helicase Action. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278 (45): 44514-44524
13. Samuel G. Mackintosh, J. Zhiqiang Lu, J. B. Jordan, M. K. Harrison. Structural and Biological Identification of Residues on the Surface of NS3 Helicase Required for Optimal Replication of the Hepatitis C Virus. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281 (6):3528-3535
14. Wolf Peter Hofmann, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon α - based antiviral therapy. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32: 86-91
15. Angela M. Lam, Eckert P, Frick D. Hepatitis C virus NS3 ATPases/Helicases from different genotypes exhibit variations in enzymatic properties. *J. Virol.* 2003; 77(7): 3950-3961.
16. Lamarre D, Anderson P, Murray Bailey, Pierre Beaulieu, Gordon Bolger, Pierre Bonneau. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003; 426: 186-189
17. Phillip S. Pang, Eckhard Jankowsky, Paul J. Planet and Anna Marie Pyle. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *The European Molecular Biology Organization Journal* 2002; 21 (5): 1168-1176
18. Youla S. Tsantrizos. The Design of a Potent Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS3 Protease: *BILN 2061*—From the NMR Tube to the Clinic *Biopolymers (Peptide Science)*, Vol. 76, 309–323 (2004)
19. Kai Lin, Robert B. Perni, Ann D. Kwong, and Chao Lin. VX-950, a Novel Hepatitis C Virus (HCV) NS3-4A Protease Inhibitor, Exhibits Potent Antiviral Activities in HCV Replicon Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50(5):1813–1822.
20. Francois H. T. Duong, Verena Christen, J. Martin Berke, S. Hernández Penna. Upregulation of protein phosphatase 2Ac by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein Arginine methyltransferase. *Journal of Virology* 2005; 79 (24): 15342-15350

21. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *J Hepatology* 2004; 40(1):184-186.
22. Wolf Peter Hofmann, Stefan Zeuzem, Christoph Sarraan. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon α based antiviral therapy. *J.Clinical Virology* 2005; 32:86-91.
23. Enomoto. Mutations in the NS5A gene. *N Engl J Med* 1996; 334 (2):77-81.
24. Chao Lin and Joseph L. Kim. Structure-Based Mutagenesis Study of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. *Journal of Virology* 1999; 73 (10): 8798-8807
25. Neumann-Haefelin C, Blum H. E., Chisari F. V., Thimme R.. T cell response in hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32: 75-85
26. Angela M. I. Lam and David N. Frick. Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J. Virology* 2006; 80(1): 404-411.
27. Motoyuki Otsuka, Naoya Kato, Masaru Moriyama, Hiroyoshi Taniguchi. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* 2005; 41:1004-1012.
28. Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura. Processing and Functions of Hepatitis C Virus Protein. *Intervirolgy* 1999; 42: 145-152
29. Volver Brass, Darius Moradpour and Hubert E. Blum. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV). *Int. J. Med. Sci.* 2006; 3 (2):29-34
30. Darius Moradpour, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nature Rev. Microbiol.* 2007; 5:453-63
31. Seeger C. Salient molecular features of hepatitis C virus revealed. *Trends Microbiology.* 2005; 13: 528-53.
32. De Francesco R. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J. Hepetol.* 1999; 31: 47-53
33. Lozano A. Hepatitis C. Clínica y tratamiento. *OFFARM* 2005; 24(4): 84-87.
34. Merce Roget. Efectos secundarios del tratamiento con interferón y ribavirina. *Enf Emerg* 2003; 5 (3): 181-189

35. Seme katia, Poljak Mario, Babic Dunja Z, Mocilnik Tina, Vince Adriana. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32: 92-101
36. Ordax Julio, Revilla Ramos Fernando, Carbajal García-Pando Alfonso y Martín Arias Luis H. Interferón alfa y ribavirina en el tratamiento de la Hepatitis C, posibles reacciones adversas. *Consulta Terapéutica. Centro Regional de Farmacovigilancia de Castilla y León* 1999; 5: 1-4
37. Arambarri M., Fernández Lucas M., Echarri R, Teruel J. L, Alarcón C, Merino J. L. y Ortuño J. Tratamiento con interferón α y ribavirina en un paciente de hemodiálisis virus C, PCR positivo. *NEFROLOGÍA* 2004; 24 (3): 39-42.
38. Bendinelli M, Vatteroni M, Maggi F, Pistillo M. Hepatitis C virus. Biology, patogénesis, epidemiology, clinical description and diagnosis. *Viral Hepatitis* 65-118
39. San Roman M, Lezama L, Rojas E, Colina R, García L, Carlos A. Analysis of genetic heterogeneity of hepatitis C viruses in Central America reveals a novel genetic lineage. *Arch Virol* 2002; 147: 2239-46
40. Vega I, Colina R, García L, Uriarte R, Mogdasy C, Cristina J, Diversification of hepatitis C viruses in South America reveals a novel genetic lineage. *Arch Virol* 2001; 146: 1623-29
41. Morice Y, Roulot D, Grando V, Stirnemann J, Gault E, Jeantils V, Phylogenetic analyses confirm the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) type 4 in the Seine-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *J Gen Virol* 2001; 82: 1001-12
42. Samokhvalov EI, Hijikata M, Gylka RI, Lvov DK, Mishiro S. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis C virus variant (isolate name VAT96) representing a new subtype within the genotype 2 (arbitrarily 2k). *Virus Genes* 2000; 20: 183-87
43. Abid K, Quadri R, Veuthey AL, Hadengue A, Negro F. A novel hepatitis C virus (HCV) subtype from Somalia and its classification into HC clade 3. *J Gen Virol* 2000; 81: 1485-93.
44. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus 15 years on. *J. Gen Virol* 2004; 85: 3173-188

45. Irausquin SJ, Hughes AL. Distinctive pattern of sequence polymorphism in the NS3 protein of hepatitis C virus type 1b reflects conflicting evolutionary pressures. *J Gen Virol*. 2008; 89 (Pt 8): 1921-9
46. Uebelhoer L, Han JH, Callendret B, Mateu G, Shoukry NH, Hanson HL, Rice CM, Walker CM, Grakoui A. Stable cytotoxic T cell escape mutation in hepatitis C virus is linked to maintenance of viral fitness. *PloS Pathog* 2008; 4(9): e1000143
47. Pawlotsky JM. Current and future concepts in hepatitis C therapy. *Semin Liver Dis*. 2005; 25: 72-83
48. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D. and Crow JF. Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* 1998; 148: 1667-86
49. Qureshi SA. Hepatitis C virus-biology, host evasion strategies, and promising new therapies on the horizon. *Med Res Rev* 2007; 27 (3): 353-73
50. Sagir A, Heintges T, Akyazi Z, Oette M, Erhardt A, Hâussinger D. Relapse to prior therapy is the most important factor for the retreatment response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2007; 27 (7): 954-9
51. Mathew A, Peiffer LP, Rhoades K, McGarrity T. Sustained viral response to pegylated interferon alpha-2b and rivavirin in chronic hepatitis C refractory to prior treatment. *Dig Dis Sci*. 2006; 51 (11): 1956-61
52. Mathew A, Peiffer LP, Rhoades K, McGarrity T. Research. Improvement in quality of life measures in patients with refractory Hepatitis C, responding to re-treatment with Pegylated interferon alpha -2b and ribavirin. *Health and Quality of Life Outcomes* 2006; 4 (30): 1-8
53. Cozzolongo R, Cuppone R, Giannuzzi V, Amati L, Caradonna L, Tamborrino V, Jirillo E, Manghisi OG. Combination therapy with ribavirin and alpha interferon for the treatment of chronic hepatitis C refractory to interferon. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001; 15 (1): 129-35
54. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W, Heim MH. Interferon signalling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (19): 7034-9