



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE PUEBLA

---

*DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*

*“Detección y análisis de las sustituciones asociadas a resistencia (SAR) en la proteína NS5A del virus de la hepatitis C (VHC), en pacientes con falla al tratamiento con antivirales de acción directa (AAD) de nueva generación”*

Tesis para obtener el Título de  
Maestro en Biotecnología

Presenta:

*IB. Ricardo Arturo Cruz Cervantes*

*Director de tesis:*

*Dra. Francisca Sosa Jurado*

*Codirectora:*

*Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez*

*Asesor:*

*Dr. Gerardo Santos López*



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Se aprueba la Tesis:

***“Detección y análisis de las sustituciones asociadas a resistencia (SAR) en la proteína NS5A del virus de la hepatitis C (VHC), en pacientes con falla al tratamiento con antivirales de acción directa (AAD) de nueva generación”***

Presenta: Ricardo Arturo Cruz Cervantes

Comité Asesor

Dra. Francisca Sosa Jurado

Director(a) de Tesis

Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez

Co directora

Dr. Gerardo Santos López

Asesor

Puebla, México.

19 de octubre del 2020

**Esta investigación fue realizada gracias al apoyo de:**

**“Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)”**

**Beca para maestría**

**“Universidad Popular Autónoma de Puebla”**

**Beca Ordinaria**

**“Instituto Mexicano del Seguro Social”**

**Apoyo económico complementario para maestría**

## **Agradecimientos**

### **A MIS TUTORES:**

**Dra. Francisca Sosa Jurado**

**Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez**

**Dr. Gerardo Santos López**

Agradezco infinitamente a cada uno de ellos por aceptarme como estudiante, por brindarme su confianza, amistad y apoyo en una de las mejores experiencias de mi vida, les aseguro que sus enseñanzas y conocimientos los transmitiré con la misma pasión, respeto y tolerancia que me mostraron. Gracias por todo.

**Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta**

Agradezco su increíble apoyo en el arranque de este proyecto dándome los consejos y parte del conocimiento necesario en mi formación durante este proyecto. Gracias por todo.

**Dr. Miguel Ángel Mendoza Torres y Dr. Daniel Erasmo Meléndez Mena**

Agradezco su increíble aportación en la captación de los pacientes de estudio, así como la facilidad de interacción con los mismos. Gracias por todo.

**c Dr. Luis Márquez Domínguez**

Por tu valiosa amistad y apoyo durante mi proyecto. Gracias por todo.

### **A LAS INSTITUCIONES:**

**Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).** Por su apoyo total durante mi formación y la posibilidad de ser parte de un núcleo de investigadores de alto nivel. Gracias por todo.

**Al Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR).** Por el apoyo y la integración al núcleo familiar que fue para mí. Gracias por todo.

**A la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP).** Por la formación y apoyo que me brindaron durante el proceso. Muchas gracias.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).** Por el apoyo recibido a lo largo de mi formación profesional. Muchas gracias.

**Al Programa de Becas de UPAEP.** Por el apoyo recibido durante mi formación. Muchas Gracias.

## Dedicatorias

### A mis padres:

*Leonor Cervantes Moreno y Miguel Cruz Reynoso, por jamás perder la fe en mí y apoyarme incondicionalmente en cada fase de mi vida, por las alegrías, sonrisas, y lecciones que me impulsaron a ser quien soy hoy en día, por ser los mejores padres que la vida me pudo dar y el mejor ejemplo de esfuerzo, dedicación y amor por su vocación que pude encontrar, por ello mis logros, trabajo, metas y mi vida entera estará dedicada a ambos. Los amo con toda mi alma.*

### A mi abuela:

*Mama Chelo, sé que, aunque ya no pueda verte, siempre estás conmigo, apoyándome en cada momento, en cada caída, recordándome que cada cosa que haga en esta vida sea con mi corazón. Te amo y te extraño cada día.*

### A mis hermanos:

*Diego Axel y Mitzi Laura, nunca se rindan en la búsqueda de sus sueños, mi mayor deseo siempre será su éxito en todo lo que se propongan, por más lejos que nos encontremos siempre nos tendremos para apoyarnos. Los amo a los dos.*

### A mis sobrinos:

*Leonardo Zaid y Ángel Yared, siempre intentare ser el mejor ejemplo para ambos, cuando la vida se torne lo más complicada posible sepan que siempre me tendrán a mí para apoyarlos en lo que sea, el mejor consejo que les puede dar su tío es que miren la vida como un juego en la dificultad más difícil, así podrán obtener las mayores recompensas y nunca pero nunca se rindan. Los amo a ambos.*

### A mis mejores amigos:

*Javier y Benjamín, en cada lugar al que eh ido a lo largo de mi vida eh conocido personas que llenan mi vida de alegría y dicha, que te recuerdan que algunos sentimientos no puedes encontrarlos en cualquier persona y cuando las encuentras son difíciles de soltar, pero, como todo siempre hay un final, ustedes amigos míos son y siempre serán un pilar importante en mi vida del cual en mucho tiempo no llegue a creer posible volver a encontrar, fueron durante este tiempo una familia para mí, sufrimos, lloramos, reímos, gritamos y golpeamos a la vida en tantas ocasiones que es imposible no sentirlos parte de mi camino, quiero que sepan que mi deseo hacia ustedes siempre será la felicidad en sus vidas, tengo la fe que los tres alcanzaremos la grandeza, sin rendirnos, con valor y con nuestras esencias intactas, amigos estos dos años fueron la mejor cosa que me ha pasado en la vida y no saben cuánto los quiero, donde sea que*

*terminen nuestras vidas siempre recuerden al mirar al cielo que... “Somos hermanos hasta el fin”.*

### **A Dulce Gloria Balbuena Jaime**

*Jamás creí que conocería a una de mis mejores amigas en una situación tan difícil, agradezco cada día que entraras a mi vida y seas una de las personas a la que le tengo más confianza, recuerda que siempre me tendrás para lo que sea y recuerda que a través de la adversidad es como encontramos la fuerza para salir adelante, espero puedas ver el mundo con tranquilidad y una sonrisa otra vez, no sabes cómo adoraba verte feliz. Te quiero tarada.*

### **A Yetzabel Maya**

*Por darme la fuerza necesaria para salir adelante al principio de este camino, no encuentro las palabras ni la manera de regresar el tiempo que me brindaste, tus palabras y las acciones, ahora entiendo que la persona que admiraba y anhelaba era muchísimo más grande de lo que siquiera llegue a pensar.*

*“Bushido es la aceptación total de la vida, no rendirse incluso cuando ya no tenemos deseos de vivir. Esto se logra estando dispuesto a morir en cada instante, viviendo el aquí y ahora, sumido en el eterno presente.”*

*-Yamamoto Tsunetomo*

*“No hemos inventado nada nuevo, ni siquiera hemos aprendido a amar, estamos perdidos... como en un sueño. El amor debería ser un milagro en el que soñamos la felicidad del otro.*

*Por eso no creas nunca que el amor te pertenece, porque en ese preciso instante desaparecerá... como un sueño, porque el amor es un sueño en el que sueñan dos.”*

*-Deuterios*

*No inventes, ni robes, ni engañes, ni bebas. Pero si has de inventar, inventa un mundo mejor, si has de robar, procura que sea un corazón, si has de engañar, engaña a la muerte y si has de beber... bébete los momentos de felicidad inolvidables.*

*-Manigoldo*

Índice .....	I
Índice de tablas .....	VI
Índice de figuras .....	VII
RESUMEN .....	X
ABSTRACT .....	XI
1. MARCO TEORICO .....	1
1.1 Hepatitis C .....	1
1.2 Virus de la hepatitis C (VHC) .....	1
1.2.1 Genoma VHC .....	1
1.2.2 Ciclo de replicación .....	2
1.3 Historia natural de la hepatitis C .....	3
1.4 Epidemiología de la hepatitis C .....	4
1.5 Tratamiento de la hepatitis C .....	5
1.5.1 Esquema de tratamiento .....	5
1.5.2 Interferón alfa pegilado más ribavirina (pegINF $\alpha$ -RBV) .....	5
1.5.3 Terapia basada en antivirales de acción directa (AAD) .....	6
1.5.4 Tipos de respuestas al tratamiento con AAD .....	8
1.6 Proteína NS5A .....	8
1.6.1 Funciones de la proteína viral NS5A que la convirtieron en un blanco terapéutico ..	9
1.7 Los inhibidores de la NS5A del VHC .....	10
1.7.1 Ledipasvir (componente de Harvoni) aspectos moleculares .....	10
1.7.2 Mecanismo de acción del ledipasvir .....	12

1.7.3 Ombitasvir (Viekira-Pak) aspectos moleculares .....	13
1.7.4 Mecanismo de acción del ombitasvir .....	13
1.7.5 Las variantes asociadas a resistencia (SAR) en la proteína NS5A.....	14
1.7.6 Las sustituciones asociadas a resistencia (SAR) en la proteína NS5A detectadas en muestras clínicas de pacientes con pre o post-tratamiento con AAD.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS .....	20
3.1 Hipótesis de investigación.....	20
3.2 Hipótesis alterna .....	20
3.3 Hipótesis nula .....	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
<i>General</i> .....	22
<i>Particulares</i> .....	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1 Elaboración del protocolo.....	24
6.1.1 Diseño de estudio .....	24
6.1.2 Ubicación espacio temporal .....	24
6.1.3 Muestreo .....	24
6.1.4 Diseño y tipo de muestreo .....	25
6.1.5 Tamaño de muestra.....	25
6.1.6 Definición de variables y escalas de medición.....	26
6.1.7 Definición conceptuales y operacionales de las variables de estudio .....	26
6.2 Separación de leucocitos .....	27
6.3 Extracción de ARN viral .....	27
6.3.1 Extracción de ARN a partir de leucocitos .....	27

6.3.2 Extracción ARN en plasma o suero.....	28
6.3.3 Integridad de ARN .....	29
6.3.4 Concentración de ARN.....	29
6.4 Recursos bioinformáticos .....	29
6.4.1 Herramientas de diseño .....	29
6.4.2 Análisis bioinformático .....	30
6.4.3 Diseño de iniciadores para obtener la región NS5A.....	30
6.4.4 Diseño de iniciadores degenerados NS5A genotipo 1a/1b.....	30
6.5 RT-PCR .....	31
6.5.1 Preparación de material y mantenimiento de reactivos .....	31
6.5.2 Obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído de las muestras .....	31
6.5.3 Primera ronda de PCR y PCR anidado.....	32
6.6 Proceso para la obtención de plásmidos .....	32
6.6.1 Preparación de células competentes .....	32
6.6.2 Clonación en vector pJET1.2/Blunt.....	33
6.6.3 Extracción de plásmido .....	34
6.7 Proceso de digestión de plásmidos con enzimas de restricción y liberación de fragmentos .....	35
6.8 Secuenciación por el método Sanger.....	35
6.9 Análisis de las secuencias.....	35
6.9.1 Edición de Secuencias de nucleótidos.....	35
6.9.2 Construcción de secuencias consenso por alineamiento .....	35
6.9.3 Traducción de las secuencias y alineamiento .....	36
6.9.4 Árbol filogenético.....	36

7	RESULTADOS .....	36
7.1	Pacientes .....	36
7.2	Diseño de los iniciadores .....	38
7.2.1	Análisis bioinformático .....	38
7.2.2.	Diseño de los iniciadores específicos para la región NS5A para el genotipo 1a.....	38
7.3	Obtención de fragmentos de la NS5A por RT-PCR.....	47
7.3.1	Fragmentos de la región NS5A Genotipo 1a.....	47
7.3.2	Fragmentos de la región NS5A Genotipo 1b.....	48
7.4.1	Plásmidos de fragmentos de la NS5A G1a (P06).....	50
7.4.2	Plásmidos NS5A G1b (P07).....	53
7.5	Secuenciación y curación de productos de PCR .....	54
7.6	Traducción de secuencias .....	56
8	ANALISIS .....	57
8.1	Eficacia de los iniciadores para amplificar la secuencia de la región NS5A de G1a y G1b a partir de muestras de suero de pacientes con hepatitis C crónica.....	57
8.1.1	Amplificación de 3 secuencias de la región NS5A G1a y obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A G1a.....	57
8.1.2	Amplificación de la secuencia de la región NS5A G1b y obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A G1b .....	58
8.2	Pacientes .....	60
8.2.1	Pacientes NR al tratamiento con Harvoni o Viekira Pak.....	61
8.2.2	Pacientes que presentaron RVS al tratamiento con Harvoni.....	61
8.3	Análisis de las secuencias de pacientes NR y los que alcanzaron RVS con alguno de los tratamientos Harvoni o Viekira Pak .....	61
8.3.1	Paciente (P08) no respondedor al fármaco Viekira PaK (inhibidor NS5A, ombitasvir).....	62

8.3.2 Paciente (P07) no respondedor al fármaco Harvoni (inhibidor de la NS5A ledipasvir) .....	63
8.3.3 Pacientes G1a y G1b con RVS al fármaco Harvoni (inhibidor NS5A ledipasvir)...	65
8.4 Árbol filogenético de las secuencias G1a y G1b.....	69
9 CONCLUSIONES.....	73
10 REFERENCIAS .....	75
11.ANEXOS.....	80

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 1 .</b> Escalas de medición de las variables a estudiar .....	26
<b>Tabla 2.</b> Reacción de RT-PCR para 20 $\mu$ l .....	31
<b>Tabla 3.</b> Reacción de PCR de 20 $\mu$ l.....	32
<b>Tabla 4.</b> Reacción de ligación.....	34
<b>Tabla 5.</b> Pacientes con hepatitis C crónica, con RVS y NR al tratamiento con cualquiera de los fármacos Harvoni o Viekira Pak .....	37
<b>Tabla 6.</b> Características fisicoquímicas de iniciadores .....	39
<b>Tabla 7.</b> Concentrado de iniciadores de la región NS5A genotipo 1a.....	41
<b>Tabla 8.</b> Concentrado de oligonucleótidos NS5A genotipo 1b .....	43
<b>Tabla 9.</b> Concentrado de iniciadores degenerados para obtener por RT-PCR .....	46
<b>Tabla 10.</b> Fragmentos obtenidos para secuenciación .....	54

---

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Características estructurales del dominio I de la proteína NS5A. Se destacan el sitio de fosforilación en la posición 146 (verde), enlace disulfuro, un motivo (tetra-cisteína) de unión con zinc en la posición 39, 57, 59, 80 (negro) y el motivo de unión a partículas de lípidos en la posición 5- 25 (rosa). ....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura de los inhibidores de la NS5A. Ledipasvir presenta una notable similitud estructural con el daclatasvir. ....	12
<b>Figura 3.</b> Estructura química de ombitasvir .....	13
<b>Figura 4.</b> Mapa de oligonucleótidos NS5A genotipo 1a. RN1aNS5As y RN1aNS5Aa (amarillo), RN1aNS5AaIs y RN1aNS5AaIa (verde), RN1aNS5AaIIs y RN1aNS5AaIIa (Azul), Región codificante NS5A (café). ....	40
<b>Figura 5.</b> Mapa de oligonucleótidos NS5A genotipo 1b. RN1bNS5As y RN1bNS5Aa (amarillo), RN1bNS5AaIs y RN1bNS5AaIa (verde), RN1bNS5AaIIs y RN1bNS5AaIIa (Azul), Región codificante NS5A (café). ....	42
<b>Figura 6.</b> Alineamiento mapa oligonucleótidos NS5A-1a/1b .....	45
<b>Figura 7.</b> Fragmentos de P06 G1a en gel de agarosa al 1%. A) Fragmento de 844 pb (NS5A1aIs/NS5A1aIa) B) Fragmento de 502 pb (NS5A1aIIs/NS5A1aIIa) C) Fragmento de 443 pb (NS5A1aS/NS5AaIIs/a) D) Fragmento de 265 pb (NS5A1aS/NS5AaIIs/a) C) Fragmento 250 pb (NS5AaIIa/s/NS5Aa). ....	47
<b>Figura 8.</b> Fragmentos de P07 G1b en gel de agarosa al 1%. A) Fragmento de 685 pb (NS5A1bS/NS5AaIIa) B) Fragmento de 572 pb (NS5A1baIs/NS5A1baIIa) C) Fragmento de 696 pb (NS5A1baIIs/NS5A1bA). ....	49
<b>Figura 9.</b> Corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Diseño in silico de sitio de corte BglIII B) Diseño in silico de sitio de corte XhoI. C) Plásmido Pjet/VHC1a 433P06 y amplificación fragmento 433 pb, D) Plásmido Pjet/VHC1a 433P06, control (2da y 4ta carril), liberado (3ro y 6to carril) y linealizado (4to y 7mo carril). ....	50
<b>Figura 10.</b> Corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Diseño in silico de sitio de corte BglIII B) Diseño in silico de sitio de corte XhoI C) Amplificación de fragmento 251 pb Pjet/VHC1a 251P06, D) Plasmido Pjet/VHC1a 251P06 control (2do carril), liberado (3er carril) y linealizado (4to carril). ....	51

<b>Figura 11.</b> Corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Diseño in silico de sitio de corte BglII B) Diseño in silico de sitio de corte XhoI C) Control (2do carril) y amplificación de fragmento 256 pb (3er carril), Control plásmido (4to carril), liberación del fragmento Pjet/VHC1a256P06 (5to carril) y linealizado (6to carril).....	52
<b>Figura 12.</b> Corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Diseño in silico de sitio de corte BglII B) Diseño in silico de sitio de corte XhoI C) Control (2do carril), control plasmido (3er carril), liberación del fragmento de Pjet/VHC1b685P07 (4to carril), linealizado (5to carril) y amplificación del fragmento VHC1b685P07 de 685 pb (6to carril).....	53
<b>Figura 13.</b> Ejemplo de análisis de electroferograma en Chromas. Plásmido pJetVHC1a433P06 y ubicación del iniciador RN1aNS5As.....	55
<b>Figura 14.</b> Edición y construcción de secuencias. A) Alineamiento BLAST de VHC1aP06..	56
<b>Figura 15.</b> Alineamiento múltiple MEGA-X. A) Alineamiento pacientes G1a RVS y NR B) Alineamiento pacientes G1b RVS y NR. ....	57
<b>Figura 16.</b> Construcción de un fragmento de la región NS5A G1a y traducción del75% de la secuencia de la proteína NS5A G1a. ....	58
<b>Figura 17.</b> Construcción de una parte de la región NS5A G1b (685pb) y traducción de la secuencia de la proteína NS5A G1b. ....	59
<b>Figura 18.</b> Construcción de una parte de la región NS5A G1b (696pb) y traducción de la secuencia de la proteína NS5A G1b. ....	60
<b>Figura 19.</b> Alineamiento múltiple MEGA X de la secuencia de la NS5A de la paciente NR (P08) y de la secuencia de referencia (ACS15692.1). Se muestran los aminoácidos de la secuencia silvestre (wild type), sin SAR en rojo y aminoácidos sustituidos con residuos caracterizados como SAR en morado.....	63
<b>Figura 20.</b> Alineamiento múltiple MEGA X secuencia de la NS5A de pacientes con NR VHC1b P07 y secuencia AAV83514.1 (control). Se muestran los aminoácidos de la secuencia silvestre (wild type), sin SAR en rojo y aminoácidos sustituidos con residuos caracterizados como SAR en morado. ....	64
<b>Figura 21.</b> Alineamiento múltiple MEGA X de pacientes con RVS de G1a y G1b. A) VHC1aP04, P03, P01, P06, P02y ACS (control) B) VHC1b P05y AAV83 (control). Se muestran los aminoácidos de la secuencia silvestre (wild type), sin SAR en rojo y aminoácidos sustituidos con residuos caracterizados como SAR en morado. ....	66
<b>Figura 22.</b> Forma de anclaje a NS5A para ledipasvir. Los átomos de carbono están coloreados en verde para ledipasvir y en blanco para los residuos proteicos. Los puentes de hidrógeno se	

muestran como líneas punteadas y los límites de las proteínas del sitio de unión se muestran en una representación de dibujo 3d, donde el primer monómero se muestra en amarillo, mientras que el segundo monómero se muestra en gris (Baraka,2015). .....67

**Figura 23.**Árbol filogenético circular de secuencias G1a de VHC. Secuencias del estudio (triangulo morado) y origen EU (triangulo rojo). ..... 70

**Figura 24.**Árbol filogenético circular de secuencias G1b de VHC. Secuencias del estudio (Triangulo azul), origen sueco (Cuadrado verde) y origen alemán (Circulo morado). .....71

### **Detección y análisis de las sustituciones asociadas a resistencia (SAR) en la proteína NS5A del virus de la hepatitis C (VHC), en pacientes con falla al tratamiento con antivirales de acción directa (AAD) de nueva generación”**

**Introducción:** En 2017 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se empezó a dar el tratamiento con antivirales de acción directa (AAD) de última generación: ViekiraPak y Harvoni, contienen componentes diseñados específicamente para bloquear a las proteínas virales NS5A y NS5B; se ha reportado una respuesta viral sostenida (RVS) de 94% -100%. Sin embargo, se han detectado pacientes no respondedores (NR) a los AAD. La resistencia del virus a los fármacos se debe a la presencia de sustituciones asociadas a resistencia (SAR) en la NS5A. Las SAR tienen una prevalencia en pacientes NR del 54.4% hasta 72.7%, y en pacientes con RVS alrededor del 42,5%. La sustitución más detectada y más asociada a resistencia con varios inhibidores de la NS5A es Y93, aunque L28 está asociada a resistencia con ledipasvir y ombitasvir preferentemente.

**Objetivo:** Detectar y analizar las SAR en secuencias de la proteína NS5A VHC, obtenidas a partir de muestras de pacientes con falla al tratamiento con AAD de nueva generación.

**Material y método:** Estudio descriptivo, observacional, ambispectivo, homodémico y transversal. Se reclutaron pacientes que presentaron falla al tratamiento con Viekira-Pak o Harvoni durante 10 meses, >18 años, de sexo masculino o femenino, y con o sin experiencia previa al tratamiento pegINF $\alpha$  / RBV. Muestreo por conveniencia. Se diseñaron iniciadores para obtener la región NS5A de los genotipos virales G1a y G1b. Se realizó extracción de ARN viral de las muestras de plasma, se estandarizaron las reacciones RT-PCR anidado para obtener la región NS5A G1a y la NS5A G1b. Los productos obtenidos por RT-PCR de los pacientes NR se clonaron en un vector, posteriormente se secuenciaron mediante el método de Sanger. Para definir las SAR NS5A, se analizaron *in silico* las secuencias de nucleótidos y posteriormente las secuencias de aminoácidos, mediante alineamiento y comparación con una secuencia prototipo del VHC obtenidas de GenBanK.

**Resultados:** De 90 pacientes que entraron a tratamiento con AAD, (88) 97.8% alcanzaron RVS, y 2(2.2%) fueron NR, uno infectado con G1a y otro con G1b, en ambos pacientes la muestra fue obtenida post-tratamiento. Se obtuvieron 5 plásmidos de la región NS5A G1a, y 3 de la NS5A G1b. Adicionalmente se obtuvo la región NS5A de 5 pacientes con G1a y de 1 pacientes con G1b, la muestra de sangre se obtuvo pre-tratamiento con AAD, todos ellos alcanzaron RVS. En los pacientes NR no fueron detectadas SAR NS5A, pero filogenéticamente estuvieron vinculadas a secuencias procedentes de pacientes NR a AAD.

**Conclusión:** Las SAR a los inhibidores de la NS5A ledipasvir y ombitasvir no fueron detectadas en los pacientes NR, pero las secuencias de la NS5A estuvieron filogenéticamente asociadas a secuencias NS5A de pacientes NR al tratamiento AAD.

**Palabras clave:** Virus hepatitis C, antivirales de acción directa, sustituciones asociadas a resistencia, inhibidores NS5A VHC.

## ABSTRACT

---

### **“Detection and analysis of resistance-associated substitutions (RAS) in the NS5A protein of the hepatitis C virus (HCV), in patients with failure to treatment with new generation direct-acting antivirals (DAAs) ”**

**Introduction:** In 2017, the Mexican Social Security Institute (IMSS) began to treat with the latest generation direct-acting antivirals (DAAs): ViekiraPak and Harvoni, contain components specifically designed to block the viral proteins NS5A and NS5B; a sustained viral response SVR of 94% -100% has been reported. However, non-responders (NR) to DAAs have been detected. The resistance of the virus to drugs is due to the presence of resistance-associated substitutions (RAS) in NS5A. RASs have a prevalence in NR patients of 54.4% to 72.7%, and in patients with SVR around 42.5%. The most detected substitution most associated with resistance with various NS5A inhibitors is Y93, although L28 is associated with resistance with ledipasvir and ombitasvir preferentially.

**Objective:** To detect and analyze the SAR in sequences of the HCV NS5A protein, obtained from samples of patients with failure to treat with new generation DAAs.

**Materials and methods:** Descriptive, observational, ambispective, homodemic and cross-sectional study. Patients who had failed treatment with Viekira-Pak or Harvoni for 10 months, > 18 years, male or female, and with or without prior experience with pegINF $\alpha$  / RBV treatment were recruited. Sampling for convenience. Primers were designed to obtain the NS5A region of the viral genotypes G1a and G1b. Viral RNA was extracted from plasma samples, nested RT-PCR reactions were standardized to obtain the NS5A G1a and NS5A G1b regions. The products obtained by RT-PCR from the NR patients were cloned into a vector, subsequently they were sequenced using the Sanger method. To define the NS5A RASs, nucleotide sequences and subsequently amino acid sequences were analyzed in silico, by alignment and comparison with a prototype HCV sequence obtained from GenBank.

**Results:** Of 90 patients who entered treatment with DAA, (88) 97.8% reached SVR, and 2 (2.2%) were NR, one infected with G1a and another with G1b, in both patients the sample was obtained post-treatment. 5 plasmids of the NS5A G1a region, and 3 of the NS5A G1b region were obtained from the NR patients. Additionally, the NS5A region was obtained from 5 patients with G1a and from 1 patient with G1b, the blood sample was obtained pre-treatment with DAA, all of them reached SVR. SAR NS5A was not detected in NR patients, but they were phylogenetically linked to sequences from NR to DAA patients.

**Conclusion:** SARs to NS5A inhibitors ledipasvir and ombitasvir were not detected in NR patients, but NS5A sequences were phylogenetically associated with NS5A sequences from NR patients to DAA treatment.

**Keywords:** Hepatitis C virus, direct-acting antivirals, resistance-associated substitutions, NS5A HCV inhibitors.

# 1. MARCO TEORICO

---

## 1.1 Hepatitis C

La hepatitis por virus C es una enfermedad del hígado causada por el virus del mismo nombre; ese virus puede causar hepatitis (inflamación del hígado), tanto aguda como crónica, cuya gravedad varía entre una dolencia leve que dura algunas semanas, y una enfermedad grave de por vida, que va desde hepatitis crónica, pasando por cirrosis hasta carcinoma hepatocelular (CHC).

## 1.2 Virus de la hepatitis C (VHC)

El VHC pertenece a la familia *Flaviviridae*, miembro del género *Hepacivirus* que mide aproximadamente 55-75 nm con un *core* interno de 30-35 nm el cual contiene un ARN monocatenario de 9,600 nucleotidos, su estructura, organización genómica y ciclo de replicación son similares a los de los miembros de la misma familia. Tiene una alta heterogeneidad genética la cual se clasifica en seis genotipos y más de 50 subtipos, lo cual ha dificultado el desarrollo de una vacuna (Carballal,2015).

### 1.2.1 Genoma VHC

El genoma del VHC es un ARN de 9.6 kb, el cual contiene un marco de lectura abierto (ORF) flanqueado por dos regiones no traducibles la 3' y 5' pero necesarias para la traducción y replicación del ARN viral. El ORF codifica una poliproteína de aproximadamente 3,010 aminoácidos, posteriormente es procesada por proteasas celulares y virales para generar 3 proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C, *core*), E1 y E2; la proteína C se multimeriza

y captura hacia adentro de una estructura icosaédrica al ARN viral para formar la nucleocápside; las proteínas E1 y E2 forman parte de la envoltura del virión, contienen numerosos sitios de glicosilación. La proteína E2 se desdobra en dos proteínas, la E2 y p7, esta última juega un papel importante en la maduración de la glicoproteína y mediante la formación de canales iónicos de transmembrana (actividad de viroporina) permitiendo la inserción del virus a la célula. (Carballal,2015).

Las 7 proteínas no estructurales: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, al ser procesadas por peptidasas del retículo endoplásmico, generan la correcta replicación de virión. Las proteínas NS2 junto con la región amino terminal NS3 forman la proteasa NS2-3, NS3 constituyendo una serín proteasa, la cual se encarga de degradar los enlaces peptídicos de péptidos y proteínas, así mismo es componente de la NTPasa y helicasa. La proteína NS4A actúa como un cofactor de NS3; la función de NS4B es aún desconocida. La proteína NS5A está ligada al proceso replicación, mientras la proteína NS5B tiene actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN, la cual carece del mecanismo de corrección de errores, lo que genera un proceso de replicación altamente propenso a errores ( Lindenbach, 2007,Casanova, 2015).

### **1.2.2 Ciclo de replicación**

La organización del genoma es similar para todos los miembros de la familia *Flaviviridae*. Los cuales, a partir de una poliproteína, y con la intervención de algunas proteínas celulares y proteasas virales se producen varias proteínas virales.

La unión del virión a las células implica un proceso de endocitosis mediada por receptor, asistido por la intervención de algunos receptores celulares como CD81; a un bajo pH en el endosoma se induce la fusión de la membrana del virión con la membrana celular. La nucleocápside es

desempacada dentro de las endosomas, se libera el ARN viral en el citoplasma. El genoma del VHC tiene tres funciones dentro del ciclo de replicación, como un ARNm para la traducción de todas las proteínas virales, un ARN plantilla durante el proceso de replicación y de un ARN empaquetado dentro de nuevas partículas virales (el genoma propiamente dicho). La replicación del ARN ocurre enteramente en el citoplasma en una estrecha relación con la membrana intracelular, y se genera la síntesis de una cadena de ARN completa anti-sentido, el cuál funciona como intermediario para la síntesis del genoma viral (sentido positivo), los virones de la nueva progenie se unen formando un compartimiento en la membrana intracelular y en el retículo endoplásmico, posteriormente se liberan en la superficie celular provocando una lisis celular, para luego ser liberados a la vía de circulación del hospedero (Scheel,2013).

### **1.3 Historia natural de la hepatitis C**

La historia natural de la hepatitis C se describe en dos escenarios: en el primero; los factores de riesgo que indujeron a la infección a un individuo. En el segundo escenario o patogénico se inicia con la entrada del virus al organismo humano, se pueden presentar síntomas de hepatitis aguda, y la infección puede ser resuelta en forma natural por el individuo, o bien persistir durante varios años como hepatitis crónica, que al inicio será clínica y bioquímicamente indistinguible, llevando a sufrir la transición insidiosa y sin manifestaciones clínicas aparentes de HCC a cirrosis, y su transición a cirrosis descompensada, o bien podrá llegar al estadio de CHC. La severidad de la infección por VHC varía, si hablamos con porcentajes, la infección aguda solo representa un 15% de los casos, un 25-30% de los pacientes son sintomáticos con manifestaciones típicas de cualquier hepatitis viral. Algunos tienen un curso asintomático (entre 50 y 90% de los casos) y otros presentan progresión a cronicidad desarrollando fibrosis hasta un 70% de los casos y de éstos, se llega a producir cirrosis en el 20 o 30% de los pacientes

afectados en un periodo de 20 a 30 años. En estado de cirrosis, compensada o no, de manera anual se llega a presentar hasta en el 5% - 6% de los casos CHC (Sagnelli, 2014).

#### **1.4 Epidemiología de la hepatitis C**

En 2015 se estimó que 71 millones de personas en el mundo tienen HCC por VHC. La hepatitis C afecta a todas las regiones, con importantes diferencias entre países y dentro de un mismo país. Aunque países de África y del pacífico occidental son las más afectadas, así como las regiones del Mediterráneo Oriental y de Europa tienen la prevalencia más alta. El consumo de drogas inyectables es la principal ruta de transmisión del VHC en algunas regiones, aunque a nivel mundial, un 5% de las inyecciones suministradas en el ámbito de la atención sanitaria no son seguras (vía parenteral). Como consecuencia, se calcula que en 2015 se produjeron en todo el mundo 1.75 millones de nuevas infecciones por el VHC (OMS, 2020).

De acuerdo con el informe mundial sobre la hepatitis, en 2016 las hepatitis virales son las causantes de 400,000 muertes por cirrosis y carcinoma hepatocelular. En 2017 la mayoría de las muertes debidas a hepatitis virales fueron por cirrosis descompensada y CHC (OMS,2020).

La Encuesta Nacional de Salud del 2000 y el sistema de vigilancia epidemiológico realizado entre los años 2000 y 2007, indicaban que de los 192,000 casos reportados de hepatitis, solo el 6% correspondían a VHC en México, a partir de una revisión sistemática se encontró una seroprevalencia del 1.4% distribuido en el interior del país ( 2% en el norte, 1.5% el sur y 1.1% en el centro del país) siendo estos datos limitados ya que solo se analizaron 6 de la 32 entidades federativas (Juan Pablo,2016). En donadores de sangre la seroprevalencia a nivel Nacional oscila 0.0% - 2.5%; el genotipo viral 1 es el más prevalente (30.0%-87.5%) y el más abundante es el subtipo viral 1b; el principal factor de riesgo la trasfusión sanguínea antes de 1995 (Santos-

López et al., 2008), un más reciente estudio en población derechohabiente de nivel de atención 1, también fue el principal factor de riesgo (López-Colombo et al.,2014).

## **1.5 Tratamiento de la hepatitis C**

### **1.5.1 Esquema de tratamiento**

El tratamiento para la hepatitis C en México ha ido evolucionando constantemente de acuerdo a los lineamientos que las instituciones de salud suelen adoptar de las guías de práctica clínica locales y de diferentes partes del mundo, las principales estrategias en el tratamiento antiviral del VHC suelen ser en mayor parte personalizadas, considerando la gravedad de la enfermedad asociada a VHC, efectos secundarios del tratamiento, respuesta al tratamiento, presencia de comorbilidades y el grado de aceptación del paciente; siendo uno de los primeros tratamientos para el mismo, la combinación de interferón pegilado (peg- $\text{INF}\alpha$ ) y ribavirina como tratamiento estándar para pacientes con hepatitis C crónica (HCC) durante 12 a 24 semanas, al pasar los años se introdujo una nueva clase de medicamentos; los antivirales de acción directa (ADD) los cuales suelen ser administrados durante 12 semanas de acuerdo al estadio individual de cada paciente y en caso de infecciones crónicas su uso en combinación con peg $\text{INF}\alpha$ -RBV. El estatus del paciente es descrito de acuerdo a términos que describen la respuesta de los diferentes tratamientos dentro de un periodo de 12 a 48 semanas ya que cada tratamiento esta diferenciado por un periodo distinto de tratamiento de acuerdo a la necesidades e historial clínico del paciente.

### **1.5.2 Interferón alfa pegilado más ribavirina (peg $\text{INF}\alpha$ -RBV)**

La meta principal del tratamiento de la hepatitis C es lograr una respuesta viral sostenida (RVS) en el paciente. Aunque con el tratamiento dual peg $\text{INF}\alpha$ -RBV existen distintas respuestas. La respuesta viral rápida (RVR): el ARN del VHC es indetectable (menos a 50 UI/ml) en la semana

4; respuesta viral temprana (RVT): el ARN del VHC es detectable en la semana 4 pero no en la semana 12 y no detectable hasta el fin del tratamiento; respuesta viral temprana parcial (pRVT): el ARN del VHC disminuye 2 log<sub>10</sub> a la semana 12 pero es detectable a la semana 24; respuesta viral lenta (sRV): el ARN del VHC disminuye 2 log<sub>10</sub> a la semana 12 pero es indetectable a la semana 24 hasta fin de tratamiento; recaída: el ARN del VHC indetectable al fin de tratamiento pero detectable después o antes de completar la terapia; respuesta nula: disminución menos de 2 log<sub>10</sub> en el nivel de ARN del VHC a las 12 semanas de tratamiento, en el grupo de no respondedor están incluidas la recaída, la respuesta nula y RVS: el ARN del VHC es indetectable a la semana 24 o 48 después del fin de tratamiento (Craxì A, 2011).

Con este tratamiento se obtenía una RVS del 45% al 60% para el los G1 y G4, para los G2 o G3 del 70% AL 80% (Hoffmann, 2015). Pero en los pacientes mexicanos infectados con G1 fue del 35% al 38%, la muy baja RVS fue atribuida a la presencia de cirrosis, a una alta carga viral, y al subtipo 1b (Sandoval-Ramírez,2015).

### **1.5.3 Terapia basada en antivirales de acción directa (AAD)**

La primera generación de AAD fueron los inhibidores de proteasas (IP) boceprevir y telaprevir que se aprobaron para uso clínico en 2011, a mitad de ese mismo año, la terapia con PegIFN+RBV para la infección por VHC G1 fue sustituida por la triple terapia PegIFN+RBV más algún IP de primera generación, la tasa de curación incrementó a 65-75% (Marrero P, 2014). En 2013 la segunda generación de AAD incluyó sofosbuvir (SFV) (inhibidor nucleosídico de la polimerasa de HCV NS5B), que incrementó a más del 90% la RVS. Una segunda generación de IP, el simeprevir, resultó con tasas de respuesta viral a fin de tratamiento similares cuando se le adicionó pegIFN+RBV, sin embargo, no era así para la RVS, que osciló alrededor del 80%. En 2014 los tratamientos con AAD remplazaron a la terapia basada en IFN (Lawitz E,2016).

Las terapias con ledipasvir (LDV)/sofosbuvir (SOF) o SOF-simeprevir-RBV resultaron en tasas de RVS para el G1 de 92 al 100%. La combinación de ombistasvir (OBV)/paritaprevir (PTV)/ritonavir (r)/dasabuvir (DSV) con o sin RBV alcanzó tasas de RVS hasta de 100%. El siguiente paso en el desarrollo de terapia clínica para la infección crónica por VHC fue la disponibilidad de nuevos tratamientos con AAD, algunos disponibles en presentaciones de un solo comprimido, aumentando así el apego del paciente al tratamiento, AAD pangenotípicos y/o de corta duración (8 a 12 semanas) como: SOF-velpatasvir-voxilaprevir, grazoprevir-elbasvir, SOF-velpatasvir, SOF/LED y finalmente glecaprevir-pibrentasvir; éstas son las únicas combinaciones de AAD recomendados de manera internacional por diversas guías de tratamiento en la actualidad (Pawlotsky, 2018).

La elección de un régimen de un antiviral de acción directa (AAD) requiere tomar en cuenta varios factores, tanto virales, como del hospedero; en cuanto al virus; genotipo y subtipo; respecto al paciente, experiencia al tratamiento o no (pacientes *naïve*); la presencia de cirrosis, respecto a su estadio compensado o descompensado, las comorbilidades y las potenciales interacciones entre los diversos fármacos que el paciente consume. A pesar de las importantes ventajas de los AAD sobre la terapia de IFN, una gran barrera es el alto costo de adquisición (Aiza I, 2018). Los AAD son usados siguiendo el historial clínico del paciente, debido a sus efectos de descompensación hepática en el caso de Viekira Pak (ombitasvir, paritaprevir, ritonavir y dasabuvir), mientras que, como tratamiento más factible, en caso de tener o no cirrosis se usa Harvoni (ledipasvir y sofosbuvir), con una tasa de disminución de 98 a 100% (Lawitz E, 2014).

#### **1.5.4 Tipos de respuestas al tratamiento con AAD**

La RVS con los tratamientos AAD se define como, el nivel de ARN del VHC en plasma por debajo del límite de detección a las 12 semanas después de la completar el tratamiento (semana 24).

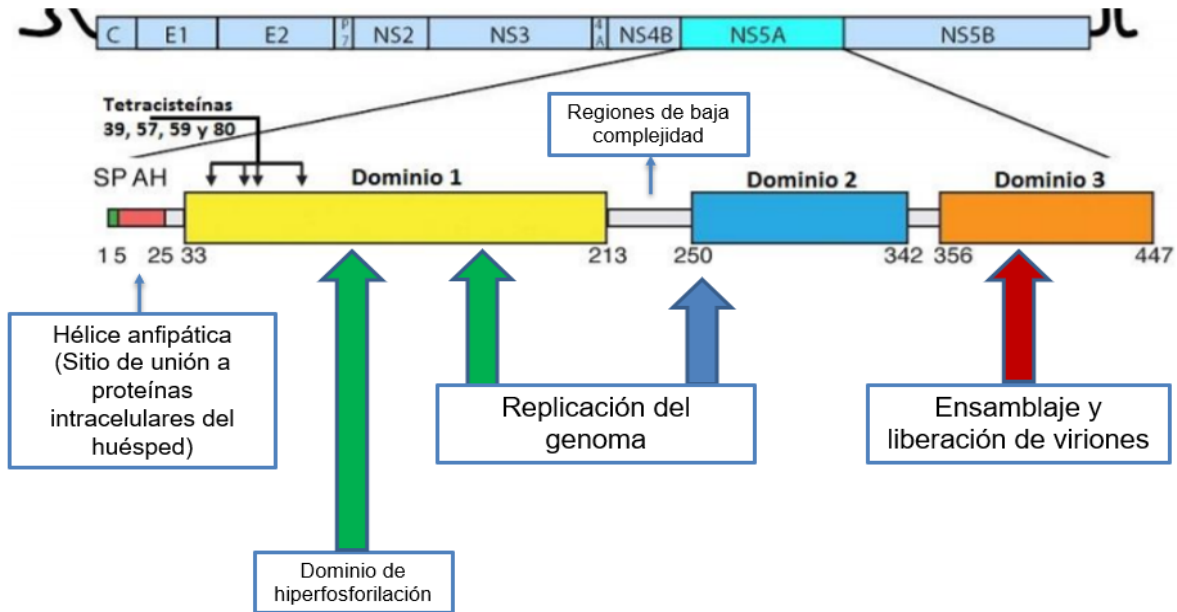
La respuesta nula con los tratamientos AAD se define como, la detección de ARN del VHC en plasma a fin de tratamiento (semana 12).

La recaída con los tratamientos AAD se define como, la detección de ARN del VHC en plasma a las 12 semanas después de la complementar el tratamiento (semana 24).

#### **1.6 Proteína NS5A**

La proteína NS5A del VHC tiene 447 aminoácidos y su forma activa es un homodímero que se organiza en tres ámbitos diferentes, de los cuales el dominio I es el más conservado y con una estructura más compleja (figura 1). Contiene en la región N-terminal un motivo de tetra-cisteína unido a un átomo de zinc, el cual es esencial para la función NS5A, un enlace disulfuro en la región C-terminal, tanto el zinc como el enlace disulfuro contribuyen al mantenimiento del pliegue total de la proteína, contiene un sitio de fosforilación, la NS5A puede existir en un estado fosforilado o en un hiperfosforilado, y un motivo asociado con gotitas de lípidos y con la liberación de los viriones. En la estructura cristalizada de la NS5, se revela al dominio I como un dímero, un surco localizado en medio del dímero se cree es un sitio de unión al ARN. En

contraste con el dominio I, los otros dos dominios son en gran parte desestructurados (Ross-Thriepland. 2015)



**Figura 1.** Características estructurales del dominio I de la proteína NS5A. Se destacan el sitio de fosforilación en la posición 146 (verde), enlace disulfuro, un motivo (tetra-cisteína) de unión con zinc en la posición 39, 57, 59, 80 (negro) y el motivo de unión a partículas de lípidos en la posición 5- 25 (rosa).

### 1.6.1 Funciones de la proteína viral NS5A que la convirtieron en un blanco terapéutico

La NS5A no tan solo es esencial para la replicación viral, también es importante en el ensamblaje de los viriones infectantes. Ambos procesos son independientes, en estos participan los diferentes dominios de la NS5A. Así tenemos que los dominios I y II son esenciales para la replicación del genoma, el dominio III para el ensamblaje y liberación del virión.

Aparte de esto, la NS5A interviene en el entorno de la célula, se han reportado aproximadamente 130 interacciones con diferentes tipos de proteínas celulares (Backes et.al,2010) (Ross-Thriepland, 2015) y por lo tanto, posee diversas funciones que van desde la inhibición de la respuesta antiviral con el INF, a la subversión de las vías de señalización que regulan el

crecimiento celular y la apoptosis (Gehring S, 2009). La NS5A desempeña una función en la unión del retículo endoplasmático con las mitocondrias, causa la fragmentación mitocondrial uniéndose al fosfatidilinositol 4-quinasa III $\alpha$  (PI4KA). Esta unión NS5A-PI4KA hace a las células más resistentes a la apoptosis mediada por mitocondrias. Las múltiples interacciones de la NS5A durante su ciclo viral han hecho de esta una de los principales blancos terapéuticos (Ross-Thrieland.2015).

### **1.7 Los inhibidores de la NS5A del VHC**

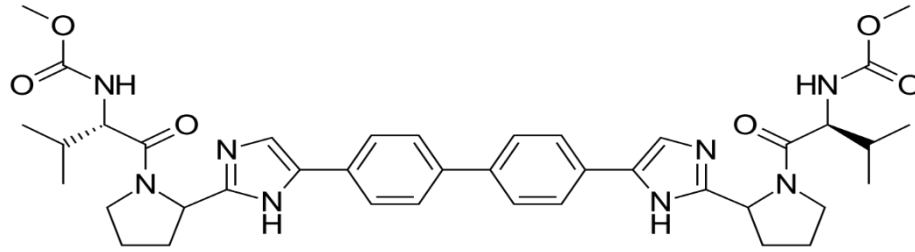
El primer inhibidor de la NS5A fue el daclastavir (DCV) fue escogido por su alto rendimiento de entre compuestos que inhibían la replicación de replicones subgenómicos (SGR) de todos los genotipos del VHC. El DCV se definió como un inhibidor de NS5A en virtud de su falta de efecto sobre las proteínas virales NS3 o NS5B en ensayos enzimáticos *in vitro*, y lo que es más importante, la observación de que el desarrollo de la resistencia al DCV se asoció con mutaciones específicas en la hélice anfipática y/o dominio I de NS5A (Ross-Thrieland, 2015).

Posteriormente fueron saliendo al mercado otros inhibidores de la NS5A para el tratamiento de la infección por VHC como el ledipasvir (LDV), ombitasvir (OBV), elbasvir, velpatasvir, y pibrentasvir, alguno de estos ya sea en combinación con inhibidores de la NS5B, o bien con inhibidores de las proteasas NS3-NS4A.

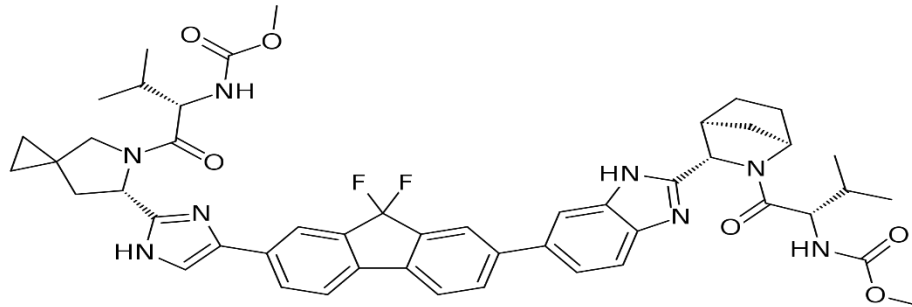
#### **1.7.1 Ledipasvir (componente de Harvoni) aspectos moleculares**

Harvoni es un AAD comprimido con dos componentes antivirales (ledipasvir y sofosbuvir) comúnmente administrado a pacientes con G1a y 1b, con o sin cirrosis, siendo uno de sus principales componentes ledipasvir (LDV), un inhibidor de la proteína NS5A cuya actividad es inhibir los procesos llevados a cabo en el dominio 1 de la misma.

El LDV presenta una similitud en su mecanismo de acción (inhibición de NS5A) y estructura con su variante DVC ( primer AAD contra NS5A); LDV presenta una estructura muy similar al DCV (Figura 2), en la que destacan ciertos aspectos fundamentales como lo son su núcleo central en la molécula, el cual está formado por un grupo bifenilo condensado con un ciclopentano difluorado, ligado por sus dos extremos a sendos anillos imidazólicos (uno de ellos también condensado con el núcleo de bifenilo), 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 ente el LDV y el DCV, 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. Las cadenas de K26, I27 e I28 de las dos  $\alpha$ -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. Los restos R30 y Q54 forman cuatro enlaces de hidrógeno simétricos con el DCV (Figura 2) (Barakat, 2015).



**Daclatasvir**



**Ledipasvir**

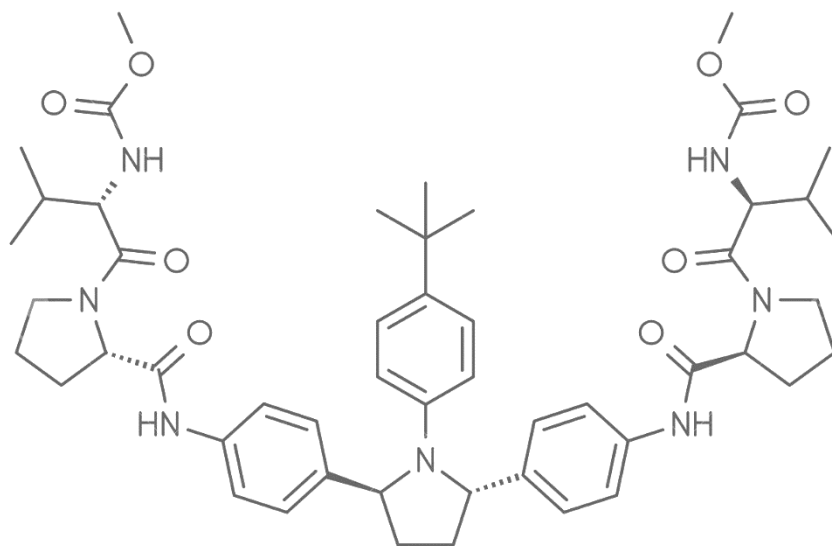
**Figura 2.** Estructura de los inhibidores de la NS5A. Ledipasvir presenta una notable similitud estructural con el daclatasvir.

### 1.7.2 Mecanismo de acción del ledipasvir

El LDV actúa inhibiendo específicamente la proteína NS5A, alterando su localización subcelular, sus procesos de hiperfosforilación e inhibiendo la síntesis de ARN viral. La proteína NS5A es una proteína intensamente fosforilada que, una vez escindida de la poliproteína viral, se transporta a las membranas donde se une a la fracción 3'-terminal del ARN viral recién sintetizado y participa en la replicación del genoma viral, en parte a través de interacciones con la ARN polimerasa dependiente del ARN viral (NS5B).

### 1.7.3 Ombitasvir (Viekira-Pak) aspectos moleculares

Viekira-Pak es un AAD comprimido con 4 componentes principales (ombitasvir, paritaprevir, dasabuvir y ritonavir) administrada a pacientes infectados con G1a y 1b con o sin cirrosis, analizando el estadio de la enfermedad asociada a VHC por efectos de hipersensibilidad al ritonavir y siendo uno de los componentes importantes ombitasvir (OBV) (inhibidor de NS5A). El nombre químico del ombitasvir es dimetil ([(2S,5S)-1-(4-tert-butilfenil)pirrolidina-2,5-diil]) biscarbamato hidrato, el peso molecular para el principio activo es de 975.20 g/mol (hidrato) (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura química de ombitasvir

### 1.7.4 Mecanismo de acción del ombitasvir

El OBV es un inhibidor pan-genómico de la NS5A del VHC (de todos los genotipos 1 a 6), la NS5A es esencial para la replicación del ARN viral y el ensamblaje del virión. El mecanismo de acción del OBV ha sido caracterizado en su actividad antiviral mediante cultivos celulares y con estudios de mapeo de resistencia al medicamento (Advvie,2018).

### **1.7.5 Las variantes asociadas a resistencia (SAR) en la proteína NS5A**

Las funciones e interacciones con los componentes celulares, que desempeña la proteína NS5A en el ciclo de replicación del VHC la hizo un blanco terapéutico válido; sin embargo, cuando la resistencia emerge, y lo hará, siendo uno de los virus más variantes conocidos, representará un problema muy importante de salud. Por lo tanto, es esencial una mejor comprensión de la biología de la proteína viral NS5A, lo cual favorecerá el desarrollo de nuevos tipos de inhibidores (Ross-Thriepland. 2015).

Las variaciones asociadas a resistencia (SAR) a los diferentes fármacos se definen como aquellas sustituciones de aminoácidos en las secuencias de las proteínas no estructurales del VHC, incluidas la proteasa NS3, la proteína NS5A y la polimerasa NS5B, con respecto a secuencias prototipo, que pueden causar la reducción de la actividad antiviral de los inhibidores de las proteínas virales NS3, NS5A y NS5B.

El conocimiento de la resistencia del VHC a los AAD es relativamente nuevo. Se ha reportado que las SAR NS5A están ampliamente presentes en todos los genotipos del VHC, y se han detectado en pacientes con o sin tratamiento con AAD. Algunas de estas SAR confieren cambios que son necesarios en la concentración media efectiva (EC<sub>50</sub>) de las drogas empleadas para erradicar al 50% de los virus, en relación con un aislado de un virus prototipo. La SAR en la NS5A Y93H o L31M inhiben la efectividad de DCV (1600x en el subtipo 1a, 3x en el subtipo 1b, y 537x en el subtipo 3a). La presencia de una o de varias SAR en una misma región incrementa la resistencia. Las SAR NS5A del subtipo 1a tienen su origen en América, las 1b en Europa y las 3a en Asia. Se ha reportado que las SAR NS5A podrían rápidamente producirse durante el tratamiento con los inhibidores de la NS5A. Además, estas SAR podrían permanecer

después de que el tratamiento es retirado, y fácilmente ser transmitidas entre los individuos (Jones BR, 2018).

#### **1.7.6 Las sustituciones asociadas a resistencia (SAR) en la proteína NS5A detectadas en muestras clínicas de pacientes con pre o post-tratamiento con AAD.**

En 313 pacientes japoneses, tratados con SOF/LDV sin previo tratamiento contra VHC subtipo 1b, las SAR en NS5A no fueron detectadas en 133 (42.5%) de los pacientes, y estos obtuvieron una RVS de 98.7%. En los 180 pacientes que albergaron SAR en NS5A, la prevalencia más alta estuvieron localizadas en los aminoácidos: Q54 en un 48.7%, L31 o Y93 en el 19.2%, Y93 en el 13.2%, P58 y Q62 en el 9.9%. Los pacientes con más de tres SAR NS5A, o con las SAR NS5A localizadas en los aminoácidos L31 y Y93 estuvieron fuertemente asociadas con falla al tratamiento con SOF/LDV (Kozuka R, 2018).

En un trabajo de publicado en el 2018, de 493 pacientes japoneses tratados con SOF/LDV, 11(2.2%) tuvieron falla a tratamiento. En estos pacientes se detectaron las SAR de NS5A en la posición Y93 en el 72.7%, Q24 en el 45.5%, y R30 en el 36.6% de los pacientes. Las SAR de NS5B A218 en el 91%, C316 en el 73.3% y A207 en el 45% de los pacientes. La mayoría de los pacientes con falla a tratamiento tuvieron coexistencia de más de dos SAR NS5A (OR=42), y la coexistencia de SAR NS5A P32 más la SAR NS5B A218 y/o C316 asociadas a falla a tratamiento con SOF/LDV (OR=19.3) (Mawatari S. 2018).

En un trabajo más reciente, se obtuvo la prevalencia de SAR de NS5A de 2,409 secuencias de la NS5A publicadas en bancos de genes, el tratamiento más empleado para inhibir a la NS5A fue LDV y DCV. El 16% de las secuencias que provinieron de pacientes sin tratamiento previo, les fueron detectadas más de dos SAR de NS5A, y fueron detectadas mayormente en secuencias

subtipo 1b; las SAR de NS5A>100x (son aquellas SAR que aumentan más de 100 veces la resistencia a los inhibidores de la NS5A) tuvieron una prevalencia de 4.7% y estas fueron detectadas en los aminoácidos 28, 30, 31, y 93 de la proteína NS5A, y similarmente fueron observadas en las secuencias subtipo 1a o 1b (Sharafi, 2019).

En una publicación en el 2017 se analizó secuencias de la NS5A para detectar SAR en 66 aislados de pacientes chinos con CHC sin tratamiento previo, subtipo 1b, no coinfectados con virus de la hepatitis B (VHB) y/o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Treinta y seis (54.4%) albergaron SAR de NS5A, y la más comúnmente detectada fue en Q54H en 15 (42.4%) de los virus de estos pacientes; a esta sustitución se le ha asociado con resistencia al DCV. Otras sustituciones fueron P58S/T y Q62H/R detectadas en el 6% y 9% respectivamente, a estas sustituciones también se les ha asociado con resistencia a DCV, las sustituciones en el aminoácido L28M está asociada a resistencia a DCV/OBV, solamente fue detectada en un paciente, la sustitución en aY93H/N se detectó en los virus de 3 (7.8%) pacientes, asociada con resistencia a DCV/OBV/LDV denominada SAR de NS5A de nivel alto de resistencia (Zhao Li. 2017).

En otro trabajo, se detectó la presencia de SAR de NS5A en 556 pacientes franceses coinfectados con VIH, sin tratamiento previo y con CHC o cirrosis, el 77% con ARN de VIH <50 copias/mL antes de iniciar tratamiento. Solo 22 (3.9%) pacientes tuvieron falla al tratamiento con AAD para VHC, y la falla estuvo asociada a una cuenta de plaquetas <100,000/mm<sup>3</sup>. Los virus de 14 de 22 pacientes fueron secuenciadas y analizadas, 6 (43%) presentaron al menos una SAR en NS5A, 4 de 6 pacientes con G1 y tratados con DCV, les fueron detectadas SAR de NS5A en los aminoácidos Q30R/H y Y93C/N, esta última ha sido asociada a resistencia a DCV; en 2 de 5 pacientes con G1 y tratados con LDV albergaron las

SAR de NS5A en los aminoácidos Y93C, 30E y 58D, sustituciones que llevaron a un alto nivel de resistencia contra los inhibidores de la NS5A (>10 veces la resistencia) creando resistencia a LDV. (Salmon D. 2018)

En otra publicación en 2017 estudió a 257 pacientes brasileños, con CHC, subtipos 1a, 1b y 3a. De ellos, 156 mono infectados con VHC, el 50.6% de estos con previo tratamiento pegINF $\alpha$ -RBV; 101 coinfectados VHC/VIH, el 42.6% de estos con previo tratamiento pegINF $\alpha$ -RBV. Las SAR de NS5A fueron observadas en 22 (8.6%) de los 257 pacientes de ambos grupos, principalmente en aquellos con el subtipo 3a, y en los pacientes mono infectados. Las SAR de NS5A observadas en pacientes mono infectados con VHC subtipo 1a fueron en los aminoácidos M28I, M28L, M28V, y Q30H/R las dos últimas asociadas a resistencia con LDV, DCV, y OBV; en los pacientes con subtipo 1b en los aminoácidos M28V/P, Q30/K, L31/F/V y Y93H las dos últimas asociadas a resistencia a LDV, elbasvir, y velpatasvir; en pacientes con subtipo 3a en los aminoácidos Q30K/S y Y93H. Las SAR NS5A observadas en pacientes coinfectados con VIH y subtipo VHC 1a en los aminoácidos M28I, Q30T, Q30H, Q30R; en los pacientes con 1b coinfectados con VIH en los aminoácidos Y93H; y en los pacientes 3a coinfectados con VIH en los aminoácidos Q30/S. (Malta F, 2017)

En un estudio con 76 pacientes brasileños, 49% con enfermedad crónica de riñón (ECR) hemodializados, y 51% pacientes receptores de trasplante renal (RTR), todos infectados con VHC, con subtipo 1a o 1b, el 52.6% sin tratamiento previo las SAR de NS5A fueron detectadas en el 59% de pacientes RTR vs 36% en pacientes ECR, y en el 47% de pacientes sin tratamiento previo vs 27.8% de pacientes con tratamiento previo de pegINF $\alpha$ -RBV; las SAR en NS5A fueron observadas por igual en el subtipo 1a o 1b. Las SAR NS5A más frecuentemente localizadas en los aminoácidos Q30A/H/L, L31M, H58P/R, P58R/S y P58 + Y93F. No fueron

detectadas SAR NS5A que confieren niveles de alta resistencia a los inhibidores de la NS5A (Rita Tavares et al, 2018).

Otro estudio más reciente en 2019 comparo las diferencias y características de las SAR NS5A entre 120 muestras de pacientes chinos colectadas en 2008 y 122 muestras colectadas en 2016. Los criterios de inclusión fueron pacientes con CHC, sin tratamiento previo, y con los subtipos 1b y 3a. Las SAR de NS5A detectadas en los pacientes con subtipo 1b fueron localizadas en el aminoácido Y93H (5.3% en 2008 vs. 15.9% en 2016;  $p = 0.035$ ), esta sustitución confiere resistencia de nivel medio a alto a DCV, LDV, OBV, y EBR; la sustitución Y93H también fue resistente a EBR y pibrentasvir en pacientes con subtipo 3a. La sustitución L28 en la NS5A, que confiere resistencia a DCV, LDV, y OBV, estuvo presente en un (1.3% en 2008 vs 11.6% en 2016;  $p = 0.027$ ). Las mutaciones en NS5A detectadas en pacientes con subtipo 1b, se localizaron en los aminoácidos R30, L31, P58, Q62 y A92 de los cuales sus porcentajes de detección en el total de secuencias fueron de un 11.6%, 4.3%, 7.2%, 5.8% y 1.4% solo en 2016, a diferencia de las encontradas en 2008 las cuales rondan 3.9%, 1.3%, 2.6%, 5.3% y 3.9%, todas estas sustituciones confieren resistencia a DCV. La importancia de dicho estudio es que la frecuencia general de los SAR de NS5A en 2016 fue significativamente más alta que en 2008 (42.0% vs. 18.4%;  $p = 0.002$ ). Así mismo en este estudio los autores encontraron que los SAR NS5A ocurren naturalmente y que podrían irse acumulando con el tiempo en pacientes infectados con HCV subtipo 1b (Wei Huang, 2019).

## 2. JUSTIFICACIÓN

---

En 2017 el IMSS introdujo los tratamientos antivirales de acción directa para el tratamiento de la hepatitis C: Viekira-Pak (ombistasvir, paritaprevir, ritonavir y dasabuvir) y Harvoni (ledipasvir, sofosbuvir), ambos tratamientos contienen un inhibidor de la proteína viral NS5A, esta proteína está asociada con cambios en el entorno de los hepatocitos y facilita las condiciones de infección y replicación del VHC, lo que la convirtió desde hace varios años en un blanco terapéutico.

Las SAR a los inhibidores de la NS5A se han detectado en virus de pacientes sin tratamiento previo, por lo que pueden producirse en forma natural, e ir acumulándose con el paso del tiempo, por lo tanto, la presencia de SAR preexistentes, pueden atenuar la efectividad de los inhibidores de la NS5A. Por otro lado, las SAR NS5A es muy probable que se vayan produciendo, o bien aumenten las que se producen en forma natural durante el tratamiento con los inhibidores de la NS5A.

No existen estudios en México de la prevalencia de las SAR NS5A tanto pre o post-tratamiento con AAD. Se ha encontrado que detectar la prevalencia de las SAR NS5A pre-tratamiento resulta en un costo-beneficio para las instituciones de salud pública dando una posible predicción a un mejor tratamiento para el paciente, derivando así una posible RVS del 94% al 100% con el uso de un tratamiento con AAD, así mismo es importante detectar las SAR de NS5A en los pacientes con falla al tratamiento con AAD, para así poder ofrecer un tratamiento con inhibidores de la NS5A que sean más efectivos. En este estudio proponemos detectar SAR de NS5A en aislados de pacientes que tuvieron falla al tratamiento con Viekira-Pak o con Harvoni.

## 3. HIPÓTESIS

---

### 3.1 Hipótesis de investigación

Las sustituciones asociadas a niveles altos de resistencia a los inhibidores LDV o OBV de la proteína NS5A, están presentes en las secuencias de la NS5A obtenidas a partir de muestras de pacientes con falla en el tratamiento con Viekira-Pak o Harvoni.

### 3.2 Hipótesis alterna

Las sustituciones asociadas a niveles altos de resistencia a los otros inhibidores de la NS5A, como DCV, EBR, VPV, y PBV, están presentes en la secuencia de la NS5A obtenida de muestras de pacientes con falla al tratamiento con Viekira-Pak o Harvoni.

### 3.3 Hipótesis nula

Las sustituciones asociadas a niveles altos de resistencia a los inhibidores de la NS5A actualmente conocidos, no están presentes en la secuencia de la proteína NS5A obtenida a partir de muestras de pacientes con falla al tratamiento con Viekira-Pak o Harvoni.

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Hoy en día el desarrollo de potentes medicamentos antivirales de acción directa (ADD) dirigidos específicamente a bloquear proteínas en el mecanismo de replicación viral, son el principal punto de partida en el tratamiento contra el virus de hepatitis C.

Los fármacos: Harvoni y Viekira Pak en 2017 fueron los primeros AAD introducidos en el sector salud público en México, como un tratamiento viable, aunque la inserción de dichos medicamentos es eficiente para la eliminación del virus, no se puede dejar de lado la posible resistencia a dichos fármacos en los pacientes tratados con AAD, a pesar de que la probabilidad de resistencia sea muy baja.

El propósito de este estudio es detectar SAR en las secuencias de la NS5A viral de pacientes no respondedores al tratamiento con los fármacos Harvoni o Viekira Pak.

## 5. OBJETIVOS

---

### *General*

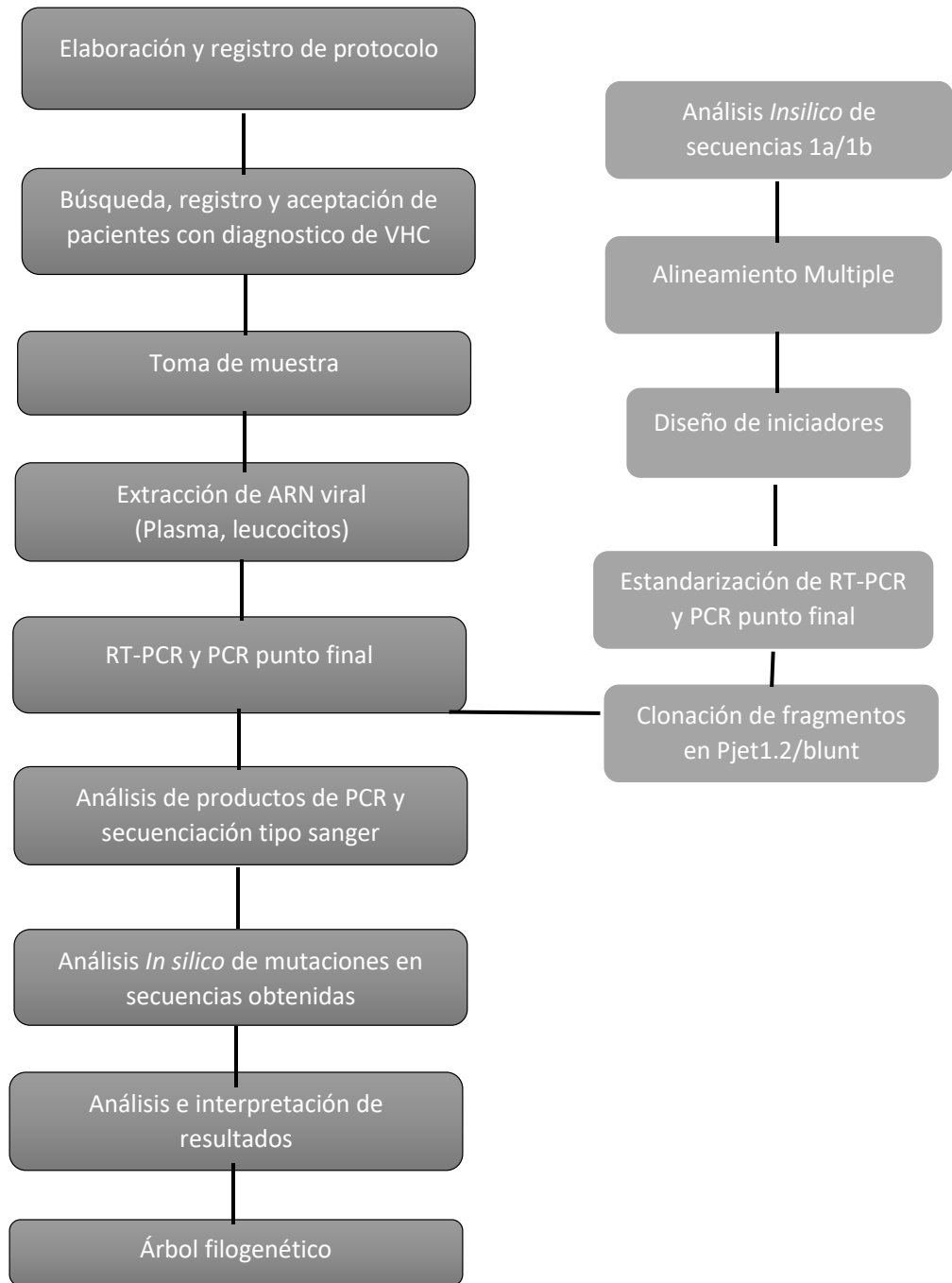
- Detectar y analizar las SAR en secuencias de la proteína NS5A VHC, obtenidas a partir de muestras de pacientes con falla al tratamiento con AAD de nueva generación.

### *Particulares*

- Detectar y reclutar pacientes del servicio de gastroenterología (clínica de la hepatitis), que estuvieron en tratamiento durante los años 2017-2019, y los cuales cumplan con los criterios de inclusión abajo descritos.
- Diseñar iniciadores para PCR para la detección de la región NS5A del VHC.
- Estandarizar las pruebas de RT-PCR y PCR anidado, ambas en punto final, para obtener la región NS5A.
- Obtener fragmentos de la región NS5A VHC por PCR a partir de muestras de suero, plasma o leucocitos de los pacientes con falla al tratamiento con Viekira-Pak o Harvoni.
- Generar una biblioteca de fragmentos de la proteína NS5A por clonación en un vector Pjet1.2/Blunt.
- Secuenciar los productos de PCR por el método de Sanger.
- Analizar las secuencias para detectar SAR a los inhibidores de la proteína viral NS5A.
- Obtener un árbol filogenético con las secuencias obtenidas y con las secuencias de NS5A de bancos de genes.

## 6. METODOLOGÍA

---



## **6.1 Elaboración del protocolo**

### **6.1.1 Diseño de estudio**

Por objetivo: Descriptivo

Por asignación del agente: Observacional

Por temporalidad: Transversal

Por la recolección de datos: Ambispectivo

Por el grupo de estudio: Homodémico

### **6.1.2 Ubicación espacio temporal**

El protocolo se realizó en el laboratorio de Virología Médica, del Centro de Investigación Biomédica de Oriente.

### **6.1.3 Muestreo**

#### **6.1.3.1 Universo de población**

Pacientes infectados con el VHC, que asistieron a recibir el tratamiento con Viekira-Pak o Harvoni, en la Clínica de la Hepatitis del Hospital de Especialidades, CMN MAC, Puebla, Puebla, de junio de 2017 a diciembre de 2019 (post-tratamiento).

#### **6.1.3.2 Definición de la población en estudio**

Pacientes infectados con VHC, no respondedores al tratamiento con los antivirales de acción directa (Viekira-Pak o Harvoni).

### **6.1.3.3 Criterios de selección de muestra**

#### **Criterios de inclusión**

- Mujeres y hombres
- Mayores de 18 años
- No respondedores al tratamiento con los AAD (Viekira-pak o Harvoni)
- Pacientes con experiencia previa con el tratamiento pegINF $\alpha$ -RBV
- Pacientes sin experiencia a cualquier tratamiento contra VHC (*naïve*).
- Con hepatitis C crónica o Cirrosis Child Poug A, B y C.

#### **Criterios de exclusión**

- Paciente que no acepte participar y donar su muestra sanguínea al estudio
- Pacientes no respondedores al tratamiento con AAD con carga viral <10,000 UI/ml

#### **Criterios de eliminación**

- Muestras de pacientes que en almacenamiento se hayan hemolizado

### **6.1.4 Diseño y tipo de muestreo**

- Muestreo no probabilístico por conveniencia

### **6.1.5 Tamaño de muestra**

- De 2 a 6 pacientes no respondedores al tratamiento de AAD

### 6.1.6 Definición de variables y escalas de medición

#### Variable dependiente

Las sustituciones asociadas a resistencia a los inhibidores de la proteína viral NS5A.

#### Variables independientes

Tratamiento con Viekira-Pak, tratamiento con Harvoni, pacientes con o sin previo tratamiento con pegINF $\alpha$ -RBV.

### 6.1.7 Definición conceptuales y operacionales de las variables de estudio

**Tabla 1 .** Escalas de medición de las variables a estudiar

Variable	Escala de medición	Valores	Instrumento
Género	Nominal	Mujer o hombre	Hoja de recolección de datos
Edad	Cuantitativa discreta	>18 años	Hoja de recolección de datos
Paciente naïve	Nominal dicotómica	Sí, no	Expediente
Tratamiento con Viekira-Pak	Nominal dicotómica	Sí, no	Expediente
Tratamiento con Harvoni	Nominal dicotómica	Sí, no	Expediente
Sustituciones asociadas a resistencia (SAR)	Nominal dicotómica	Sí, no	Análisis de la secuencia NS5A, con respecto a una secuencia NS5A prototipo
Sustituciones asociadas a niveles altos de resistencia	Nominal dicotómica	Sí, no	Análisis de la secuencia NS5A, con respecto a una secuencia NS5A prototipo

## **6.2 Separación de leucocitos**

Se tomó un tubo con la muestra del paciente, se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 min para separar las fases necesarias, se separó el plasma en un tubo limpio y almacenó a 4°C, se retiraron los leucocitos con micropipeta y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 5 ml, añadiendo 2 ml de solución de hemólisis e incubando a 4 °C durante 10 min, al terminar se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 min verificando el botón de leucocitos en la parte inferior del tubo (botón blanco) retirando y desechando la solución de hemólisis, así mismo se añadieron 2 ml más de la misma, suspendiendo las células en el tubo y repitiendo el procedimiento anterior hasta la completa separación de la solución; a continuación las células se lavaron con 1 ml más de solución de hemólisis y se incubó nuevamente a 4 °C durante 5 min; al terminar y separar la solución se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 min y se retiró por completo la solución de hemólisis añadiendo a continuación 1 ml de solución salina para lavar las células; se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 min y se retiró la solución; por último, se añadió 1 ml más de solución salina para su almacenamiento a -20°C.

## **6.3 Extracción de ARN viral**

### **6.3.1 Extracción de ARN a partir de leucocitos**

Las células se suspendieron inicialmente en PBS 1x en frío, se añadieron 500 µl de Trizol en frío al tubo con la muestra y se mantuvo en vórtex durante 10 min a temperatura ambiente, al terminar se adicionaron 200 µl de cloroformo en frío, manteniendo en agitación a pulso con vórtex (o la mano) durante 30 s; y en agitación en vórtex durante 10 min; a temperatura ambiente; a continuación, la muestra (siempre mantener en frío a 4°C preferentemente) se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min; verificando al terminar la formación de tres

fases, transfiriendo a un nuevo tubo la fase acuosa (contenido de ARN) y añadiendo 500  $\mu$ l de isopropanol en frío (verificar la formación de un anillo en la parte inferior), se agitó por inversión durante 5 min y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 10 min; se retiró el sobrenadante y se añadió 500  $\mu$ l de etanol al 70% en frío, se mantuvo en agitación durante 5 min en vórtex y se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 min, al terminar se decantó el sobrenadante en una superficie absorbente y se dejó secar el botón de ARN; por último se añadieron 50  $\mu$ l de agua inyectable en frío y se hicieron alícuotas de la muestra de ARN en 10 viales de 5  $\mu$ l cada uno para su almacenamiento a -80 °C.

### **6.3.2 Extracción ARN en plasma o suero**

La extracción de ARN se realizó siguiendo la metodología especificada en el inserto del sistema comercial (SC) QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), toda la reacción se llevó a cabo en hielo para evitar la degradación del ARN. Se agregaron 560  $\mu$ l del bufer AVL que contiene un volumen de ARN Carrier a un tubo de 1.5 ml, se agregaron al mismo 140  $\mu$ l de plasma, suero o células y se colocó en vórtex 5 s; se incubó enseguida a temperatura ambiente por 10 min, a la mezcla se le dio un pulso de centrifuga para precipitar los componentes. A continuación, se añadieron 560  $\mu$ l de etanol al 96% y se colocó en vórtex 15 s; seguido de un pulso para precipitar, cuidadosamente se aplicó 630  $\mu$ l de la mezcla anterior en una columna QIAamp con un tubo recolector de 2 ml, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm por 1 min a 4°C, paso que se repitió de 2-3 veces dependiendo de la cantidad de pases por la membrana (Verificar la capacidad de la membrana para evitar saturación), cuidadosamente se añadieron 500  $\mu$ l de buffer AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm por 4 min, enseguida la columna se colocó en tubo de 1.5 ml y se añadió 80  $\mu$ l de bufer AVE a temperatura ambiente y se incubó por 1 min, finalmente se centrifugó bajo las mismas condiciones y se almacenó a -80°C.

### **6.3.3 Integridad de ARN**

La medición de integridad de ARN se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la presencia y el patrón de migración del ARN en relación con un marcador de peso molecular (1000 kb).

### **6.3.4 Concentración de ARN**

La medición de la concentración se realizó en un nanofotómetro (ImplenNanoPhot\_16), para determinar las concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  y verificar las relaciones de absorbancia a 260/280 y 260/230.

## **6.4 Recursos bioinformáticos**

### **6.4.1 Herramientas de diseño**

#### **6.4.1.1 Análisis de secuencias**

##### **- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - NCBI – NIH (Versión.1.14)**

BLAST encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la significancia estadística.

#### **6.4.1.2 Diseño de Oligonucleótidos iniciadores**

##### **- IDT's PrimerQuest incorporates Primer software (Versión 2.2.3) y IDT's Oligo Analyzer (Versión 3.1)**

Programa informático de análisis de oligonucleótidos iniciadores. El programa ubica y calcula propuestas de iniciadores a partir de secuencias de nucleótidos de cualquier origen.

### **6.4.1.3 Alineamiento múltiple**

#### **-EMBL-EBI-Clustal Omega (Versión.2017)**

Clustal es un programa de computadora ampliamente utilizado para realizar alineamientos múltiples de secuencias (DNA, RNA y proteínas).

### **6.4.2 Análisis bioinformático**

A partir de una búsqueda en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) se realizó la búsqueda de secuencias del genoma completo del VHC (G1a y G1b) identificando las regiones codificantes de la proteína NS5A las cuales fueron analizadas por alineamiento múltiple en BLAST (Versión 1.14).

### **6.4.3 Diseño de iniciadores para obtener la región NS5A del VHC genotipos 1a y 1b**

Como secuencias prototipo se usaron las secuencias EU482864.1 (G1a) y EU256081.1 (G1b) provenientes de pacientes sin tratamiento previo y diagnóstico de CHC genotipo G1a y G1b, para el diseño de los iniciadores de la NS5A G1a y G1b (Kuntzen, 2008).

### **6.4.4 Diseño de iniciadores degenerados NS5A genotipo 1a/1b**

Se tomaron como base las secuencias EU256081.1 (G1b) y EU482864.1(G1a) (Kuntzen, 2008). Para el diseño manual se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias NS5A-1a/1b en EMBL-EBI-Clustal Omega (Versión.2017).

## 6.5 RT-PCR

### 6.5.1 Preparación de material y mantenimiento de reactivos

El material utilizado para la reacción se esterilizó mediante radiación UV durante 15 min antes de realizar el procedimiento. Todos los reactivos y ARN extraído se sacaron de congelación y posteriormente se mantuvieron en frío a 4°C antes y durante el procedimiento.

### 6.5.2 Obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído de las muestras

Se realizó una reacción de 20 µl de acuerdo con el instructivo del SC RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo) (Tabla 2), se preparó la primera reacción e incubó por 5 min a 65°C, para después enfriar y bajar la mezcla con un pulso por centrifugado, después se le añadió una segunda reacción para completar los 20 µl y se colocaron en el termociclador a 1 ciclo de 25°C por 5 min, 45°C por 60 min, 70°C por 5 min y 4°C constante para su almacenamiento, el DNAc obtenido se almacenó a -80°C para su procesado.

**Tabla 2.** Reacción de RT-PCR para 20 µl

Reacción 1 RT-PCR	
ARN molde	8 µl
Hexámeros de secuencia aleatoria	1 µl a 100mM
Agua libre de nucleasas	3 µl
Reacción 2 RT-PCR	
5x Bufer	4 µl
Ribolok inhibidor de RNasa 20 U/µl	1 µl
Mezcla de nucleótidos	2 µl a 10mM
Transcriptasa reversa H Minus 200 U/µl	1 µl

### 6.5.3 Primera ronda de PCR y PCR anidado

El material utilizado para la reacción se sometió al mismo proceso de esterilización mencionado anteriormente. Se realizó una reacción de PCR de 20 – 40  $\mu$ l dependiendo de la disponibilidad de ADNc al momento de realizar el proceso (Tabla 3). Después de realizar la mezcla de la reacción se colocó en el termociclador bajo los siguientes parámetros: 40 ciclos a 94°C por 2 min, 94°C por 40 s, la temperatura de alineamiento varió de acuerdo a la Tm de los iniciadores utilizados, 72°C por 1 min, 72°C por 10 min y 4°C constante para su almacenamiento a -80 °C.

**Tabla 3.** Reacción de PCR de 20  $\mu$ l

Reacción PCR 1ra ronda	
Bufer 2x Mastermix Promega	20 $\mu$ l
Oligo sentido 1aNS5AaIs	1.6 $\mu$ l a 10 mM
Oligo anti sentido 1aNS5AaIa	1.6 $\mu$ l a 10 mM
SO <sub>4</sub> Mg	3.2 $\mu$ l a 5 mM
Agua	5.6 $\mu$ l
ADN molde	8 $\mu$ l
TOTAL	40 $\mu$ l

\*La reacción de PCR anidado, es similar a la de la primera ronda de PCR, solo hace la diferencia que el ácido nucleico blanco empleado es el producto de la primera ronda de PCR (Tabla 3)

## 6.6 Proceso para la obtención de plásmidos

### 6.6.1 Preparación de células competentes

Se cultivaron células *E. coli* cepa Top 10 en 10 ml de medio líquido Luria Bertani (LB) por 3 h a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0.6-0.7, después se empaquetaron en microtubos

de 2 ml y se centrifugó a 4000 rpm a 4°C durante 10 min; se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 350 µl de CaCl<sub>2</sub> 0.1M (frío) y se centrifugó bajo las mismas condiciones, para después decantar y resuspender la pastilla en 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 0.1M (frío), en el caso de que se quiera almacenar a -80°C se le añadieron 50 – 100 µl de glicerol.

### **6.6.2 Clonación en vector pJET1.2/Blunt**

Para la clonación de fragmentos VHC1a y VHC1b se usó el SC CloneJET PCR Cloning de Thermo Scientific con modificaciones en el protocolo sugerido por el fabricante (Tabla 4), para ello se generó una mezcla para la primera reacción, la cual al finalizarla se colocó en vórtex y se centrifugó de 3-5 s, al terminar, la mezcla se incubó a 70°C por 5 min y se dejó reposar en hielo durante 5 min aproximadamente. Para la reacción de ligación todos los reactivos se añadieron manteniendo la mezcla en hielo, al terminar se colocó en vórtex y se centrifugó durante 3-5 s, la reacción para finalizar se incubó a temperatura ambiente 22°C por 5 min (por cada 0.5 kb) o 10 min (por cada 1 kb), y se cultivaron en placas de agar LB con ampicilina 50 mg/ml durante 18 h a 37°C a 220 rpm, para después aislar las clonas en tubos de fondo redondo con medio líquido LB con ampicilina 50 mg/ml para su extracción.

**Tabla 4.** Reacción de ligación.

Reacción 1 Ligación	
Bufe 2x	10µl
Producto purificado PCR	1µl
Agua libre de nucleasas	6µl
Enzima Bluting DNA	1µl
Reacción 2 Ligación	
Pjet1.2/Blunt cloning vector	1µl a 50 ng/µl
T4 DNA ligasa	1µl a 5 U/µl

### 6.6.3 Extracción de plásmido

Se utilizó el SC Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Inicialmente, se añadieron a un tubo de 1.5 ml, 600 µl de bacterias en LB líquido se centrifugó a 16,000 xg por 2 min y se desechó el sobrenadante, para agregar de nuevo 600 µl y concentrar el paquete celular, se añadieron 100 µl de 7x bufer de lisis (azul) y se mezcló por inversión de 4-6 veces dejando reposar la muestra 4 min (después de adicionar el bufer la solución cambió a un color azul opaco, lo cual indica la lisis completa), al terminar se añadieron 350 µl de bufer de neutralización en frío (amarillo) y se colocó en vórtex por 5 s para después mezclar por inversión 2-3 veces para asegurar la completa neutralización (la mezcla cambio a un color amarillo al completar la neutralización y a su vez se generó un precipitado en todo el tubo), la muestra se centrifugó a 16,000 g durante 4 min, para después transferir el sobrenadante ( ~900 µl) a una columna Zymo spin HN, se colocó en un tubo recolector y se centrifugó 30 s, se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de Endo wash buffer para después centrifugar 30 seg, se añadió 400 µl de Zyppy wash buffer y se centrifugó 1 min (Repetir 1 vez más el lavado), después de terminar se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 ml y se añadió 30 µl de bufer de elución para

dejarlo reposar 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 30 s y se repitió nuevamente el proceso, para después almacenarlo a -80 °C.

### **6.7 Proceso de digestión de plásmidos con enzimas de restricción y liberación de fragmentos**

Se hicieron reacciones de 20 µl para cada muestra de DNA plasmídico obtenido, identificando en cada uno de los diseños del plásmido los sitios de restricción específicos para liberar el fragmento insertado y a su vez linealizar el producto para comparar por medio de su peso molecular en un gel de electroforesis al 1%.

### **6.8 Secuenciación por el método Sanger**

El proceso de secuenciación se realizó por el método Sanger automatizado, las muestras se enviaron al Laboratorio Langebio ubicado en el CINVESTAV- Irapuato.

### **6.9 Análisis de las secuencias**

#### **6.9.1 Edición de Secuencias de nucleótidos**

Para la edición de las secuencias se usó el programa Chromas (versión 2.6.6), elimina las zonas inservibles ubicadas antes del iniciador de reconocimiento en el electroferograma, dicha secuencia obtenida es sometida a un alineamiento en BLAST contra secuencias del banco de genes, en caso de obtener un porcentaje de identidad >90%.

#### **6.9.2 Construcción de secuencias consenso por alineamiento**

La construcción de la secuencia consenso se llevó a cabo mediante la herramienta Seqman pro17 del software de análisis DNASTAR, las secuencias obtenidas de cada uno de los pacientes se someterán a un alineamiento múltiple y se ubicara cada una en su respectiva dirección (5´ o 3´).

### **6.9.3 Traducción de las secuencias y alineamiento**

La traducción de las secuencias se realizó con la herramienta de transcripción y traducción de Biomodel (UAH). El alineamiento de las mismas usando la herramienta MEGA-X (versión 10.0.5). Las secuencias traducidas posteriormente se sometieron a alineamiento múltiple para ser analizadas.

### **6.9.4 Árbol filogenético**

El árbol filogenético se realizó con la herramienta MEGA-X. Se hizo uso de las secuencias obtenidas de los pacientes NR y de los pacientes con RVS a AAD, y de secuencias obtenidas del banco de genes (60 por genotipo) para evaluar su posible origen, el tipo de árbol, y método de evaluación se adaptó a las necesidades del estudio.

## **7 RESULTADOS**

---

### **7.1 Pacientes**

#### **7.1.1 Pacientes no respondedores al tratamiento con AAD**

Noventa pacientes con HCC de la Clínica de la Hepatitis del Hospital de Especialidades, CMN MAC, Puebla, Puebla, entraron a tratamiento con alguno de los fármacos Harvoni o Viekira Pak durante el período comprendido de diciembre de 2018 a septiembre 2019. Dos (2.2%) pacientes fueron no respondedores (NR), cumplieron con los criterios de inclusión para ser incluidos en el estudio les fue entregada una carta de consentimiento informado (Anexo 1), y así aceptaron formar parte del estudio, se les tomó una muestra de sangre periférica 2 tubos (tapa morada EDTA y de tapa roja sin anticoagulante) por paciente, las muestra fueron tomadas post-tratamiento con los ADD, se obtuvieron sus datos de sus expedientes, tales como la carga viral

inicial, a fin de tratamiento, y a las 12 semanas post-tratamiento, así se pudo determinar en qué semana se les consideró como pacientes NR. Uno como respuesta nula (7) y otro como probable recaída (8) (tabla 5)

### 7.1.2 Pacientes que obtuvieron RVS al tratamiento con AAD

A seis pacientes del grupo de los 90 pacientes se les tomó una muestra de sangre periférica (2 tubos, uno con EDTA y uno sin anticoagulante), las muestras se tomaron pre-tratamiento, los datos se obtuvieron de los expedientes. Se recabaron datos de carga viral inicial, a las 12 semanas post-tratamiento y al final del tratamiento. Cinco tuvieron G1a y uno G1b; todos tuvieron carga viral no detectada a fin de tratamiento, y 12 semanas después se comprobó que alcanzaron RVS (Tabla 5).

**Tabla 5.** Pacientes con hepatitis C crónica, con RVS y NR al tratamiento con cualquiera de los fármacos Harvoni o Viekira Pak

No	Sexo	Edad	Diagnóstico Estadio de la enfermedad hepática	Genotipo VHC	Carga viral inicial UI/ml	Carga viral 12 sem (fin de tratamiento)	Carga viral 12 sem después de fin de tratamiento	Tratamiento AAD	Respu es ta
P01	H	60	Cirrosis CP-A	1a	163,086	ND	ND	Harvoni+RBV	RVS
P02	M	65	Cirrosis CP-A	1a	81,166	ND	ND	Harvoni	RVS
P03	M	69	Cirrosis CP-B	1a	107,087	ND	ND	Harvoni	RVS
P04	M	62	Cirrosis CP-B	1a	67,801	ND	ND	Harvoni	RVS
P05	H	52	Cirrosis CP-A	1b	367,900	ND	ND	Harvoni	RVS
P06	M	54	Cirrosis CP-A	1a	168,806	ND	ND	Harvoni	RVS

*naïve* = sin previo tratamiento con Interferon alfa más ribavirina (INF-RBV), o con antivirales de acción directa (AAD);

No	Sexo	Edad	Diagnóstico	Genotipo VHC	Carga viral inicial UI/ml	Carga viral 12 sem (fin de tratamiento)	Carga viral 12 sem después de fin de tratamiento	Tratamiento AAD	Respu es ta
P07	H	58	Cirrosis CP-B	1b	1,030,787	1,400,000	-	Harvoni	NR
P08	M	39	Hepatitis crónica	1a	6,909	ND	13,741	Viekira Pak	NR

Harvoni = Ledispavir/Sofosbuvir±Ribavirina; Viekira Pak = Dasabuvir, ombitasvir, paritaprevir y ritonavir

ND= carga viral no detectada, - =No se realizó

## **7.2 Diseño de los iniciadores**

### **7.2.1 Análisis bioinformático**

Debido a la gran variabilidad del VHC y la limitada cantidad de secuencias de muestras mexicanas completas, se optó por utilizar todas las secuencias que contaran con la región codificante NS5A conservada, esto para generar iniciadores específicos para el G1a y G1b más un extra de iniciadores degenerados para eliminar el factor de variabilidad en caso de no poder amplificar la región objetivo con los iniciadores específicos.

Se obtuvieron 200 secuencias de VHC de la base de datos GenBank para este estudio, y 120 fueron elegidas para el diseño de iniciadores: 60 del genotipo 1a y 60 del genotipo 1b, con un porcentaje de identidad de >95% (todas las secuencias <95% fueron discriminadas) para mantener su especificidad y evitar generar un iniciador degenerado que complicara su amplificación obteniendo fragmentos inespecíficos; Se identificó en cada una de ellas la región codificante de la proteína NS5A, tomando como referencia para el diseño de iniciadores una secuencia de cada genotipo con un valor del 100% de identidad conservada en la región NS5A (Anexo 2).

### **7.2.2. Diseño de los iniciadores específicos para la región NS5A para el genotipo 1a**

Se utilizó el programa IDT's PrimerQuest (Versión 2.2.3) y se obtuvieron iniciadores a partir de la secuencia EU482864.1 con características fisicoquímicas no óptimas, por lo cual se optó por el diseño manual, en el que se usó el programa IDT's PrimerQuest (Versión 3.1). Las características fisicoquímicas requeridas fueron elegidas de acuerdo a las secuencias estudiadas (Tabla 6).

**Tabla 6.** Características fisicoquímicas de iniciadores

Características fisicoquímicas	
<b>Tm</b>	Min-63°C Opt-64°C Max-65°C
<b>%GC</b>	Min-49% Opt-50% Max-55%
<b>Tamaño (Size)</b>	Min-20 pb Opt-22 pb Max-25 pb
<b>Heterodímeros</b>	Opt-<4 kcal/mol
<b>Homodímeros</b>	Opt-<4 kcal/mol
<b>Específicas</b>	No A o T en iniciales o terminales,  No tándems (> 4 A o T, G o C juntas)  $\Delta G = + o 0$

A partir de la secuencia EU482864.1 se delimitó la región NS5A G1a, que inicia en el nucleótido 5'-6,191 y termina en nucleótido 7,535-3' abarcando un marco de lectura de 1,344 pb. 60 secuencias del genotipo 1a (Anexo 2), con un porcentaje de identidad de >95% se utilizaron para diseñar los iniciadores de NS5A G1a. Se obtuvieron un par de iniciadores en los extremos, y dos pares más, como anidados (tres iniciadores anidados con la función sentido y antisentido a la vez), para obtener la opción de fragmentos más pequeños (Figura 4). Las características fisicoquímicas requeridas para el diseño se eligieron de acuerdo a las secuencias estudiadas (Tabla 6) (Anexo 3). Estos 9 iniciadores (Tabla 7) permitieron obtener en fragmentos a la región NS5A G1a (Figura 4).

Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V459/2006, complete genome

GenBank: EU482864.1

```
6181 cactccatgctctgattcctgggtaagggacatctgggactggatatgcgaggtgctgag
6241 cgactttaagacctgggctaaaagctaagctcatgccgcaactgectggggttccctttgt
6301 gtccctgccaacgctggatataagggggtctggcgaggggacggcatcatgcacactcgctg
6361 ccaactgtggggctgagattactggacatgtcaaaaacgggacgatgaggatcgctcggctc
6421 taggacctgcaggaacatgtggagtgggaccttcccatcaatgactacaccacgggcc
6481 ttgcactcccccttctgcgccgaactacacgttcgcgctgtggaggggtgtctgcagagga
6541 gtacgtggagataaggcaggtgggggacttccactacgtgacgggatgaccactgacaa
6601 tcttaagtgcccgctgccagggtcccatcgccgaatttttcacagaattggacgggggtcg
6661 cctacataggttcgcccccttgaagcccttgttgggggaggaggtatcattcagagt
6721 aggactccatgagtaccgggtgggatcgcaattaccttgcaaccgaaccggatacggc
6781 cgtggtgacgtccatgctcactgatccctcccatataacggcagaggcggccaagaggag
6841 gctggcgagagggtcacccttccactagccagctcctcagccagccaactgtccgctcc
6901 atctctcaaggcaacttgaccgccaaccacgactccctgacgccgagctcatagaggc
6961 taacctcctatggaggcaggagatgggcggaacatcaccagggttgagttagagaacaa
7021 agtgggtgattctggactccttcgatccgcttgtagctgaggaggatgagcgggagatctc
7081 cgtaccgcagaaatcctgcggaagtctcggagattcgccaggccctgcccgtttgggc
7141 gcgcccgattacaaccccccgctgggtggagacgtggaaaagcctgactacgaaccacc
7201 tgtggtccacggctgcgcaactccacctccgcagtccctcctgtgectccacctcggaa
7261 gaagcggacgggtggtcctcaccgaatcaaccgtgtctactgccttgccgaactcgccac
7321 caagagttttggcagttcctcaactccggcattacgggacgatacgcacgacaccctc
7381 tgagaccgccccttctggccacctccagactccgacactgagtcctattcctccatgcc
7441 cccctagagggggagcctggggatccggatctcagcgacgggtcatggctgacggtcag
7501 tagtggggccgacgcgaggacgctcgtgtgttgcctcgatgtcttatacct
```

**Figura 4.** Mapa de oligonucleótidos NS5A genotipo 1a. RN1aNS5As y RN1aNS5Aa (amarillo), RN1aNS5AaIs y RN1aNS5AaIa (verde), RN1aNS5AaIIs y RN1aNS5AaIIa (Azul), Región codificante NS5A (café).

**Tabla 7.** Concentrado de iniciadores de la región NS5A genotipo 1a

Nombre	Oligonucleotidos 5'-3'	Tm	%GC	Tamaño
<b>RN1aNS5As</b>	<sup>6290</sup> GTT CCC TTT GTG TCC TGC CAA C <sub>6312</sub>	58.8 °C	54.5%	22 pb
<b>RN1aNS5Aa</b>	<sup>7436</sup> GGA GGA ATA GGA CTC AGT GTC <sub>7415</sub>	54.1 °C	52.4%	21 pb
<b>RN1aNS5AaIs</b>	<sup>6458</sup> CAT CAA TGC CTA CAC CAC GG <sub>6476</sub>	56.1 °C	55%	20 pb
<b>RN1aNS5AaIa</b>	<sup>7302</sup> CAG TAG ACA CGG TTG ATT CGG TG <sub>7279</sub>	57.6 °C	52.2%	23 pb
<b>RN1aNS5AaIs/a</b>	<sup>6476</sup> CCG TGG TGT AGG CAT TGA TG <sub>6458</sub>	56.1 °C	55%	20 pb
<b>RN1aNS5AaIIs</b>	<sup>6699</sup> GGG AGG AGG TAT CAT TCA GAG TAG G <sub>6723</sub>	57.6 °C	52%	25 pb
<b>RN1aNS5AaIIa</b>	<sup>7204</sup> CAC AGG TGG TTC GTA GTC AG <sub>7185</sub>	55.1 °C	55%	20 pb
<b>RN1aNS5AaIIs/a</b>	<sup>6723</sup> CCT ACT CTG AAT GAT ACC TCC TCC C <sub>6699</sub>	57.6 °C	52%	25 pb
<b>RN1aNS5AaIIa/s</b>	<sup>7185</sup> CTG ACT ACG AAC CAC CTG TG <sub>7204</sub>	55.1 °C	55%	20 pb

### 7.2.3 Diseño de iniciadores específicos de la región NS5A genotipo 1b

Con la secuencia EU482864.1 se delimitó la región NS5A G1b y parte de la NS4B, la región delimitada inicia en el nucleótido 3´-6,206 de la NS4B terminando en el nucleótido 7,547-3´, de la NS5A abarcando un marco de lectura de 1366 pb (Figura 5). El diseño de los iniciadores, se realizó usando el procedimiento mencionado anteriormente.

Hepatitis C virus subtype 1b isolate HCV-1b/CH/BID-V293/2002, complete genome

GenBank: EU256081.1

```
6121 cactcagatcctctccagccttaccatcactcagttgttgaagaggctccaccaatggat
6181 taacgaggactgctccacgccaatgctccggctcgtggttgccggatggttgggactggat
6241 atgcaeggtggttgactgacttcaagaactggctccagtcacaagctcctgccgcggttacc
6301 ggggggtccccctttctctcgtgccaacgcgggtacaagggagtctggcggggagatggcat
6361 catgcaaaccacctgcccattgtggagcacagattaccggacatgtcaaaaacggttccat
6421 gaggatcgttgggcctagaacctgcagtaaacacgtggcacggaacattccccatcaacgc
6481 atacaccacgggcccctgcacgccctccccggcgcccaactattccagggcgctgtggcg
6541 ggtggccgctgaggagtacgtggaggttacgcgggtgggggatttccactacgtgacggg
6601 catgaccactgacaacgtaaaagtgcccggtccagggtccggcccccgaaattcttcacaga
6661 agtggatgggggtgcccgtgcacaggtacgccccggcggtgcaaacctctcctacgggatga
6721 ggtcacattccagggtcgggtcaaccaatactggtcgggtcacagctcccatgcgagcc
6781 ggaaccggatgtagcgggtgctcacttccatgctcaccgacccctcccacatcacggcaga
6841 gacggctaagcgtaggctggccagggggtctccccctccttggccagctcttcagctag
6901 ccagttgtctgcgccctccttgagggcgacatgcaactaccgctcatgactccccagatgc
6961 cgacctcattgaggccaacctcctgtggcggcaggagatgggcggaaacatcaccccgct
7021 ggagtctgaaaataaggtagtaattctggactctttcgaccgccttcgagcggaggagga
7081 cgagaggggaagtatccatcccggcggaaatcctgcggaatccaagagattccccgcagc
7141 gatgcccatatgggcacggccggattacaacccccactgatagagctcctggaaggacc
7201 ggactatgtccctccgggtgtacacgggtgccctttgccacctaccaaggccccctccaat
7261 accacctccacggaggaaaaggacggttgctctgacagaatccactgtgtctctgcctt
7321 ggcgagacttgcttcgaagaccttcggtagctccgaatcgtcggccgctgcacagcggcac
7381 ggcgactgccctcctgaccagtcctccatcgccgacgacgcaggatccgacgtcgagtc
7441 gtactcctccatgcccccttgagggggagccgggggacccccgatctcagcgcggtc
7501 ctggtctaccgtgagcggaggaggctggtgaggacgtcgtctgctgctcgatgtcctacac
7561 gtggacaggcgccctgatcacgccctgcgccgaggagagccagctgcccatacaacgc
GATGAGGTCACATTCCAGGTCG
```

**Figura 5.** Mapa de oligonucleótidos NS5A genotipo 1b. RN1bNS5As y RN1bNS5Aa (amarillo), RN1bNS5AaIs y RN1bNS5AaIa (verde), RN1bNS5AaIIs y RN1bNS5AaIIa (Azul), Región codificante NS5A (café).

El iniciador 5' de la NS5A G1b se ubicó en la región NS4B-3' debido a una alta concentración de G y C en tándem, lo que dificultaba el diseño manual. Se obtuvieron dos iniciadores en los extremos terminales NS4B-3' y otro 5'-NS5A, y dos pares de iniciadores como anidados (un iniciador anidado con la función sentido y anti sentido a la vez) (Figura 5).

**Tabla 8.** Concentrado de oligonucleótidos NS5A genotipo 1b

Nombre	Oligonucleótidos 5'-3'	Tm	%GC	Tamaño
<b>RN1bNS5As</b>	6133CTC CAG CCT TAC CAT CAC TCA G <sub>6155</sub>	57 °C	54.5%	22 pb
<b>RN1bNS5Aa</b>	7412GAT GGA GGA CTC AGG AGG AG <sub>7392</sub>	56.1 °C	60%	20 pb
<b>RN1bNS5AaIs</b>	6246 CGG TGT TGG CTG ACT TCA AGA C <sub>6468</sub>	58.4 °C	54.5%	22 pb
<b>RN1bNS5AaIa</b>	7095 GAT ACT TCC CTC TCG TCC TCC TC <sub>7073</sub>	57.8 °C	56.5%	23 pb
<b>RN1bNS5AaIs/a</b>	7073 GAG GAG GAC GAG AGG GAA GTA TC <sub>7095</sub>	57.8 °C	56.5%	23 pb
<b>RN1bNS5AaIIs</b>	6716 GAT GAG GTC ACA TTC CAG GTC G <sub>6738</sub>	57.4 °C	54.5%	22 pb
<b>RN1bNS5AaIIa</b>	6818 GTG AGC ATG GAA GTG AGC AC <sub>6797</sub>	56.3 °C	55%	20 pb

Se obtuvieron 7 oligonucleótidos que nos permitieron amplificar por RT-PCR la región que codifica a la proteína NS5A G1b en 3 fragmentos (Tabla 8).

#### **7.2.4 Diseño de oligonucleótidos NS5A genotipo 1a/1b**

De acuerdo con el diseño manual, se realizó un alineamiento combinado múltiple de las 60 secuencias NS5A G1a y las 60 secuencias NS5A G1b con la herramienta EMBL-EBI-Clustal Omega (Versión.2017), con la cual se ubicaron posibles mutaciones de acuerdo a la variabilidad de cada secuencia generándose así variantes con determinados nucleótidos. Los iniciadores con los valores fisicoquímicos más óptimos fueron tomados en cuenta para realizar su respectiva variante (Tabla 6).

A partir del alineamiento en conjunto de las secuencias EU482880.1 G1b y la secuencia EU482864.1 G1a se delimitó la región codificante NS5A G1a/1b, iniciando en el nucleótido 6,208 y terminando en el nucleótido 7,542, se delimitó un fragmento de 1,334 pb (Figura 6). Se obtuvo un par de iniciadores comunes a ambas secuencias en los extremos 5' y 3' del fragmento delimitado que contuvo la región NS5A G1a/1b. Debido a la diferente posición de los nucleótidos con la que inician y termina la región NS5A en los G1a y G1b, se optó por tomar desde las posiciones con menor variabilidad genética, así mismo, una alta concentración de G y C en tándems dificultó el diseño manual. Se obtuvo el diseño de 4 iniciadores en los extremos terminales NS5A-1a/1b, y a su vez tres pares más como anidados (Figura 6).

Hepatitis C virus subtype 1b isolate HCV-1b/US/BID-V37  
complete genome  
GenBank: EU482880.1

Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V45  
complete genome  
GenBank: EU482864.1

```

6121 cagcctcactgtaaccagctcctgaggcgactgcaccagtgataagctcggagtgcac
6121 tgtcactcagatcctctctaaccttaccatcactcagctgctgaagagctccaccagtg
6181 gattaacgaggactgctccacgccatgctccggctcgtggctaaaggacggtttgggactg
6181 cactccatgctctgattcctgggtaagggacatctgggactggatatgcgagggtgctgag
6241 gatatgcaagggtgtggctgacttcaagacctggctccagtcacaagctcctgccgcgact
6241 cgactttaagacctggctaaaagctaaagctcatgcccgaactgcctgggggttccctttgt
6301 gccgggctccctttcttctcctgccaacgctgggtacaagggagttggcgggggacgg
6301 gtccctgccaacgcggatataaaggggtctggcgaggggacggcatcatgcaactcgctg
6361 gatcatgcagaccacctgccatgtggagcacaatcaccggacatgtgaaaaacgggttc
6361 ccactgtggggctgagattactggacatgtcaaaaacgggacgatgaggatcgtcgggtcc
6421 caatggatcgttgggctaaagacctgagcaacacgctggcaccggaacttcccacacaa
6421 taggacctgcaggaacatgtggagtgaggaccttcccacacaaacgggacgggccc
6481 cggatacacaccagggccccctgcacaccctccccggcgccaaactattccagggcgctgtg
6481 ttgcaactcccttctgcccgaactacacgcttccgctgtggaggggtgtctgcagagga
6541 gcgggtggctgctgaggagtacgtggaggttacgcgggtgggggatttccactacgtgac
6541 gtaactgtgagataaaggcaggtggggacttccactacgtgacggggtatgaccactgacaa
6601 gggcatgaccactgacaacttaaaatgccatgccaggttccggccccgaattcttccac
6601 tcttaagtgcccggtgccaggtcccatgcccgaaattttcacagaattggacgggggtgcg
6661 agaattgagtggggtgctgaggtgcaacaggtacgctccggcgtgcaaacctctcctacggga
6661 cctacatagggttcgcgcccccttgcaagccctgttgcgggaggaggatcatcagagt
6721 tgaggtcacattccaggtcgggctcaaccaatacctagttgggtcacaactcccatgoga
6721 aggactccatgagtaccgggtgggatcgcaattaccttgggaacccgaacgggatacggc
6781 gcccgaaacggatgtgacggtgctcacttccatgctcaccgaccctcccacattacagc
6781 cgtgttgacgtccatgctcactgatccctcccatataacggcagaggcggccaagaggag
6841 agagacggccaagcgtaggctggctaggggtctccccctccttggccagctcttcagc
6841 gctggcagaggggtcacccttcaactagccagctcctcagccagccaactgtccgctcc
6901 tagccaattgtctgccccttcttgaaggcagatgcaccgcccagctgactcccggga
6901 atctctcaaggcaacttgcaaccgccaaccaactccctgacgcggagctcatagaggc
6961 cgctgacctcattgaggccaacctcctatggcggcagggaggtggcggggaacatcacccg
6961 taacctcctatggaggcaggagatggcgggcaacatcaccaggggttgagtcagagaacaa
7021 tgtggagtcagagaacaaggtataataattctggactctttcgaatccgcttccggcgggga
7021 agtgggtgatctggactccttcgatccgctgttagctgaggaggatgagcgggagatctc
7081 ggacgagagggaggtgtccattccagcggagatcctgcggaaaaccaagagatcccccc
7081 cgtaccgcagaaatcctgcggaagtctcggagattcggccaggccctgcccgtttgggc
7141 ggcgctgccatagggcagctccagactacaacctccactgtagactcctggaaga
7141 gcggccggattacaacccccgctggtggagacgtggaaaaagcctgactacgaaccacc
7201 cccggactacgtccctccagtggtacacgggtgccattaccacctactaaggccctcc
7201 tgtggtccacggctgcccacttccacctccgacgtccctcctgtgctccacctcggaa
7261 aataccacctccacgggaaagaggacgatgtcctgacagaatccaccggtgtctctgt
7261 gaagcggacgggtggtcctcaccgaatcaaccgtgtctactgccttggccgaactcggcac
7321 cttgggggagcttgcatacaagaccttcggcagctccgaatcgtcagccgtcgacagcgg
7321 caagagtttggcagttcctcaacttccggcattacgggogacgatacgacgacacctc
7381 cgtggtggccgcccctcctgaccagcttccgacaacggcgacacaggaatccgacgttga
7381 tgagaccgccccctcttgccacctcccagactccgacactgagtcctattcctccatgcc
7441 gtcgtattcctccatgcccccccttgagggagagccgggggaccccgatctcagcagcgg
7441 ccccttagaggggggagcctggggatccggatctcagcagcgggtcatggtcgacggtcag
7501 gtcttggctacogtgagcagggaggctagtgaggacgtcgtctgctgctcagatgtccta
7501 tagtggggccgacgcggaggacgtcgtgtgttgcctcagatgtcttataacctggacaggcgc
7561 cacatggacaggcgcctgatcacaccatgcccggcggaggagagcaagctgcccatcaa
7561 actcatcacccgctgcccagaggaacaaaaactgcccatcaacgcactgagcaact

```

Figura 6. Alineamiento mapa oligonucleótidos NS5A-1a/1b

Se obtuvieron 10 iniciadores degenerados (sentido y antisentido) para amplificar la región que codifica a la proteína NS5A 1a/1b (Tabla 9).

**Tabla 9.** Concentrado de iniciadores degenerados para obtener por RT-PCR

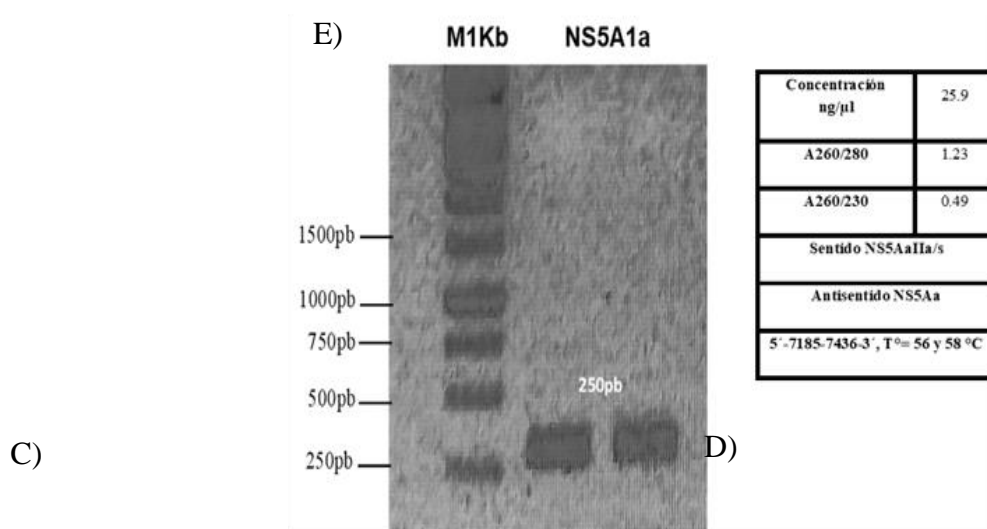
Nombre	Oligonucleótidos 5'-3' / Oligos Degenerados	%GC	Tm	Tamaño
RN1abNS5As	<u>GAYRTYTGGGACTGGRTATGS</u>	52.4%	55.1°C	21 pb
RN1abNS5Aa	<u>GACATYGARCARCASACGAC</u>	52.5%	55.1°C	20 pb
RN1abNS5AaIs	<u>CATYAAYGCMTACACCACGG</u>	52.5%	55.1°C	20 pb
RN1abNS5AaIs/a	<u>CCGTGGTGTAKGCRTRATG</u>	52.5%	56.3°C	20 pb
RN1abNS5AaIa	<u>CAGWAGAYACWGTGKAYTCDGTB</u>	45.7%	54.4 °C	23 pb
RN1abNS5AaIa/s	<u>VACHGARTCMACWGTRTCTWCTG</u>	45.7%	54.4°C	23 pb
RN1abNS5AaIIs	<u>TMCCWTGYGAGCCYGAAC</u>	58.3%	56.2°C	18 pb
RN1abNS5AaIIs/a	<u>GTTCRGGCTCRCAWGGKA</u>	58.3%	56.2°C	18 pb
RN1abNS5AaIIa	<u>RAARGAGTCCARAAYYACYAC</u>	42.9%	51.5°C	21 pb
RN1abNS5AaIIa/s	<u>GTRGTRRTTYTGGACTCYTTY</u>	42.9%	51.5°C	21 pb

\*Y=(C/T) R=(A/G) S=(G/C) M=(A/C) K=(T/G) W=(T/A) D=(A/G/T) B=(C/G/T) V=(A/C/G) H=(A/C/T).

## 7.3 Obtención de fragmentos de la NS5A por RT-PCR

### 7.3.1 Fragmentos de la región NS5A Genotipo 1a

De los 9 iniciadores del G1a producidos se utilizaron combinaciones de los mismos para obtener fragmentos más cortos para amplificar, ya que era complicado obtener fragmentos de mayor peso al ser una proteína muy extensa, es por ello que a partir de la muestra P06 del G1a se estandarizo y amplifico 6 fragmentos de distintos pesos moleculares (844 pb, 502 pb, 443 pb, 265 pb y 250 pb) (Figura 7) los cuales corresponden al 75% la región codificante de la proteína NS5A, siendo los iniciadores NS5A1aIs, NS5A1aIa, NS5A1aIIs, NS5A1aIIa, NS5A1aS, NS5AaIIs/a, NS5AaIIa/s y NS5Aa capaces de amplificar las regiones necesarias de la proteína NS5A.

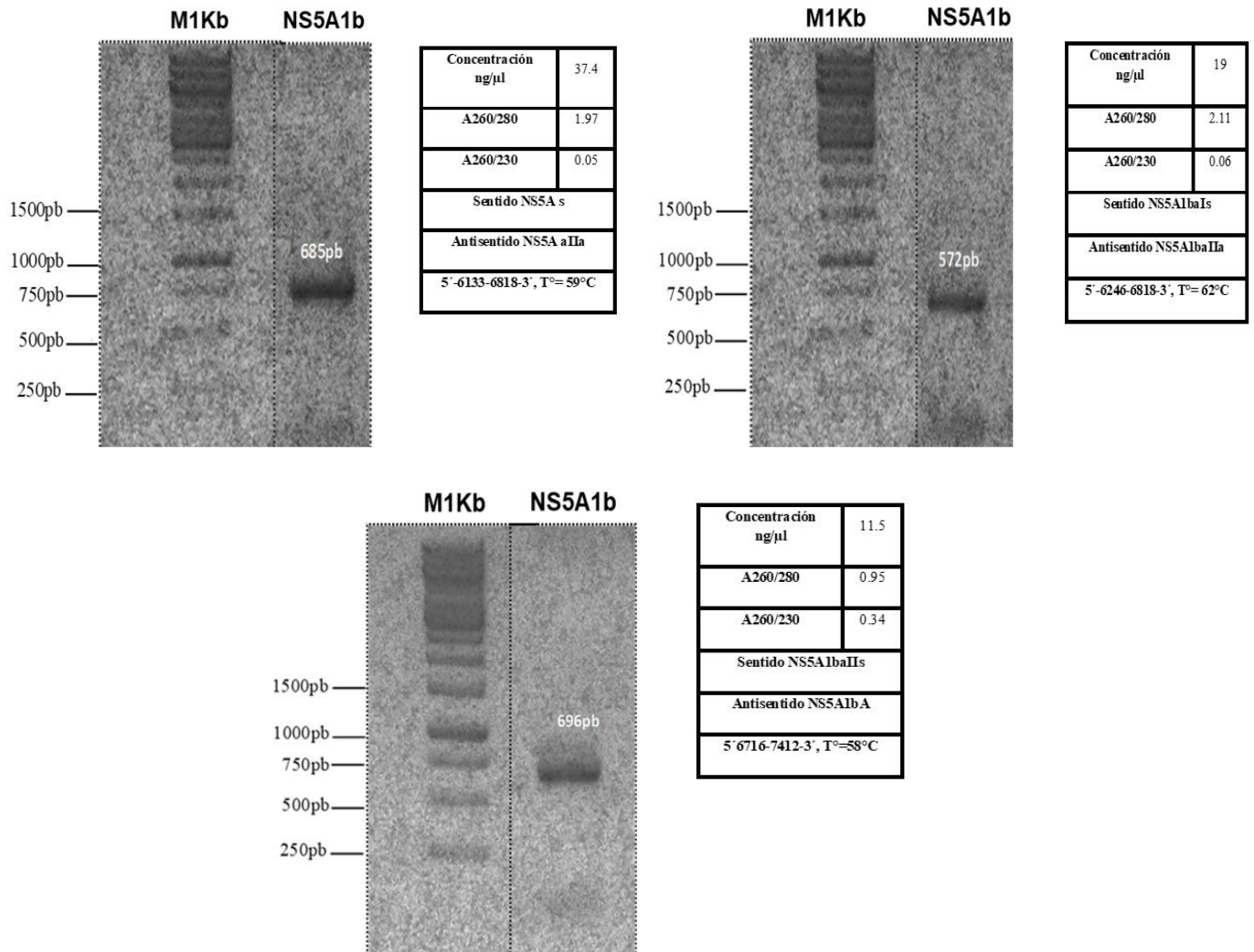


**Figura 7.** Fragmentos de P06 G1a en gel de agarosa al 1%. A) Fragmento de 844 pb (NS5A1aIs/NS5A1aIa) B) Fragmento de 502 pb (NS5A1aIIs/NS5A1aIIa) C) Fragmento de 443 pb (NS5A1aS/NS5AaIIs/a) D) Fragmento de 265 pb (NS5A1aS/NS5AaIIs/a) C) Fragmento 250 pb (NS5AaIIa/s/NS5Aa).

C)

### **7.3.2 Fragmentos de la región NS5A Genotipo 1b**

De los 7 iniciadores producidos se utilizó el mismo procedimiento antes mencionado para la obtención de los fragmentos para amplificar, la diferencia con los anteriormente mencionados fue que la amplificación de los mismos pudo realizarse en fragmentos más grandes ya que al estar ubicados en sitios más conservados permitió la amplificación del 100% de la misma, se obtuvieron 3 fragmentos grandes ( 685 pb, 572 pb y 696 pb) que corresponden en su totalidad a la región NS5A de la proteína más una fracción de los terminales de la NS4B (Figura 8), así mismo los iniciadores NS5A1bS, NS5AaIIa, NS5A1baIs, NS5A1baIIa, NS5A1baIIc y NS5A1bA son capaces de amplificar las regiones necesarias de la proteína NS5A para el G1b.

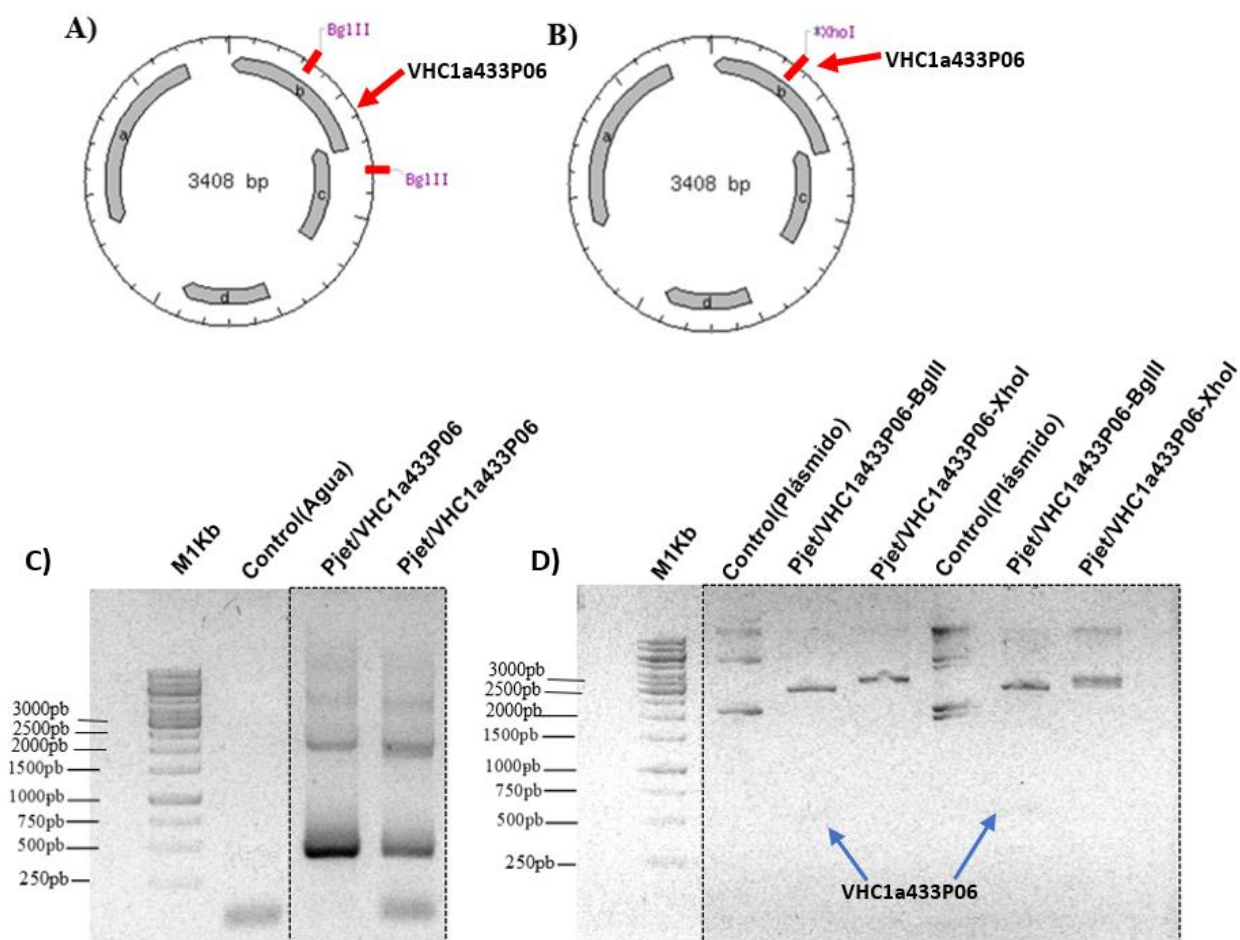


**Figura 8.** Fragmentos de P07 G1b en gel de agarosa al 1%. A) Fragmento de 685 pb (NS5A1bS/NS5AaIIa) B) Fragmento de 572 pb (NS5A1baIs/NS5A1baIIa) C) Fragmento de 696 pb (NS5A1baIIIs/NS5A1baA).

## 7.4.1 Plásmidos de fragmentos de la NS5A G1a (P06)

### 7.4.1.1 Plásmido pjet/VHC1a433 (P06)

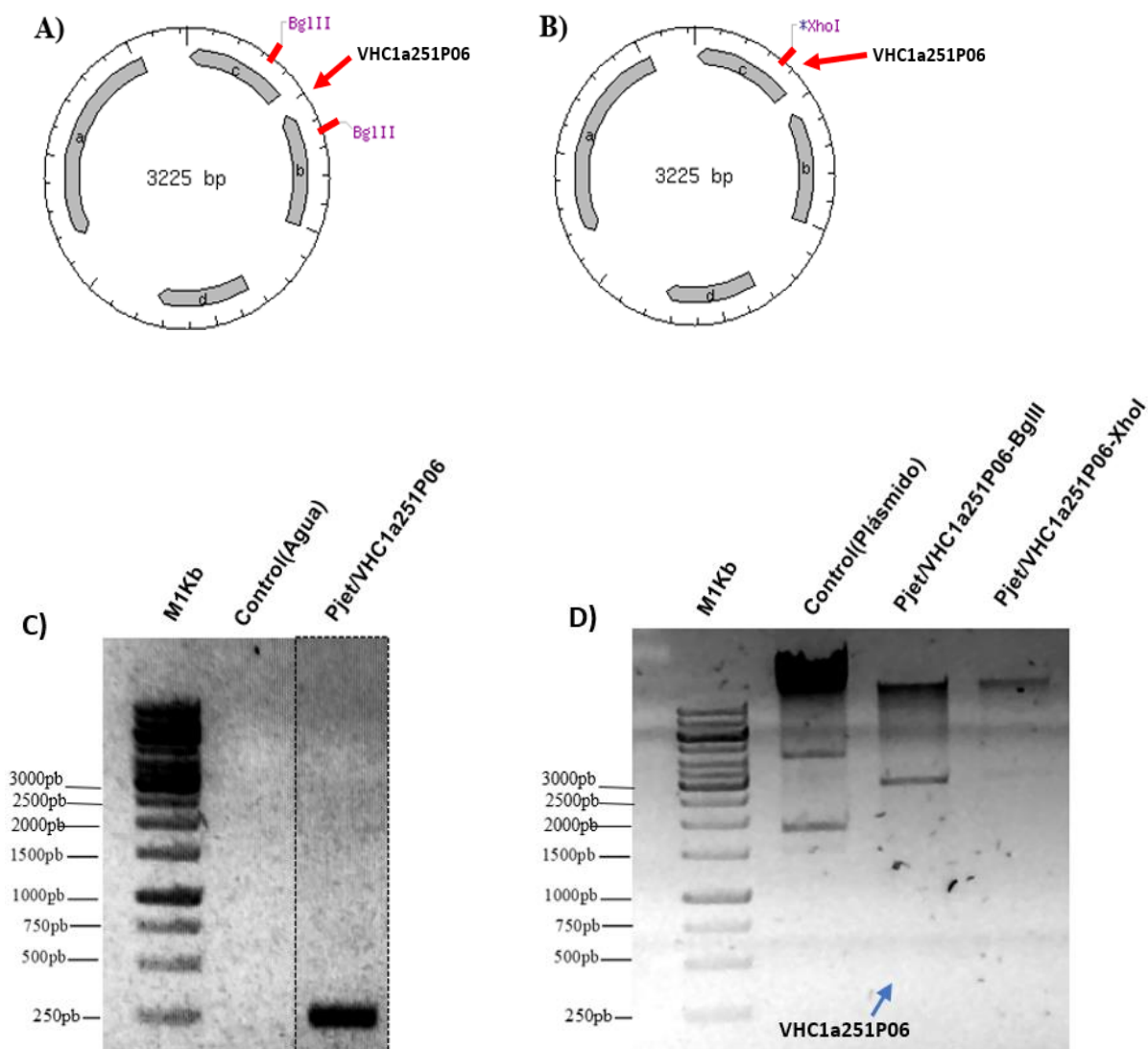
Se localizaron los sitios de corte para la liberación del fragmento insertado NS5A G1a 433pb (P06) en el plásmido Pjet1.2/blunt (2974 bp), ubicando las enzimas XhoI para obtener el linealizado y así mismo BglII para liberar el fragmento insertado utilizando la plataforma en línea NEBcutter V2.0, el cual fue comprobado mediante un corrimiento en gel de agarosa al 1% (Figura 9).



**Figura 9.** Corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Diseño *in silico* de sitio de corte BglII B) Diseño *in silico* de sitio de corte XhoI. C) Plásmido Pjet/VHC1a 433P06 y amplificación fragmento 433 pb, D) Plásmido Pjet/VHC1a 433P06, control (2da y 4ta carril), liberado (3ro y 6to carril) y linealizado (4to y 7mo carril).

### 7.4.1.2 Plasmido Pjet/VHC1a251(P06)

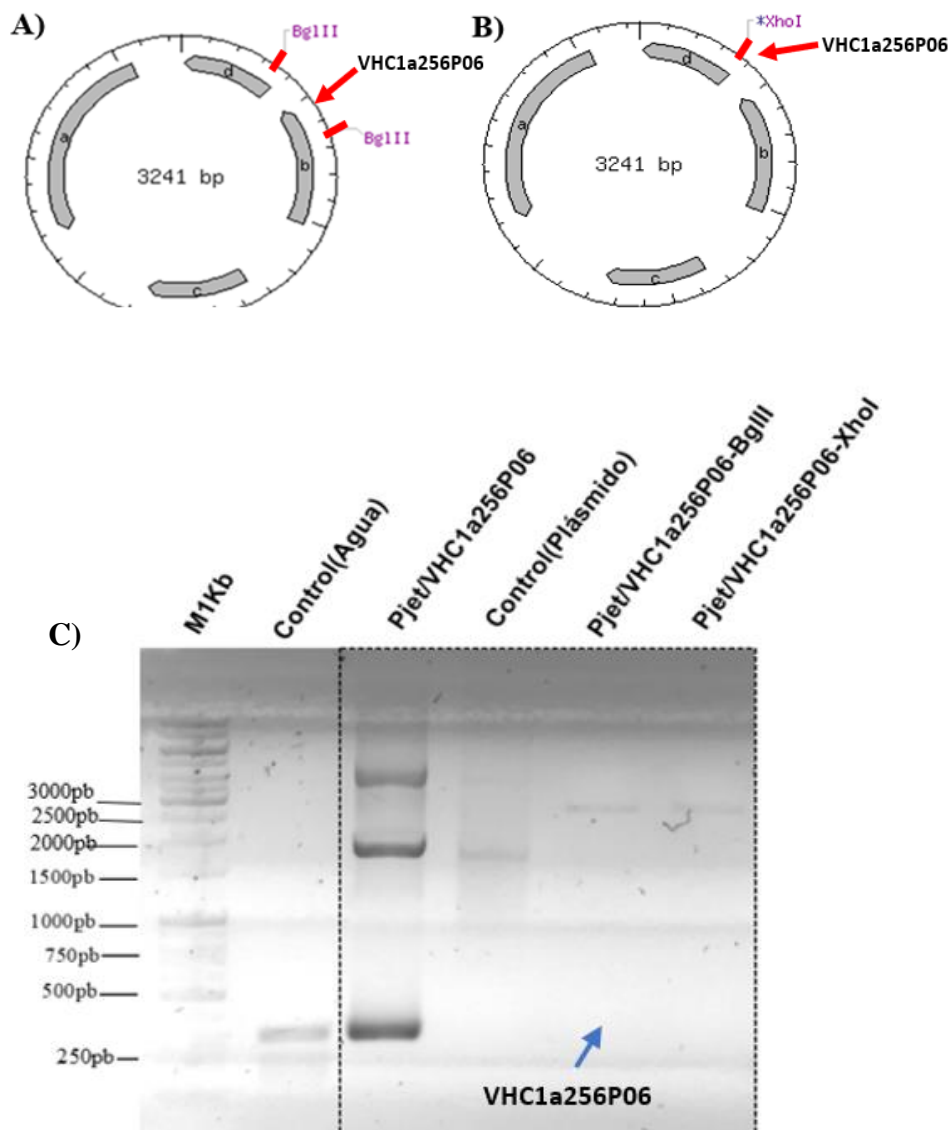
Se localizaron los sitios de corte para la liberación del fragmento insertado NS5A1a 251pb (P06), ubicando las enzimas XhoI para obtener el linealizado y así mismo BglIII, el cual fue comprobado mediante un corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 10).



**Figura 10.** Corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Diseño *in silico* de sitio de corte BglIII B) Diseño *in silico* de sitio de corte XhoI C) Amplificación de fragmento 251 pb Pjet/VHC1a251P06, D) Plasmido Pjet/VHC1a251P06 control (2do carril), liberado (3er carril) y linealizado (4to carril).

### 7.4.1.3 Plásmido Pjet/VHC1a256 (P06)

Se localizaron los sitios de corte para la liberación del fragmento insertado de 256pb, ubicando las enzimas XhoI para obtener el linealizado y así mismo BglII, el cual fue comprobado mediante un corrimiento en gel de electroforesis al 1% (Figura 11).

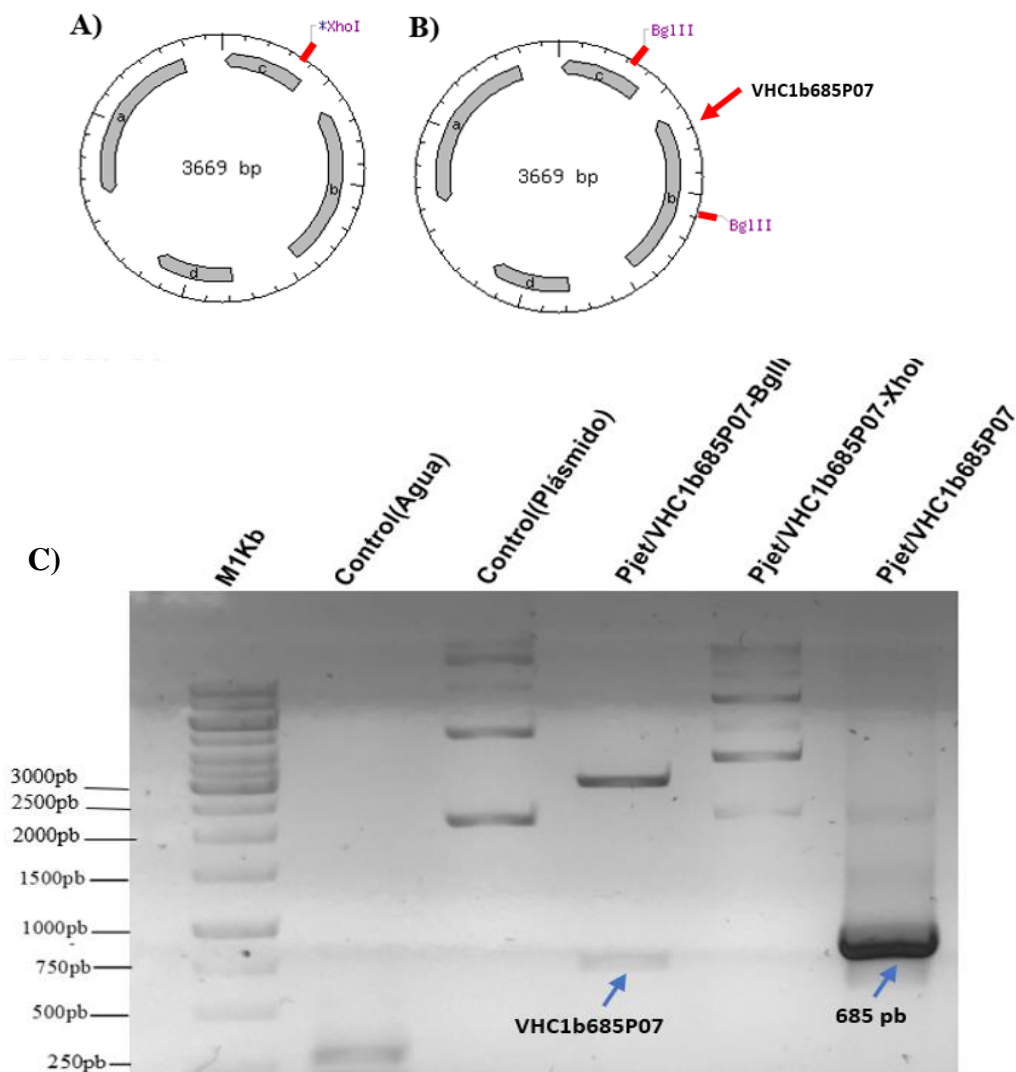


**Figura 11.** Corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Diseño *in silico* de sitio de corte BglII B) Diseño *in silico* de sitio de corte XhoI C) Control (2do carril) y amplificación de fragmento 256 pb (3er carril), Control plásmido (4to carril), liberación del fragmento Pjet/VHC1a256P06 (5to carril) y linealizado (6to carril).

## 7.4.2 Plásmidos NS5A G1b (P07)

### 7.4.2.1 Pjet/VHC1b685 (P07)

Se localizaron los sitios de corte para la liberación del fragmento insertado NS5A1b685 (P07), ubicando las enzimas XhoI para obtener el linealizado y así mismo BglII, el cual fue comprobado mediante un corrimiento en gel de electroforesis al 1% (Figura 12).



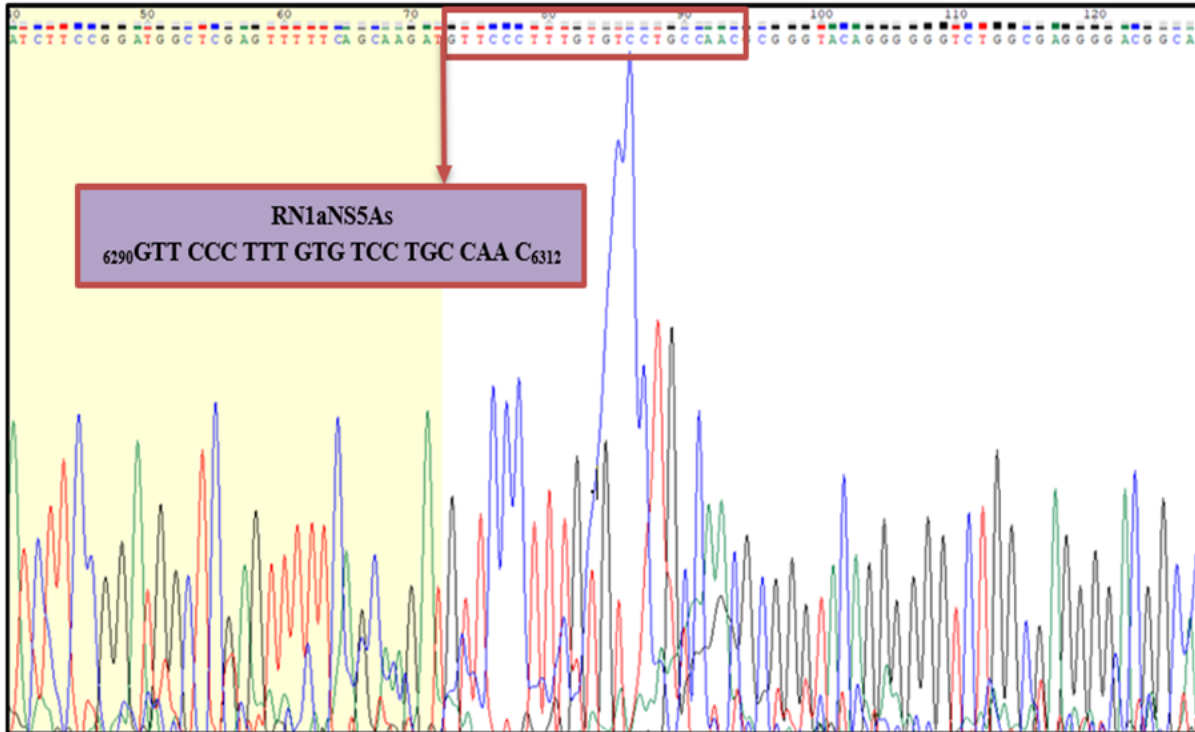
**Figura 12.** Corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Diseño *in silico* de sitio de corte BglII B) Diseño *in silico* de sitio de corte XhoI C) Control (2do carril), control plasmido (3er carril), liberación del fragmento de Pjet/VHC1b685P07 (4to carril), linealizado (5to carril) y amplificación del fragmento VHC1b685P07 de 685 pb (6to carril).

## 7.5 Secuenciación y curación de productos de PCR

Se obtuvieron 14 fragmentos en total, correspondientes a 9 muestras de G1a y 5 muestras de G1b (Tabla 10), después de secuenciar se obtuvieron 28 electroferogramas correspondientes a los fragmentos sentido y antisentido, dichas secuencias se evaluaron y curaron eliminando las secciones no correspondientes a la secuencia esperada, utilizando como punto de localización los iniciadores utilizados en cada amplificación de los fragmentos como se muestra en la Figura 13 en el caso de los pacientes P02, P01, P03, P04, P08 y P05 al existir un fallo en la secuenciación de los electroferogramas con iniciadores antisentido, no fue posible curar dichas secuencias, por lo tanto solo se continuo con el análisis de las secuencias curadas con iniciadores sentido, dicho análisis se llevó a cabo mediante el alineamiento de las demás secuencias de un mismo genotipo y una secuencia de la proteína NS5A de VHC extraída de Genebank aleatoriamente que funciona como control.

**Tabla 10.** Fragmentos obtenidos para secuenciación

Paciente	Genotipo	Fragmento	Tamaño pb	Origen
P06	1a	VHC1a880P06	880	cDNA
		PjetVHC1a251P06	251	DNAplasmidico
		PjetVHC1a265P06	265	
		PjetVHC1a433P06	433	
P02	1a	VHC1a433P02	433	cDNA
P01	1a	VHC1a433P01	433	
P03	1a	VHC1a433P03	433	
P04	1a	VHC1a433P04	433	
P08	1a	VHC1a433P08	433	
P07	1b	PjetVHC1b683P07	685	DNAplasmidico
		VHC1b696P07	696	cDNA
		VHC1b572P07	572	
		VHC1b685P07	685	
P05	1b	VHC1b685P05	685	



**Figura 13.** Ejemplo de análisis de electroferograma en Chromas. Plásmido pJetVHC1a433P06 y ubicación del iniciador RN1aNS5As.

Cada secuencia obtenida fue comparada por alineamiento en BLAST para evaluar su posible origen, al obtener un valor de identidad (>90%) y un porcentaje alto de cobertura (>90%) comprobando su similitud con secuencias homólogas de VHC G1a o G1b, se continuó con un alineamiento múltiple de todas las secuencias obtenidas por cada paciente, para generar una secuencia completa de los fragmentos secuenciados (Figura 14).

A)

VHC1aCCL	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
RID <a href="#">KXTNZZYD016</a> Download All ▾	<a href="#">Synthetic construct Hepatitis C virus Bole1a, complete genome</a>	1563	1563	99%	0.0	94.52%	<a href="#">JQ791196.1</a>
Program	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V328/2001, complete genome</a>	1519	1519	99%	0.0	93.73%	<a href="#">EU155293.2</a>
BLASTN ⓘ Cit	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate DN12, complete genome</a>	1513	1513	99%	0.0	93.63%	<a href="#">EU781814.1</a>
Database	<a href="#">Hepatitis C virus isolate V0134 NS5AB replicase gene, partial cds</a>	1507	1507	99%	0.0	93.24%	<a href="#">KC127251.1</a>
nt <a href="#">See details</a>	<a href="#">Hepatitis C virus isolate V0134 NS5AB replicase gene, partial cds</a>	1507	1507	99%	0.0	93.24%	<a href="#">KC127251.1</a>
Query ID	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate NR3-W24 nonstructural protein 5A gene, partial cds</a>	1504	1504	99%	0.0	93.52%	<a href="#">FJ896278.1</a>
lcl Query_36945	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V201/1991, complete genome</a>	1504	1504	99%	0.0	93.52%	<a href="#">EU255985.1</a>
Description	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V201/1991, complete genome</a>	1504	1504	99%	0.0	93.52%	<a href="#">EU255985.1</a>
VHC1aCCL	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V195/1990, complete genome</a>	1504	1504	99%	0.0	93.52%	<a href="#">EU255983.1</a>
Molecule type	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V195/1990, complete genome</a>	1504	1504	99%	0.0	93.52%	<a href="#">EU255983.1</a>
dna	<a href="#">Hepatitis C virus isolate PT058-7dP nonstructural 5A protein gene, partial cds</a>	1502	1502	99%	0.0	93.44%	<a href="#">JX112591.1</a>
Query Length	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V11/2004, complete genome</a>	1502	1502	99%	0.0	93.44%	<a href="#">EU260396.2</a>
1019	<a href="#">Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V11/2004, complete genome</a>	1502	1502	99%	0.0	93.44%	<a href="#">EU260396.2</a>
Other reports	<a href="#">Hepatitis C virus isolate V0476 NS5AB replicase gene, partial cds</a>	1500	1500	99%	0.0	93.33%	<a href="#">KC127482.1</a>

B)

Reference Coordinates	930	940	950	960	970	980	990	1,000	1,010	1,020	1,030
Translate Consensus	AGGTAAGGCGGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGCATGACTACTGACGATCTTAAATGCCCGTGTCCAGGTCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGG										
PjetVHC1a433CCL_pJET1-2FwEdit, ab (1>413) →	AGGTAAGGCGGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGCATGACTACTGACGATCTTAAATGCCCGTGTCCAGGTCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGG										
PjetVHC1a433CCL_pJET1-2FwEdit, ab (1>383) →	AGGTAAGGCGGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGCATGACTACTGACGATCTTAAATGCCCGTGTCCAGGTCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGG										
IaNS5A_palaE - copia, ab1 (1>716) →	AGGTAAGGCGGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGCATGACTACTGACGATCTTAAATGCCCGTGTCCAGGTCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGG										
IaNS5A_palsE - copia, ab1 (1>790) →	AGGTAAGGCGGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGCATGACTACTGACGATCTTAAATGCCCGTGTCCAGGTCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGG										
IaNS5A_pallaE - copia, ab1 (1>464) →	AGGTAAGGCGGGTGGGGGACTTCCACTACGTGACGGGCATGACTACTGACGATCTTAAATGCCCGTGTCCAGGTCATCGCCCGAATTTTTCACAGAATTGGACGGG										

**Figura 14.** Edición y construcción de secuencias. A) Alineamiento BLAST de VHC1aP06

B) Alineamiento múltiple de secuencias P06 y construcción de secuencia completa en Seqman pro 17.

## 7.6 Traducción de secuencias

La traducción de los fragmentos se realizó en la plataforma Biomodel (UAH), con la herramienta de transcripción y traducción. Las secuencias de nucleótidos obtenidas para cada paciente fueron traducidas y analizadas mediante un alineamiento múltiple contra secuencias de su genotipo correspondiente extraídas de GenBank en MEGA-X (Figura 15).

A)

1. VHC1aIAB	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	L	P	A	P	N	Y	K	F	A	L	W	R	V	S	A	E	E	Y	V	E	V	R	R	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	D	L	K	C	P	C	Q	V	P	S	P	E	F	F	T	E	L	D	G	V	R	L	H	S	T	R	P	P
2. VHC1aHHJ	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	L	P	A	P	N	Y	K	F	A	L	W	R	V	S	A	E	E	Y	V	E	V	R	R	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	D	L	K	C	P	C	Q	V	P	S	P	E	F	F	T	E	L	D	G	V	R	L	H	R	S	R	P	-
3. VHC1aRCM	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	L	P	A	P	N	Y	T	F	A	L	W	R	V	S	A	E	E	Y	V	E	I	R	R	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	D	L	K	C	P	C	Q	V	P	S	P	E	F	F	T	E	L	D	G	V	R	L	H	R	S	R	P	L
4. VHC1aBMC	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	L	P	A	P	N	Y	T	F	A	L	W	R	V	S	A	E	E	Y	V	E	I	R	R	E	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	D	L	K	C	P	C	Q	V	P	S	P	E	F	F	T	E	L	D	G	V	R	L	H	R	S	R	P	-
5. VHC1aCCL	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	L	P	A	P	N	Y	K	F	A	A	W	G	C	L	Q	R	N	T	W	R	G	-	-	-	G	W	G	T	S	T	R	A	L	L	T	I	L	N	A	R	V	R	S	H	R	P	N	F	S	Q	N	W	T	G	C	A	Y	I	G	L	R	P	L	
6. VHC1aSSA	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	L	P	A	P	N	Y	K	F	A	L	W	R	V	S	A	E	E	Y	V	E	V	R	R	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	D	P	Q	M	P	V	S	R	S	H	R	P	N	F	T	E	V	G	R	G	A	P	S	N	M	L	R	P
7. ACS15692.1	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	L	P	A	P	N	Y	K	F	A	L	W	R	V	S	A	E	E	Y	V	E	V	R	Q	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	N	L	K	C	P	C	Q	V	P	S	P	E	F	F	T	E	L	D	G	V	R	L	H	R	F	A	P	P

B)

1. VHC1bJACC	G	H	V	K	N	G	S	M	R	I	V	G	P	K	T	C	S	N	T	W	H	G	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	S	P	A	P	N	Y	S	R	A	L	W	R	V	A	A	E	E	Y	V	E	V	T	R	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	N	V	K	C	P	C	Q	V	P	A	P	E	F	F	T	E
2. VHC1bRCCA	G	H	V	K	N	G	S	M	R	I	V	G	P	K	T	C	S	N	T	W	H	G	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	S	P	A	P	N	Y	S	R	A	L	W	R	V	A	A	E	E	Y	V	E	V	T	R	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	N	V	K	C	P	C	Q	V	P	A	P	E	F	F	T	E
3. QCG74037.1	G	H	V	K	N	G	S	M	R	I	V	G	P	R	T	C	S	N	T	W	H	G	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	S	P	A	P	N	Y	S	R	A	L	W	R	V	A	A	E	E	Y	V	E	V	T	R	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	N	I	K	C	P	C	Q	V	P	A	P	E	F	F	T	E
4. EU155366.2	G	H	V	K	N	G	S	M	R	I	V	G	P	K	T	C	S	N	T	W	H	G	T	F	P	I	N	A	Y	T	T	G	P	C	T	P	S	P	A	P	N	Y	S	R	A	L	W	R	V	A	A	E	E	Y	V	E	V	T	R	V	G	D	F	H	Y	V	T	G	M	T	T	D	N	V	K	C	P	C	Q	V	P	A	P	E	F	F	T	E

**Figura 15.** Alineamiento múltiple MEGA-X. A) Alineamiento pacientes G1a RVS y NR B) Alineamiento pacientes G1b RVS y NR.

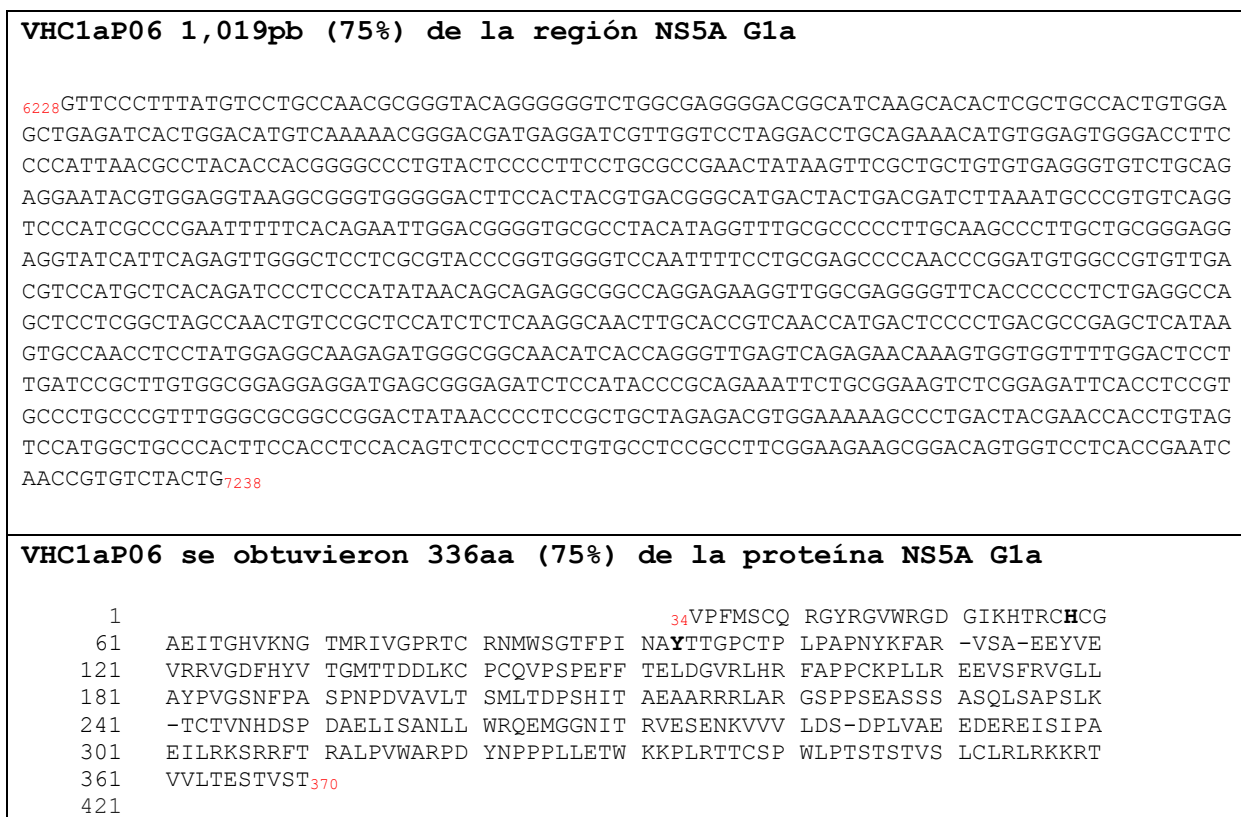
## 8 ANALISIS

### 8.1 Eficacia de los iniciadores para amplificar la secuencia de la región NS5A de G1a y G1b a partir de muestras de suero de pacientes con hepatitis C crónica

#### 8.1.1 Amplificación de 3 secuencias de la región NS5A G1a y obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A G1a

Con los iniciadores: RN1aNS5As y RN1aNS5AaIIs/a se obtuvo un producto de 433 pb; con los iniciadores RN1aNS5AaIIs y RN1aNS5AaIIa se obtuvo un producto de 502 pb; y con los iniciadores RN1aNS5AaIIa/s y RN1aNS5Aa se obtuvo un producto de 250 pb (Figura 7). El proceso de construcción de la secuencia completa del marco de lectura de la NS5A se hizo con el programa Seqman pro 17, por medio de un alineamiento múltiple con los 3 fragmentos; se generó una secuencia total de 1,019 pb (75%) de la región NS5A G1a, para después generar la

traducción de la misma, con la que se obtuvo un segmento de 336 aa (75%) de la proteína NS5A G1a (Figura 16).

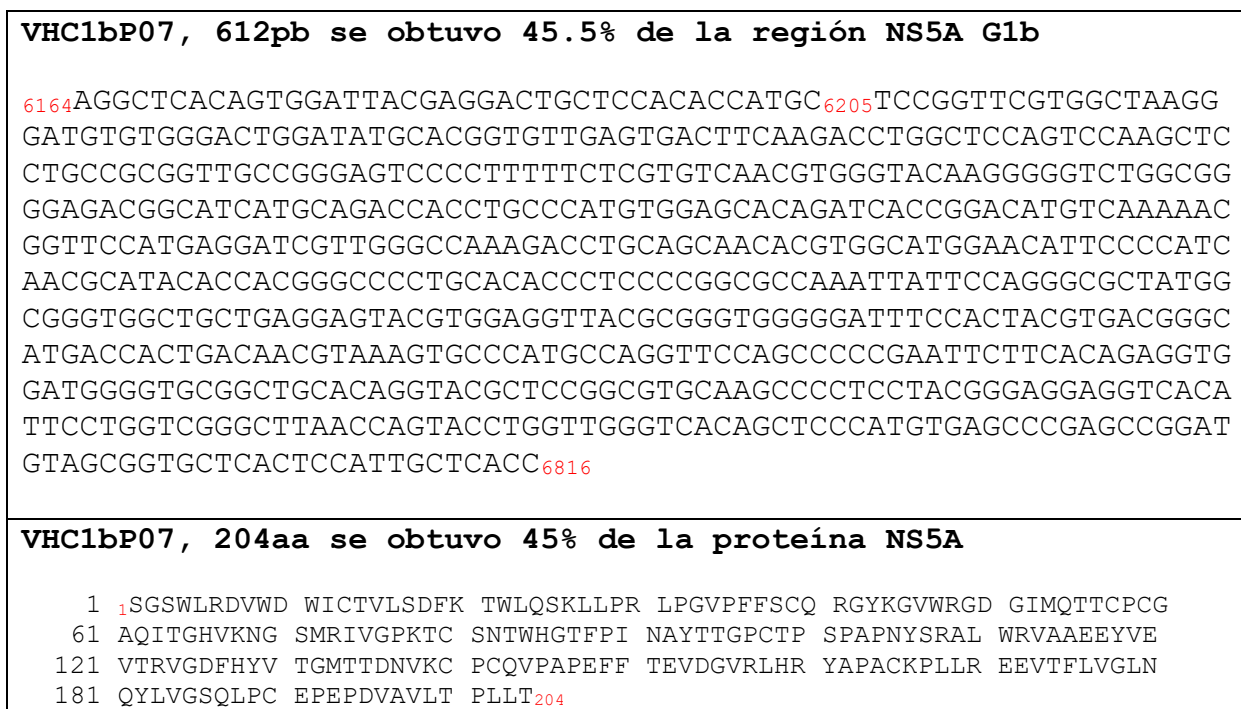


**Figura 16.** Construcción de un fragmento de la región NS5A G1a y traducción del 75% de la secuencia de la proteína NS5A G1a.

### 8.1.2 Amplificación de la secuencia de la región NS5A G1b y obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS5A G1b

Con el par de iniciadores RN1bNS5As y RN1bNS5AaIIa se obtuvo un producto de 685pb (Figura 8), después de ser secuenciado se obtuvo la secuencia parcial del marco de lectura de la NS5A con un tamaño total de 655pb, pero dentro de esa secuencia se obtuvo una parte de la región NS4B (39 nt que fueron eliminados), parte de la región NS5A inicia en 5'-6,205 y termina

en 6,816-3', un total de 612pb, después de generar la traducción de la misma se obtuvo del aa 1 al aa 204 (45.5%) de la proteína NS5A G1b (Figura 17).



**Figura 17.** Construcción de una parte de la región NS5A G1b (685pb) y traducción de la secuencia de la proteína NS5A G1b.

Con los iniciadores RN1bNS5AaIIs y RN1bNS5Aa se amplificó un producto PCR 696pb (Figura 8), después de ser secuenciado se obtuvo un producto 653pb, pero fueron eliminados 80 nucleótidos que se traslapan con el primer producto PCR 655pb, el fragmento que complementa el faltante de la región NS5A por lo tanto inicia en nt 5'-6,817 y termina 7,390, un producto de 573pb, después de generar la traducción de la misma se obtuvieron 191aa pertenecientes a la proteína NS5A (aa 206 al aa397) (Figura 18). Entre los dos fragmentos se obtuvieron 397aa (89%) de la proteína NS5A G1b.

**VHC1bP07, 573pb se obtuvo 42.5% de la región NS5A G1b**

6737GGCTCAATCAATACCTGGTCGGGTCACAGCTCCCATGTGAGCCCGAGCTGGATGTCACAGTG  
CTCACTTCCATGCTCACC6817GACCCCTCCCACATCACAGCAGAGGGCGGCTAAGCGCAGGCTGGC  
CAGGGGGTCCCCCCCCCTCCTTGGCCAGCTCTTCTGCTAGCCAGTTGTCTGCGCCTTCCTTGAAGG  
CAACATGCACTACCCGTCATGACTCCCCAGATGCCGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTATGGCGG  
CAGGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAGAACAAGGTAGTAATTCTGGACTCTTT  
CGAGCCGCTTCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTTCCGGCGGAAATCCTGCGGAAAT  
CCAGGAAATTCCTCGGGCGATGCCCATATGGGCACGCCCGGATTATAACCCTCCACTGATAGAG  
TCCTGGAAGGACCCGGACTACGTCCCTCCGGTGGTACATGGATGCCCATTGCCACCTACCAAGGC  
CCCTCCAATACCACCCCCACGGAGGAAAAGGACGGTTGTCTGACAGAATCCACCGTGTCTTCAG  
CCTTGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGTAGCTCCGAATCGTCGGCCGTGACAGCGGCACG  
GCGACCGCCC7390

181  
241 ATCTTRHDSP DADLIEANLL WRQEMGGNIT RVESENKVVI LDSFEPLRAE EDEREVSVA  
301 EILRKSJKFP RAMPIWARPD YNPPLLESWK DPDYVPPVH GCPLPPAXAP PIPPPRRKRT  
361 VVLTESTVSS ALAELATKTF GSSE-SSAVD SGTATA397

**Figura 18.** Construcción de una parte de la región NS5A G1b (696pb) y traducción de la secuencia de la proteína NS5A G1b.

## 8.2 Pacientes

Noventa pacientes recibieron tratamiento con los fármacos Harvoni o Viekira pack, el tratamiento dependió del historial clínico de cada uno de los pacientes, así los pacientes con cirrosis descompensada tuvieron tratamiento con Harvoni, y los pacientes con HCC o cirrosis compensada con Viekira Pak. Ambos tratamientos duran 12 semanas (fin de tratamiento) y aquellos pacientes con carga viral no detectable a las 12 semanas después de fin de tratamiento se consideraron que alcanzaron RVS (Tabla 5).

### **8.2.1 Pacientes NR al tratamiento con Harvoni o Viekira Pak**

El objetivo principal de este estudio, fue detectar SAR a inhibidores de NS5A en pacientes NR a los tratamientos con Viekira Pak o Harvoni, ambos fármacos contienen en su fórmula un inhibidor de la proteína viral NS5A, ombitasvir y ledipasvir respectivamente.

En este estudio, 43 pacientes recibieron tratamiento con Viekira Pak y 47 con Harvoni. Un paciente (2.3%) fue NR a Viekira Pak y 1 (2.1%) fue NR a Harvoni.

La paciente NR a Viekira Pak (P08) con G1a, diagnóstico HCC, CV inicial 6,909 copias/mL, presentó recaída a la semana 12 post-tratamiento; el paciente NR a Harvoni (P07) con G1b, diagnóstico de cirrosis CP-B, CV inicial 1,030,787 copias/mL, presentó respuesta nula a la semana 12 (fin de tratamiento). Las secuencias de la NS5A de los dos pacientes NR se analizaron para detectar posibles SAR en NS5A.

### **8.2.2 Pacientes que presentaron RVS al tratamiento con Harvoni**

Seis de los pacientes que recibieron tratamiento con Harvoni, de los cuales cinco tuvieron G1a y uno G1b fueron estudiados en sus secuencias para detectar SAR en NS5A. Los seis pacientes fueron diagnosticados con cirrosis CP-A-B, la CV inicial en general fue <400,000 copias/mL, tuvieron CV no detectada a fin de tratamiento, y a la semana 12 post-tratamiento se les definió RVS con Harvoni.

### **8.3 Análisis de las secuencias de pacientes NR y los que alcanzaron RVS con alguno de los tratamientos Harvoni o Viekira Pak**

Al no existir estudios sobre el papel de las SAR a inhibidores de la NS5A VHC en pacientes mexicanos, la comparación de las secuencias SAR de NS5A en cada uno de los pacientes se

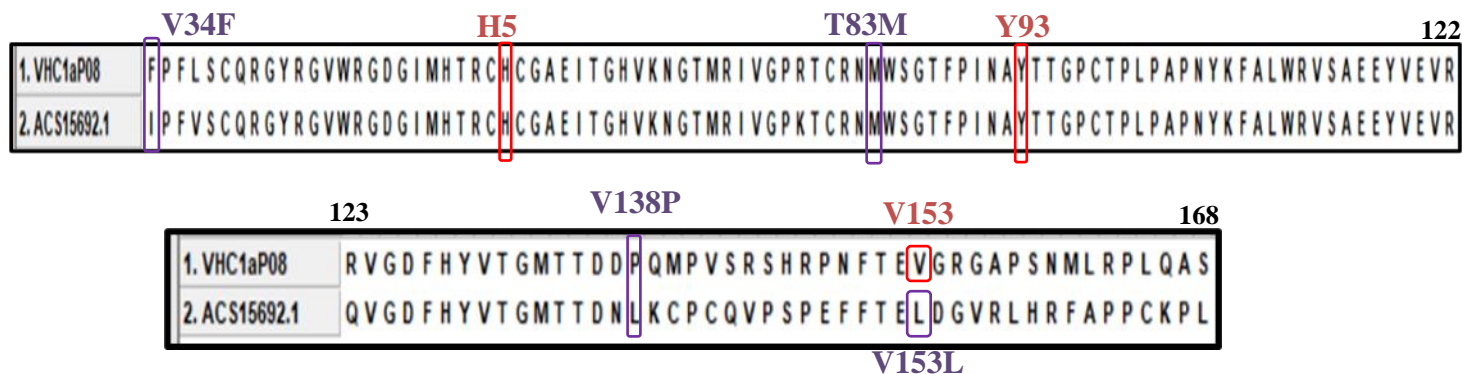
limitó a las SAR detectadas en países como Japón, China, Estados Unidos, Francia y Brasil. La SAR NS5A que se han reportado asociadas a resistencia media a alta a los inhibidores de la NS5A VHC reportadas son: Y93C/H/N, L28M, L31V/F, H58P/R, R30Q, P32L, Q24, Q30K, Q62H/R (Mawatari S. 2018; Sharafi. 2019; Felix-Tavares RC. 2018; Salmon D. 2018; Malta F. 2017; Zhao Li. 2017), y de baja resistencia V34I, T83M, V138L, V153L y L183P (Knops. 2018). Todas han sido reportadas principalmente asociadas a la reducción de la actividad de los inhibidores de la NS5A como OBV, LDV, EBV, DCV y VPV, tanto en los genotipos 1a y 1b.

Se ha reportado la actividad de los inhibidores de la NS5A reducida hasta en un 80%, por factores tales como: La concentración de moléculas virales (carga viral), el genotipo y subtipo viral, y por el estadio de enfermedad hepática que cursan los pacientes (HCC, Cirrosis CP-A-C o CHC) al momento del tratamiento (Mawatari S. 2018; Sharafi. 2019; Felix-Tavares RC. 2018; Salmon D. 2018; Malta F. 2017; Zhao Li. 2017; Knops, 2018).

La presencia de SAR a los inhibidores de NS5A clínicamente relevantes fue analizada de acuerdo con la respuesta final que tuvieron los pacientes a los tratamientos con Viekira Pak o Harvoni (RVS o NR). Mediante alineamiento cada una de las secuencias fue posible detectar sustituciones puntuales y SAR en NS5A asociadas al estadio de la enfermedad hepática

### **8.3.1 Paciente (P08) no respondedor al fármaco Viekira PaK (inhibidor NS5A, ombitasvir)**

Se analizó el historial clínico de cada paciente con estatus de NR para asociar posibles factores a falla al tratamiento. El alineamiento múltiple para detectar SAR en NS5A de alta y baja resistencia debido a la falla al tratamiento se presenta en (figura 19), se trató de un paciente de sexo femenino, de 39 años, con HCC, G1a, CV inicial de 6,909 copias/mL y respuesta al tratamiento recaída a la semana 12 post-tratamiento.



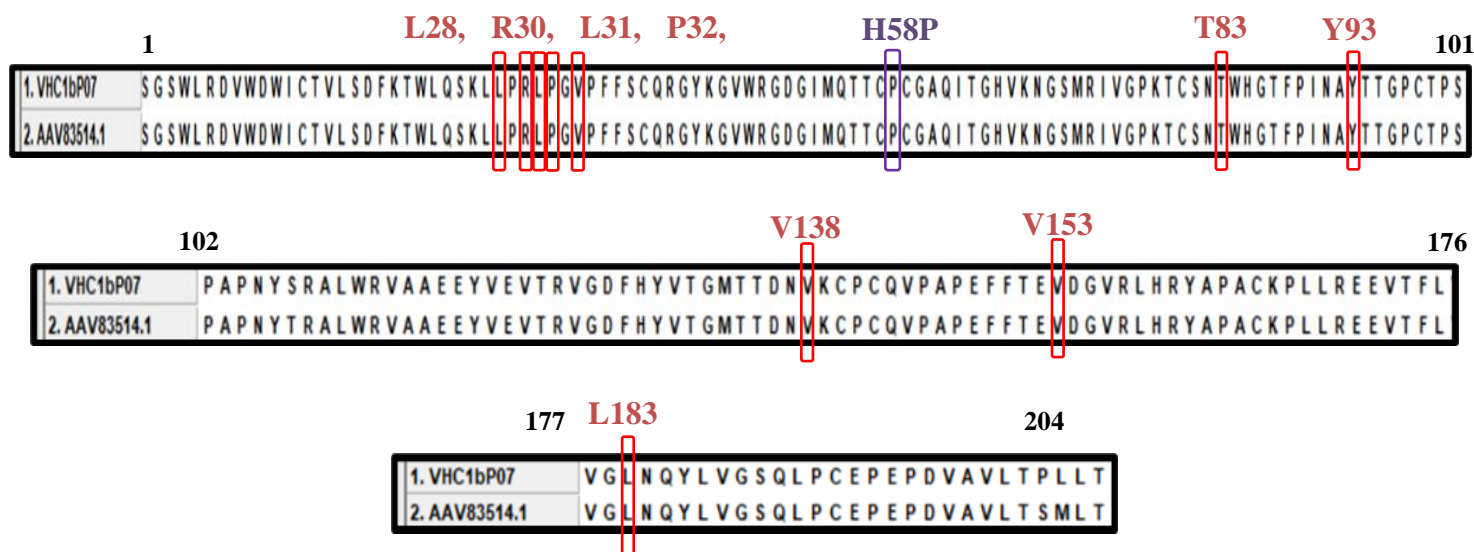
**Figura 19.** Alineamiento múltiple MEGA X de la secuencia de la NS5A de la paciente NR (P08) y de la secuencia de referencia (ACS15692.1). Se muestran los aminoácidos de la secuencia silvestre (*wild type*), sin SAR en rojo y aminoácidos sustituidos con residuos caracterizados como SAR en morado.

De la paciente P08 se obtuvo un fragmento del marco de lectura de NS5A G1a desde el aa 34 al aa 168, (Figura 19) que corresponde a una parte del dominio I (aa 33 al aa 213) (figura 1), que es el más conservado y de estructura más compleja, dentro de este dominio se han reportado 13 SAR a inhibidores de NS5A (Mawatari S. 2018; Sharafi. 2019; Felix-Tavares RC. 2018; Salmon D. 2018; Malta F. 2017; Zhao Li. 2017, Knops. 2018). La secuencia obtenida permitió analizar solo 8 de las 13. El programa identificó 3 SAR en NS5A de baja resistencia: T83M, V34F y V138P (Knops, 2018) estas últimas SAR con diferente aa en la misma posición. La paciente no presentó factores demográficos o bioquímicos reportados como asociados a la no respuesta al tratamiento con Viekira Pak (Flisiak R. 2016).

### 8.3.2 Paciente (P07) no respondedor al fármaco Harvoni (inhibidor de la NS5A ledipasvir)

El alineamiento múltiple para detectar SAR NS5A de alta resistencia debido a la falla al tratamiento se presenta en figura 19; se trató de un paciente, sexo masculino, de 58 años, con

cirrosis CP-B, virus G1b, CV inicial de 1,030,787 copias/ml y nula respuesta al tratamiento a la semana 12 (fin de tratamiento).



**Figura 20.** Alineamiento múltiple MEGA X secuencia de la NS5A de pacientes con NR VHC1b P07 y secuencia AAV83514.1 (control). Se muestran los aminoácidos de la secuencia silvestre (*wild type*), sin SAR en rojo y aminoácidos sustituidos con residuos caracterizados como SAR en morado.

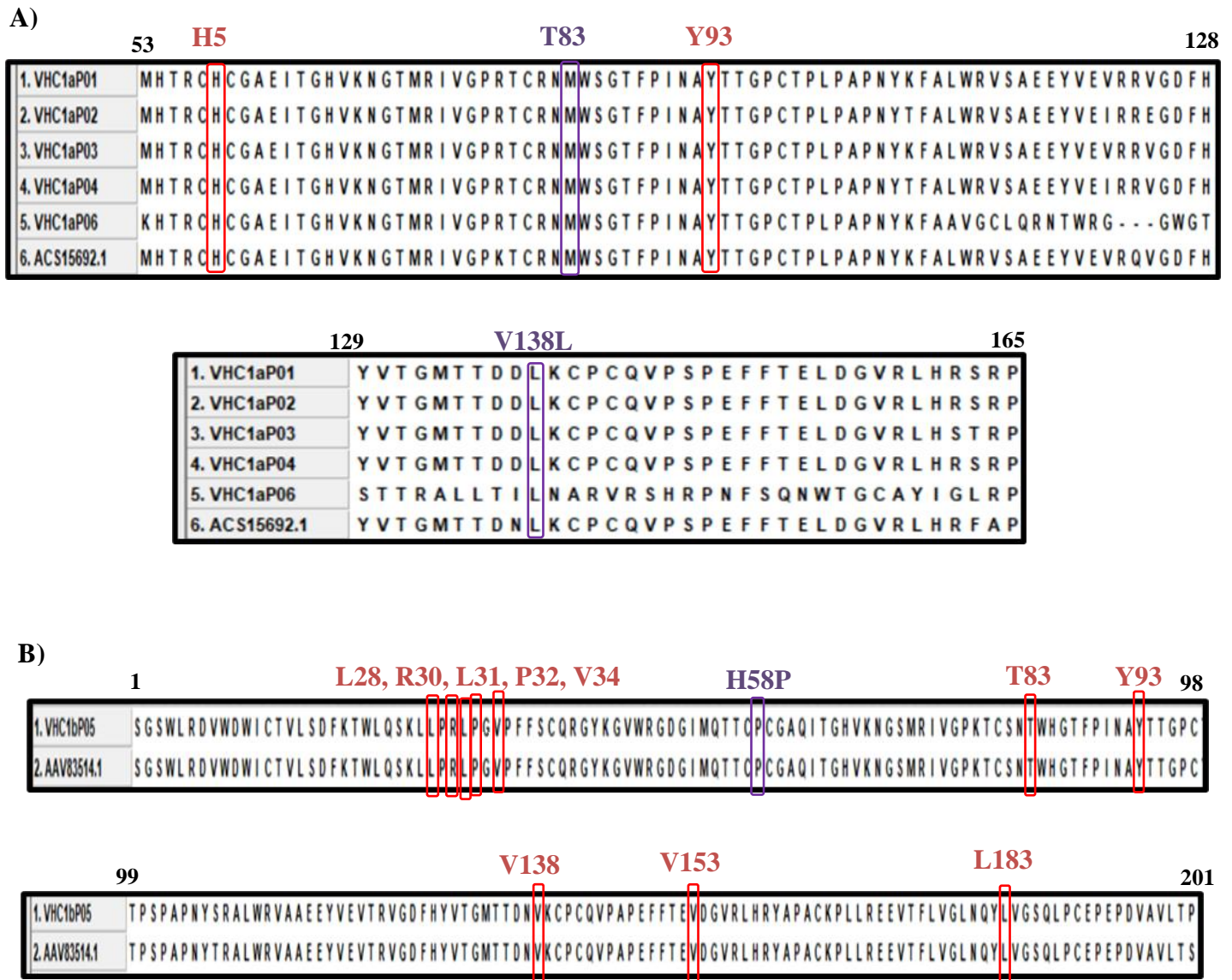
Del paciente P07 se obtuvo un fragmento de la proteína NS5A G1b desde el aa 1 al aa 204, (Figura 20), que corresponde estructuralmente a una hélice anfipática que es un sitio de unión con proteínas intracelulares del hospedero (aa 1 al aa 33), y una gran parte del dominio I (aa 33 al aa 213) (figura 1), dentro de este dominio se han reportado 13 SAR a inhibidores de NS5A arriba mencionado. La secuencia obtenida permitió analizar las 13. Fue detectada solamente la SAR H58P corresponde a niveles de resistencia baja para los inhibidores de la NS5A LDV y daclatasvir (DCV), esta SAR ha sido detectada en pacientes brasileños NR (Malta et al,2017). Este tipo de SAR suele generar resistencia hasta 1.2x en relación a la EC50 del inhibidor LDV, en sus variantes de aminoácido H58P/D se le atribuye una SAR de baja resistencia. Aunque

también se ha reportado como una variante H58D asociada a un nivel alto de resistencia >10 veces con LDV (Salmon D. 2018), otras variantes H58P/R y la P58/R/S asociadas a bajos niveles de resistencia (Rita Tavares, 2018)

Un probable factor para un mal pronóstico de NR al tratamiento en el paciente P07, pudiera haber sido, el sexo masculino, y albumina en suero de 3. g/dl. Ogawa et al. estudiaron factores asociados a la no respuesta con Harvoni, y el sexo masculino, albumina <3.5gr/dl, y bilirrubina >2.2 mg/dL estuvieron fuertemente asociado con ser un paciente NR con Harvoni (Ogawa E. 2017). El paciente a fin de tratamiento fue diagnosticado con carcinoma hepatocelular.

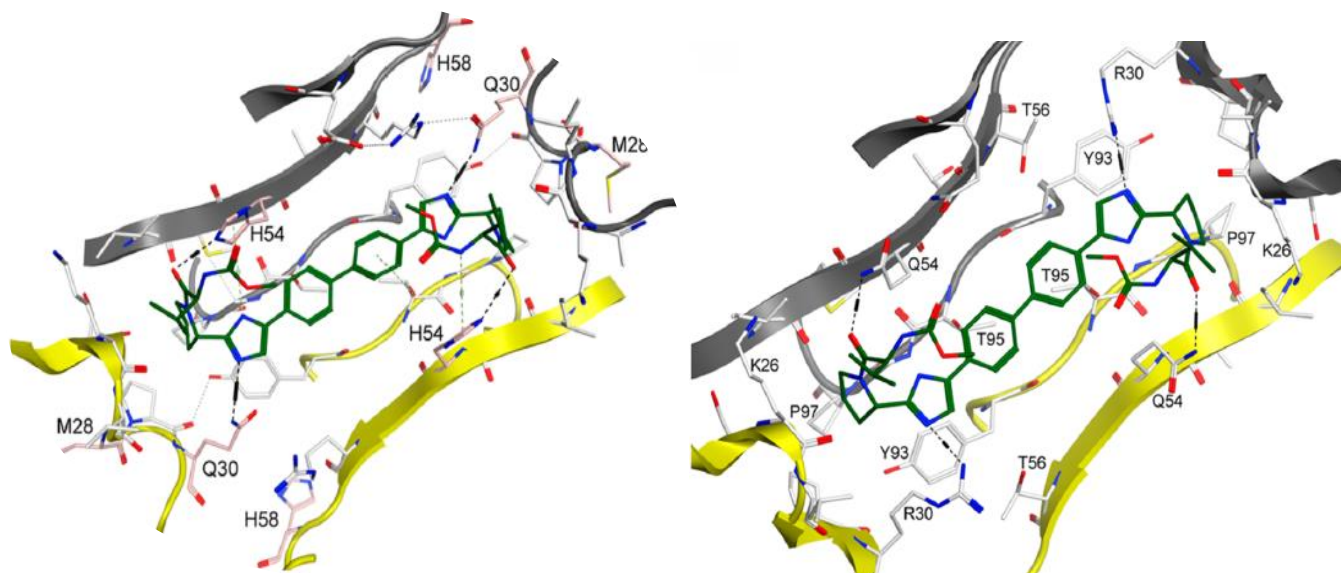
### **8.3.3 Pacientes G1a y G1b con RVS al fármaco Harvoni (inhibidor NS5A ledipasvir)**

Cinco pacientes con G1a y 1 G1b alcanzaron RVS con el tratamiento con el fármaco Harvoni (Tabla 5). Al obtener este estatus, los fragmento de la NS5 obtenido de cada uno de los pacientes se sometieron a un alineamiento múltiple, para detectar las SAR NS5A relevantes en el estudio, al no encontrar diferencias significativas se ubicaron polimorfismos de un solo nucleótido conocidos como SNP por sus sigla en inglés (*single nuclotide polymorphism*) que estuvieran asociados con la no respuesta al tratamiento, y a la vez considerando el estadio de la enfermedad en que se encontraban cada uno de los pacientes, en el caso de los pacientes P04, P03, P06, P01 y P02, con G1a, y con diagnóstico de Cirrosis CP-A se detectaron SAR NS5A de baja resistencia T83M y V138L (Figura 19). Con respecto al paciente P05, con G1b, y diagnóstico de Cirrosis CP-B, le fue detectada la SAR NS5A, H58P consideradas de baja resistencia (Rita Tavares, 2018) (Figura 20).



**Figura 21.** Alineamiento múltiple MEGA X de pacientes con RVS de G1a y G1b. A) VHC1aP04, P03, P01, P06, P02 y ACS (control) B) VHC1b P05 y AAV83 (control). Se muestran los aminoácidos de la secuencia silvestre (*wild type*), sin SAR en rojo y aminoácidos sustituidos con residuos caracterizados como SAR en morado.

Al encontrar este SNP como H58P en el paciente G1b y los SNPs V138L, y T83M en los pacientes G1a, que ya consideradas como SAR pueden referirse a indicadores de resistencia, dichas SAR ya han sido estudiadas y solo presentan un 20% de reducción mínima en la actividad de los antivirales. La SAR en sitios de unión de terminales de la hélice anfipática y en los aminoácidos terminales del dominio 1, no suelen tener una actividad considerable al estar separados de los sitios de anclaje de ledipasvir a la NS5A como los residuos T95, Y93, K26, I27, I28, P97, R30 y Q54 (Figura 21) (Baraka, 2015), y por lo tanto no son considerados como un blanco de interés, esto puede traducirse en que el funcionamiento de la molécula inhibidora de NS5A (ledipasvir) no se vio afectada, en consecuencia, la terapia con los componentes del fármaco Harvoni fue una respuesta rápida en los pacientes con G1a y G1b a fin de tratamiento (semana 12) (Knops,2018).

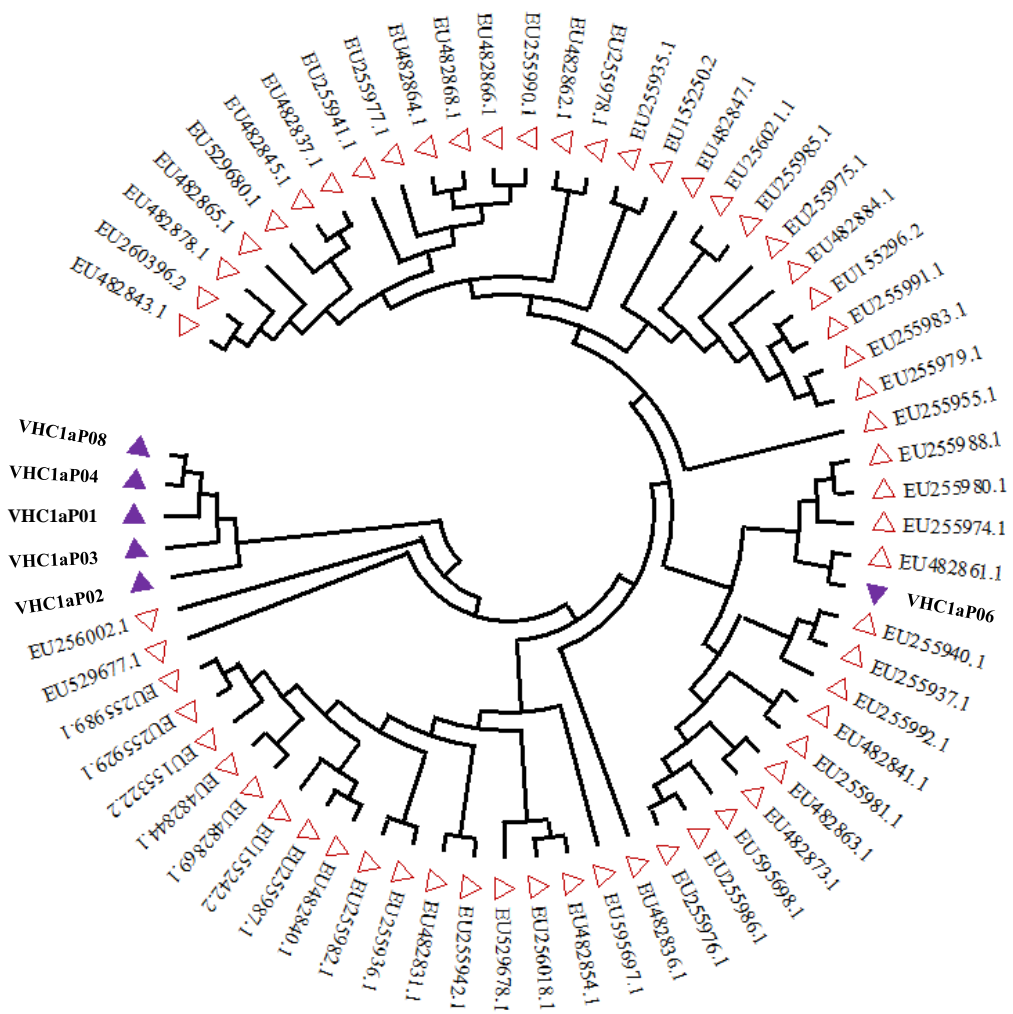


**Figura 22.** Forma de anclaje a NS5A para ledipasvir. Los átomos de carbono están coloreados en verde para ledipasvir y en blanco para los residuos proteicos. Los puentes de hidrógeno se muestran como líneas punteadas y los límites de las proteínas del sitio de unión se muestran en una representación de dibujo 3d, donde el primer monómero se muestra en amarillo, mientras que el segundo monómero se muestra en gris (Baraka,2015).

Con respecto a la paciente P08 NR al tratamiento Viekira Pak (inhibidor de la NS5A, ombitasvir), le fue detectada 2 SAR en NS5A (T83M y V138L), detectadas también en los 5 pacientes G1a y con RVS a Harvoni (inhibidor de la NS5A, ledipasvir). La SAR V34F muestra una diferencia considerable entre la NR y la RVS entre los pacientes con G1a, al respecto se ha demostrado que la SAR R30 que tiene las variantes (R30E, Q30H/R, Q30A/H/L) dependiendo de la variante se considerada de baja a alta resistencia a los inhibidores de NS5A, pero se ha demostrado que R30 está asociada con las mutaciones que ocurren en Q24 y V34 (Knops E, 2018). Por otro lado, los residuos 24, 30 y 34 están ubicados en la región de unión entre la hélice anfipática N-terminal con la porción citosólica estructurada del dominio I. A esta región se le ha sugerido como el bolsillo de enlace para AAD en diferentes modelos computacionales (Nettles, JH. 2014). Si bien no alcanzamos a obtener el aa 24 y aa 30 (Figura 21), tenemos que considerar que la mutación V34F detectada en la paciente G1a, NR a Viekira –Pak (inhibidor NS5A, ombitasvir), que el residuo 34 ésta ubicado en el sitio de unión a los ADD, la mutación ha sido reportada como V34F en otros estudios (Knops E, 2018).

#### **8.4 Árbol filogenético de las secuencias G1a y G1b**

Con base en 60 secuencias de la proteína NS5A G1a y 60 NS5A G1b se generó un árbol filogenético circular en MEGA-X comparando cada una de las secuencias con sus respectivos genotipos para ubicar su posible origen filogenético más cercano en un análisis simple. Un árbol filogenético se basó en el precedente de tener una gran cantidad de mutaciones variables con respecto al tiempo, sin embargo, al no contar con un tiempo exacto en el periodo de cambio entre nucleótidos ni las cantidades de mutaciones por sujeto, se eligió usar el modelo general, que establece que la frecuencia de cada tipo de nucleótidos es distinta, y la tasa de cambios entre los nucleótidos es diferente para cada tipo, dado que en este modelo no todas las regiones de la secuencia evolucionan a la misma velocidad. Para ubicar la matriz de distancia se eligió utilizar un árbol por el método Neighbor-joining, sabiendo que no tenemos contemplado una evolución a una misma velocidad (COMAV,2020).

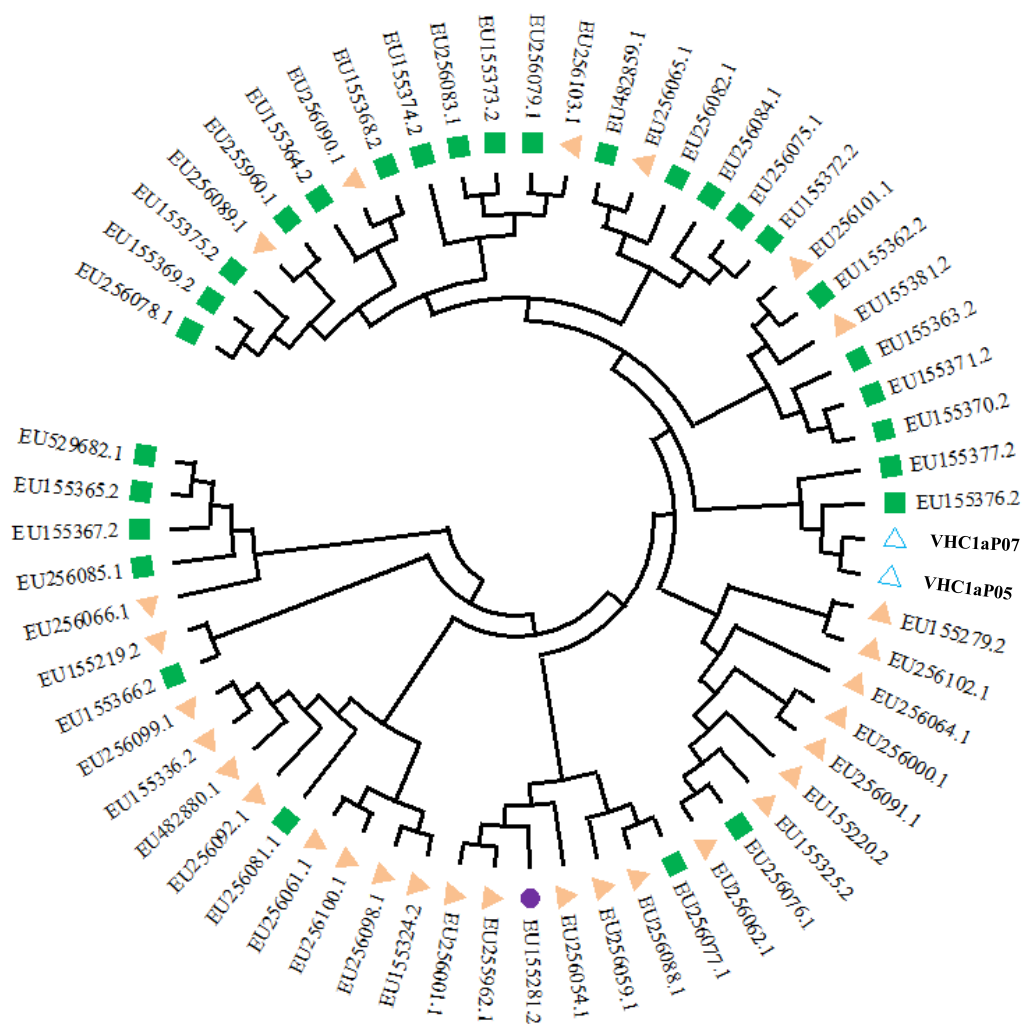


**Figura 23.**Árbol filogenético circular de secuencias G1a de VHC. Secuencias del estudio (triángulo morado) y origen EU (triángulo rojo).

Al ser un árbol con una cantidad limitada de secuencias por analizar es complicado realizar un análisis filogenético detallado, de esta forma, el análisis solo se limitó a su posible parentesco con secuencias de orígenes geográficos distintos, así mismo como su posición en el árbol y ramificación.

La variabilidad en el árbol de secuencias NS5A G1a de VHC de nuestro estudio como P06 (Figura 23), muestra un origen evolutivo similar a secuencias de origen estadounidense,

específicamente EU482861.1 las cuales, podrían definirse como parálogas al provenir de una misma especie viral (VHC), en el caso de las pacientes P01, P02, P03, P04 y P08 al ser secuencias demasiadas cortas es complicado detectar alguna diferencia filogenética de acuerdo a su sitio en el árbol, por lo tanto, solo podría especularse su posible similitud con secuencias estadounidenses.



**Figura 24.**Árbol filogenético circular de secuencias G1b de VHC. Secuencias del estudio (Triangulo azul), origen sueco (Cuadrado verde) y origen alemán (Circulo morado).

En el caso de las secuencias G1b del VHC los pacientes P05 y P07 en comparación con secuencias de origen americano y europeo, caen directamente con una posible semejanza filogenética con secuencias de origen europeo específicamente sueco, la variabilidad en las secuencias del árbol G1b permite tener una variedad filogenética más amplia pero de igual manera limitada para llevar a cabo un análisis detallado de las variantes debido a la cantidad de secuencias en el estudio.

## 9 CONCLUSIONES

---

-Se diseñaron iniciadores específicos y degenerados para obtener la región codificante de la región NS5A para el G1a y G1b con la mayor capacidad de captación de variantes genéticas, que permitirán en futuras investigaciones detectar aún más variaciones genéticas del virus VHC relacionadas a resistencia de la proteína NS5A.

-Se diseñaron iniciadores para obtener la región NS5A G1a demostrando su capacidad de amplificación al obtener el 75% de la secuencia de la proteína NS5A G1a.

-Se diseñaron iniciadores para obtener la región NS5A G1b demostrando su capacidad de amplificación obtener el 89% de la secuencia de la proteína NS5A G1b.

-Se encontraron SAR de baja resistencia (H58P) que están asociadas a inhibir la actividad de DCV y LDV en las dos secuencias NS5A G1b de paciente NR y paciente con RVS a Harvoni (inhibidor de la NS5A, ledipasvir)

-Se detectaron SAR de baja resistencia (T83M y V138P), y que están asociadas a inhibir la actividad de DCV y LDV en 5 secuencias NS5A G1a (P01, P02, P03, P04, P06) los pacientes tuvieron RVS a Harvoni (inhibidor de la NS5A, LDV)

-Se detectaron SAR de baja resistencia (T83M y V138P), que están asociadas a inhibir la actividad de DCV y LDV en 1 secuencias NS5A G1a, paciente (P08) NR a Viekira-Pak (inhibidor de la NS5A, OBV), y la SAR V34F el aa34 se encuentra muy cerca del sitio de unión a AAD en la NS5A.

-La falla al tratamiento con Harvoni en este estudio estuvo asociado a factores (demográfico, bioquímicos, estadio de la enfermedad hepática) del paciente y no necesariamente a la presencia de SAR NS5A

-La falla al tratamiento con Viekira-Pak en este estudio, puede estar asociada a la presencia de 2 SAR de baja resistencia y de una SAR (V34F) localizada cerca del sitio de unión de la NS5A a los AAD.

-El origen inmediato de las secuencias en pacientes G1a se asocia a secuencias estadounidenses (Colorado, Massachussets, Tennessee), mientras que en el G1b la variabilidad es más rica en relación a un origen europeo y estadounidense, lo que puede predisponer a generar SAR más asociadas a secuencias de origen europeo.

## 10 REFERENCIAS

---

Abbvie. (2017). Viekira pack. *Abbvie*.

Abbvie. (2020). Viekira pack. *Abbvie*

Aguirre, A. D. B. (2008). FUNCIÓN DE LA PROTEASA NS3 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C. 6. doi:REB 27(3): 79-84

Aiza-Haddad, I., Ballesteros-Amozurrutia, A., Borjas-Almaguer, O. D., Castillo-Barradas, M., Castro-Narro, G., Chavez-Tapia, N., . . . Bosques-Padilla, F. (2018). The Mexican consensus on the treatment of hepatitis C. *Rev Gastroenterol Mex*, 83(3), 275-324. doi:10.1016/j.rgm.2017.11.001

Akaberi, D., Bergfors, A., Kjellin, M., Kameli, N., Lidemalm, L., Kolli, B., . . . Lennerstrand, J. (2018). Baseline dasabuvir resistance in Hepatitis C virus from the genotypes 1, 2 and 3 and modeling of the NS5B-dasabuvir complex by the in silico approach. *Infect Ecol Epidemiol*, 8(1), 1528117. doi:10.1080/20008686.2018.1528117

Aldunate, F., Echeverria, N., Chiodi, D., Lopez, P., Sanchez-Ciceron, A., Fajardo, A., . . . Moreno, P. (2018). Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B Resistance-Associated Substitutions in Genotype 1 Uruguayan Infected Patients. *Dis Markers*, 2018, 2514901. doi:10.1155/2018/2514901

Amaco. (2020). Principales interacciones NS5A.

Aurora Casanova Rituerto, T. C. T. (2015). HEPATITIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C. *Servicios de Microbiología y Gastroenterología, Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat (Barcelona)*.

Aygen, B., Demirturk, N., Yildiz, O., Celen, M. K., Celik, I., Barut, S., . . . Infectious Diseases, T. (2020). Real-world efficacy, safety, and clinical outcomes of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir +/- dasabuvir +/- ribavirin combination therapy in patients with hepatitis C virus genotype 1 or 4 infection: The Turkey experience experience. *Turk J Gastroenterol*, 31(4), 305-317. doi:10.5152/tjg.2020.19197

Bagaglio, S., Uberti-Foppa, C., & Morsica, G. (2017). Resistance Mechanisms in Hepatitis C Virus: implications for Direct-Acting Antiviral Use. *Drugs*, 77(10), 1043-1055. doi:10.1007/s40265-017-0753-x

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. *J Chem Inf Model*, 55(2), 362-373. doi:10.1021/ci400631n

Carballal, G. (2014). *Virologia medica* E. Oscar (Ed.) (pp. 793).

D. en C. Julio Roberto Reyes Leyva, D. J. C. P. P., M. en C. Verónica Moreno Córdova, D. en C. Mario García Carrasco. (2018). *DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE CITOCINAS IL-5, IL-9, IL-13, IL-17A EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASMA Y SU ASOCIACIÓN CON EL GRADO DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD*. (Protocolo de investigación), CIBIOR.

David M. Knipe, P. M. H. (2013). Fields Virology 6th edition. In P. M. H. David M. Knipe (Ed.), *Fields Virology 6th edition* (sixth ed., Vol. 1, pp. 2582): LWW.

Dominique Salmon, P. T., Camille Gilbert, Caroline Solas, Eva Lafourcade, Julie Chas., Lionel Piroth, K. L., Christine Katlama, Gilles Peytavin, Hugues Aumaitre, Laurent Alric., François Boué, P. M., Isabelle Poizot-Martin, Eric Billaud, Eric Rosenthal, Alissa Naqvi., Patrick Miaillhes, F. B.-S., Laure Esterle, Patrizia Carrieri, François Dabis, Philippe Sogni., & Wittkop, L. (2018). Factors associated with DAA virological treatment failure and resistance-associated substitutions description in HIV/HCV coinfecting patients. *World journal hepatology*, 11, 16. doi:DOI: 10.4254/wjh.v10.i11.856

Dra. Lizeth Vera de Leon, D. J. A. J. N., Dr. Marcelino Diaza Gomez, Dr Jorge Mendez, Dr. Ruby Ann Chirino Sprung, Dr. Margarita Dehesa Violante, Dra. Leticia Casillas Davila, Dra. Maria Teresa Rizo Robles, Dra. Rocio Torres Ibarra, Dr. Samuel Wong Gonzales. (2005). Panorama epidemiológico y situacional de la hepatitis C en México. *IMBIOMED*, 8.

Eltahla, A. A., Rodrigo, C., Betz-Stablein, B., Grebely, J., Applegate, T., Luciani, F., . . . In, C. S. G. (2017). Analysis of resistance-associated substitutions in acute hepatitis C virus infection by deep sequencing across six genotypes and three continents. *J Viral Hepat*, 24(1), 37-42. doi:10.1111/jvh.12615

EMA. (2017). *Harvoni*.

EMA. (2020). Ficha técnica o resumen de las características del producto harvoni.

Esposito, I., Marciano, S., Haddad, L., Galdame, O., Franco, A., Gadano, A., . . . Trinks, J. (2018). Prevalence and Factors Related to Natural Resistance-Associated Substitutions to Direct-Acting Antivirals in Patients with Genotype 1 Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*, 11(1), 3.

Esposito, I., Marciano, S., Haddad, L., Galdame, O., Franco, A., Gadano, A., . . . Trinks, J. (2018). Prevalence and Factors Related to Natural Resistance-Associated Substitutions to Direct-Acting Antivirals in Patients with Genotype 1 Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*, *11*(1). doi:10.3390/v11010003

Eybpoosh, S., & Kiminezhad Malaie, M. (2018). Comment on "Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B Resistance-Associated Substitutions in Genotype 1 Uruguayan Infected Patients". *Dis Markers*, *2018*, 8698263. doi:10.1155/2018/8698263

Franciscus, A. (2012). A Brief History of Hepatitis C. *HCSP FACT SHEET*, 10. Retrieved from

Gosálbez, C. H.-A. (2017). *NUEVOS ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA EN EL TRATAMIENTO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C*.

Guevara, V. A. G. (2017). *Caracterización de mutaciones de resistencia asociadas a inhibidores de NS5A en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C*. Universidad de curuña.

Huang, W., Wang, M., Gong, Q., Yu, D., Chen, P., Lin, J., . . . Zhang, X. (2019). Comparison of Naturally Occurring Resistance-Associated Substitutions Between 2008 and 2016 in Chinese Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Microb Drug Resist.* doi:10.1089/mdr.2018.0360 inc., A. (2017, Noviembre 2017). *Viekira pak*. (ID: 4179534 USPI112017).

ISHT. (2014). Virus de la hepatitis C. *DATABIO*, 4.

Janssen, M. C., van Engelen, B., Kapusta, L., Lammens, M., van Dijk, M., Fischer, J., . . . Morava, E. (2013). Symptomatic lipid storage in carriers for the PNPLA2 gene. *Eur J Hum Genet*, *21*(8), 807-815. doi:10.1038/ejhg.2012.256

Jesus Fernando Guerrero Romero, A. c., Martha Rodriguez Moran. (1996). Prevalencia y factores de riesgo asociados a Hepatitis C en donadores de sangre en el municipio de Durango, Mexico. *Salud pública de méxico*, 7.

Jimenez, L. F. (2003). *Biología Celular y molecular* Pearson (Ed.) (pp. 912).

Juan Carlos Restrepo Gutiérrez<sup>1</sup> , A. I. T. M. (2011). Hepatitis C. *Medicina & Laboratorio* *2011*, *17*, 18.

Juan Pablo Gutiérrez, P., Héctor Sucilla-Pérez ,MHML,Carlos J Conde-González, PhD, José Antonio Izazola, DSc,Martin Romero-Martínez, PhD, Mauricio Hernández-Ávila, DSc. (2016). Disminución de la seroprevalencia de hepatitis C en México: resultados de la Ensanut 2012. *Salud pública de méxico*, *58*, 8.

Kitab, B., Satoh, M., Ohmori, Y., Munakata, T., Sudoh, M., Kohara, M., & Tsukiyama-Kohara, K. (2019). Ribonucleotide reductase M2 promotes RNA replication of hepatitis C virus by protecting NS5B protein from hPLIC1-dependent proteasomal degradation. *J Biol Chem*, 294(15), 5759-5773. doi:10.1074/jbc.RA118.004397

Knops, E., Sierra, S., Kalaghatgi, P., Heger, E., Kaiser, R., & Kalinina, O. V. (2018). Epistatic Interactions in NS5A of Hepatitis C Virus Suggest Drug Resistance Mechanisms. *Genes (Basel)*, 9(7). doi:10.3390/genes9070343

Krishnan, P., Beyer, J., Mistry, N., Koev, G., Reisch, T., DeGoey, D., . . . Pilot-Matias, T. (2015). In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(2), 979-987. doi:10.1128/AAC.04226-14

Kuntzen, T., Timm, J., Beral, A., Lennon, N., Berlin, A. M., Young, S. K., . . . Allen, T. M. (2008). Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naive patients. *Hepatology*, 48(6), 1769-1778. doi:10.1002/hep.22549

Luis Enrique Santiago-Torres, N. C.-C., Gustavo Gregorio Guerrero-Rodríguez. (2015). Seroprevalencia de hepatitis C en usuarios de unidades de medicina familiar en Querétaro, México,. *UNAM*, 22, 5. doi:10.1016/S1405-8871(16)30036-0

M.Knipe, D. (2007). *Fields Virology*

Malta, F., Gaspareto, K. V., Lisboa-Neto, G., Carrilho, F. J., Mendes-Correa, M. C., & Pinho, J. R. R. (2017). Prevalence of naturally occurring NS5A resistance-associated substitutions in patients infected with hepatitis C virus subtype 1a, 1b, and 3a, co-infected or not with HIV in Brazil. *BMC Infect Dis*, 17(1), 716. doi:10.1186/s12879-017-2817-7

Manns, M. P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J. M., Razavi, H., Terrault, N., & Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17006. doi:10.1038/nrdp.2017.6

Mathew, S., Faheem, M., Ibrahim, S. M., Iqbal, W., Rauff, B., Fatima, K., & Qadri, I. (2016). Hepatitis C virus and neurological damage. *World J Hepatol*, 8(12), 545-556. doi:10.4254/wjh.v8.i12.545

México, U. N. A. d. (2017). Virología: Departamento de microbiología y parasitología.

Michael P. Manns, M. B., Ed Gane, Jean-Michel Pawlotsky, Homie Razavi,, & Younossi, N. T. a. Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *PRIMER*, 3, 19.

Morales, M. H. (2018). *TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C: FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA NS5A*.

- Nettles, J. H., Stanton, R. A., Broyde, J., Amblard, F., Zhang, H., Zhou, L., . . . Schinazi, R. F. (2014). Asymmetric binding to NS5A by daclatasvir (BMS-790052) and analogs suggests two novel modes of HCV inhibition. *J Med Chem*, *57*(23), 10031-10043. doi:10.1021/jm501291c
- Ogawa, E., Furusyo, N., Nomura, H., Dohmen, K., Higashi, N., Takahashi, K., . . . Kyushu University Liver Disease Study, G. (2017). NS5A resistance-associated variants undermine the effectiveness of ledipasvir and sofosbuvir for cirrhotic patients infected with HCV genotype 1b. *J Gastroenterol*, *52*(7), 845-854. doi:10.1007/s00535-016-1290-1
- OMS. (2017). INFORME MUNDIAL SOBRE LAS HEPATITIS, 2017. *Organizacion mundial de la salud*. Retrieved from
- Panduro, A., Roman, S., Khan, A., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Martinez-Lopez, E., . . . Mizokami, M. (2010). Molecular epidemiology of hepatitis C virus genotypes in west Mexico. *Virus Res*, *151*(1), 19-25. doi:10.1016/j.virusres.2010.03.009
- Pawlotsky, J. M., Feld, J. J., Zeuzem, S., & Hoofnagle, J. H. (2015). From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J Hepatol*, *62*(1 Suppl), S87-99. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.006
- Rita Chelly Felix Tavares, A. C. d. C., Amaral Feldner, João Renato Rebello, Fernanda de Mello Malta. (2018). Prevalence of resistance-associated substitutions to direct-acting antiviral agents in hemodialysis and renal transplant patients infected with hepatitis C virus. *Infect Drug Resist*, *11*, 1993-2000. doi:10.2147/IDR.S169512
- Sandmann, L., Schulte, B., Manns, M. P., & Maasoumy, B. (2019). Treatment of Chronic Hepatitis C: Efficacy, Side Effects and Complications. *Visc Med*, *35*(3), 161-170. doi:10.1159/000500963
- Santos-López, G., Sosa-Jurado, F., Vallejo-Ruiz, V., Meléndez-Mena, D., & Reyes-Leyva, J. (2008). Prevalence of hepatitis C virus in the Mexican population: A systematic review. *Journal of Infection*, *56*(4), 281-290. doi:10.1016/j.jinf.2008.02.001
- Sharafi, H., Maleki, S., & Alavian, S. M. (2019). Prevalence of hepatitis C virus NS5A resistance-associated substitutions in chronic infection with genotype 1: A pooled analysis based on deposited sequences in GenBank. *Virus Res*, *259*, 54-61. doi:10.1016/j.virusres.2018.10.014
- social, I. m. d. s. (2010). Guía de Referencia Rápida. Diagnóstico y Tratamiento de Hepatitis C. Guía de Práctica Clínica GPC.
- Sol Gómez-Aparicio, J. V. E. y. F. A. G. (2016). Nuevas perspectivas en el tratamiento farmacológico de la Hepatitis C.

- Sorbo, M. C., Cento, V., Di Maio, V. C., Howe, A. Y. M., Garcia, F., Perno, C. F., & Ceccherini-Silberstein, F. (2018). Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist Updat*, 37, 17-39. doi:10.1016/j.drug.2018.01.004
- Soria, M. E., Gregori, J., Chen, Q., Garcia-Cehic, D., Llorens, M., de Avila, A. I., . . . Perales, C. (2018). Pipeline for specific subtype amplification and drug resistance detection in hepatitis C virus. *BMC Infect Dis*, 18(1), 446. doi:10.1186/s12879-018-3356-6
- Sosa-Jurado, F., Santos-López, G., Guzmán-Flores, B., Ruiz-Conde, J. I., Meléndez-Mena, D., Vargas-Maldonado, M. T., . . . Reyes-Leyva, J. J. V. J. (2010). Hepatitis C virus infection in blood donors from the state of Puebla, Mexico. 7(1), 18. doi:10.1186/1743-422x-7-18
- Stefania Paolucci, L. F., Bianca Marian, Roberto Gulminetti, Stefano Novati, Giorgio Barbarini, Raffaele Bruno and Fausto Baldanti. (2013). Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virology journal*, 7.
- Suhail, M., Sohrab, S. S., Qureshi, A., Tarique, M., Abdel-Hafiz, H., Al-Ghamdi, K., & Qadri, I. (2018). Association of HCV mutated proteins and host SNPs in the development of hepatocellular carcinoma. *Infect Genet Evol*, 60, 160-172. doi:10.1016/j.meegid.2018.02.034
- Taltavull, A. C. R. y. T. C. (2015). HEPATITIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C. *Control de calidad SEIMC*, 11.
- Timpe, J. M., & McKeating, J. A. (2008). Hepatitis C virus entry: possible targets for therapy. *Gut*, 57(12), 1728-1737. doi:10.1136/gut.2007.141630

## 11.ANEXOS

Anexo 1. Carta de consentimiento Informado

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN  
Y POLITICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
Carta de consentimiento informado para  
participación en protocolos de investigación  
(adultos)**

Nombre del estudio:	<b>Detección y análisis de las sustituciones asociadas a resistencia (SAR) en la proteína NS5A VHC, en pacientes con falla al tratamiento con antivirales de acción directa (AAD) de nueva generación”</b>
Patrocinador externo (si aplica):	_____ No aplica
Lugar y fecha:	_____
Número de registro institucional:	_____ En tramite
Justificación y objetivo del estudio:	Estimado paciente, usted tiene la información por parte de su médico gastroenterólogo, de que es un paciente que no respondió a alguno de los tratamientos con Viekira-Pak o

respondedor . Su participación en este proyecto, es para conocer si Usted porta al virus de la hepatitis C que es resistente (no le hizo nada el medicamento que tomo). Lo anterior se podrá saber con obtener la secuencia de nucleótidos (que es una parte del genoma del virus), a partir de una muestra de su sangre (muy parecido a cuando le han determinado su carga viral (cuántos virus tiene en circulación))

Procedimientos:

---

Primero se le tomará a Usted una muestra de sangre, para detectar y analizar el virus de hepatitis C presente en estas. Usando lo que se llaman técnicas de biología molecular, obtendremos esa secuencia de nucleótidos del virus, y así sabremos una de las posibles causas de que Usted no haya tenido una respuesta viral sostenida (eliminación del virus C)

Posibles riesgos y molestias:

---

El riesgo y molestia es el un probable moretón en el área de punción al extraerle la muestra de sangre

---

	durante 12 semanas, no le hizo nada al virus que porta usted.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Sabrá su resultado, este se le dará a conocer a su médico gastroenterólogo tratante, y el resultado le servirá a su médico tratante para elegir otra alternativa más certera, para erradicar al virus de su torrente sanguíneo
Participación o retiro:	Usted se podrá retirar del proyecto al que fue invitado(a), en cualquier momento, sin que esto afecte el servicio médico u otros que le otorga ser derechohabiente del seguro social.
Privacidad y confidencialidad:	El responsable del proyecto le garantiza que sus datos personales, serán resguardados en confidencialidad, y en ningún momento usados en publicaciones en línea, escritas o en exposiciones sobre el tema en congresos, foros o carteles.

---

**Declaración de consentimiento:**

Después de haber leído y habiéndome explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

- No acepto participar en el estudio.
- Si acepto participar y que se tome la muestra solo para este estudio.
- Si acepto participar y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su sangre hasta por 5 años tras lo cual se destruirá la misma.

**En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:**

Investigadora o Investigador

Responsable:

**DC Francisca Sosa Jurado**

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Metepec,  
Atlixco, Pueblas, IMSS

Matricula: 5913063

Correo electrónico: [sosajurado@hotmail.com](mailto:sosajurado@hotmail.com),

Celular: 2222125633

Colaboradores:

---

**Dr Miguel Ángel Mendoza Torres**

Servicio de gastroenterología, UMAE, HE Centro Médico  
Nacional Gral Div Manuel Ávila Camacho, Puebla, Puebla,  
IMSS

Matricula: 9201386

Correo electrónico: [miguel.mendozat@yahoo.com.mx](mailto:miguel.mendozat@yahoo.com.mx)

Celular: 2221184722,

**Dr Daniel Erasmo Meléndez Mena,**

Coordinación de Enseñanza, UMAE, HE Centro Médico  
Nacional Gral Div Manuel Ávila Camacho, Puebla, Puebla,  
IMSS

Matricula: 9777938

Correo electrónico: [daniel\\_melendez@yahoo.com](mailto:daniel_melendez@yahoo.com)

Celular: 2222124204

**DC Gerardo Santos López**

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Metepec,

Atlixco, Puebla, IMSS

Matricula: 99223870

Correo electrónico: [gerardo.santos.lopez@gmail.com](mailto:gerardo.santos.lopez@gmail.com)

Celular: 2224238445

**I.B. Ricardo Arturo Cruz Cervantes**

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Metepec,

Atlixco, Puebla, IMSS

Matricula: 97222354

Correo electrónico: [ric94snake@hotmail.com](mailto:ric94snake@hotmail.com)

Celular: 5533666573

---

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a:  
Comité Nacional de Investigación en Salud del CNIS del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4°  
piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720.  
Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: [comité.eticainv@imss.gob.mx](mailto:comité.eticainv@imss.gob.mx)

---

Nombre y firma del participante

Nombre y firma de quien obtiene el  
consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

---

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810

Anexo 2. Concentrado Secuencias 1a y 1b

Hepatitis C virus subtipo 1a aislado VHC- Genoma completo			
#	Accesion number	#	Accesion number
1	EU482864.1	39	EU482837.1
2	EU255977.1	40	EU482836.1
3	EU256021.1	41	EU482831.1
4	EU256018.1	42	EU155242.2
5	EU256002.1	43	EU260396.2
6	EU255955.1	44	EU255992.1
7	EU255942.1	45	EU255991.1
8	EU255941.1	46	EU255990.1
9	EU255940.1	47	EU255989.1
10	EU255937.1	48	EU255988.1
11	EU255936.1	49	EU255987.1
12	EU255935.1	50	EU255986.1
13	EU255929.1	51	EU255985.1
14	EU595698.1	52	EU255983.1
15	EU595697.1	53	EU255982.1
16	EU529680.1	54	EU255981.1
17	EU529678.1	55	EU255980.1
18	EU529677.1	56	EU255979.1
19	EU155322.2	57	EU255978.1
20	EU155296.2	58	EU255976.1
21	EU155250.2	59	EU255975.1
22	EU482884.1	60	EU255974.1
23	EU482878.1		
24	EU482873.1		
25	EU482869.1		
26	EU482868.1		
27	EU482866.1		
28	EU482865.1		
29	EU482863.1		
30	EU482862.1		
31	EU482861.1		
32	EU482854.1		
33	EU482847.1		
34	EU482845.1		
35	EU482844.1		
36	EU482843.1		
37	EU482841.1		
38	EU482840.1		

Hepatitis C virus subtipo 1b aislado VHC- Genoma completo			
#	Accesion number	#	Accesion number
1	EU256081.1	39	EU256062.1
2	EU256092.1	40	EU256061.1
3	EU155366.2	41	EU256059.1
4	EU155336.2	42	EU255960.1
5	EU155325.2	43	EU529682.1
6	EU155324.2	44	EU155377.2
7	EU155281.2	45	EU155381.2
8	EU155279.2	46	EU155376.2
9	EU482880.1	47	EU155375.2
10	EU482859.1	48	EU155374.2
11	EU155220.2	49	EU155373.2
12	EU155219.2	50	EU155372.2
13	EU255962.1	51	EU155371.2
14	EU256085.1	52	EU155370.2
15	EU256084.1	53	EU155369.2
16	EU256083.1	54	EU155368.2
17	EU256082.1	55	EU155367.2
18	EU256079.1	56	EU155365.2
19	EU256078.1	57	EU155364.2
20	EU256077.1	58	EU155363.2
21	EU256076.1	59	EU155362.2
22	EU256075.1	60	EU256103.1
23	EU256054.1		
24	EU256001.1		
25	EU256000.1		
26	EU256103.1		
27	EU256102.1		
28	EU256101.1		
29	EU256100.1		
30	EU256099.1		
31	EU256098.1		
32	EU256091.1		
33	EU256090.1		
34	EU256089.1		
35	EU256088.1		
36	EU256066.1		
37	EU256065.1		
38	EU256064.1		

## Anexo 3. Análisis de parámetros en IDT. Primer Quest

1F.6290-6312-22pb

GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC

GTT CCC TTT GTG TCC TGC CAA C

Bases 22

CLEAR SEQUENCE

Try the new batch mode here

SpecSheet (Default) ▼

Target type DNA ▼

Oligo Conc  µM

Na<sup>+</sup> Conc  mM

Mg<sup>++</sup> Conc  mM

dNTPs Conc  mM

### Results

RESUSPENSION


DILUTION

SEQUENCE	5'- GTT CCC TTT GTG TCC TGC CAA C -3'
COMPLEMENT	5'- GTT GGC AGG ACA CAA AGG GAA C -3'
LENGTH	22
GC CONTENT	54.5 %
MELT TEMP	58.8 °C
MOLECULAR WEIGHT	6628.3 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	189300 L/(mole·cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	5.28
µg/OD <sub>260</sub> :	35.01

### MELTING TEMPERATURE SETTINGS

TARGET TYPE	DNA
OLIGO CONC	0.25 µM
Na <sup>+</sup> CONC	50 mM monovalent salt
Mg <sup>++</sup> CONC	0 mM divalent salt
dNTPs CONC	0 mM nucleotide triphosphate










## General Information

 Image Batch date: 3/1/2019 5:49 PM

GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC

<b>Nucleotide type</b> <input type="text" value="DNA"/>	<b>Na Concentration</b> <input type="text" value="50"/> mM	<b>Mg Concentration</b> <input type="text" value="0"/> mM	<b>Suboptimality</b> <input type="text" value="50"/> %
<b>Sequence type</b> <input type="text" value="Linear"/>	<b>Temperature</b> <input type="text" value="25"/> °C	<b>Max Foldings</b> <input type="text" value="20"/>	<b>Start Position</b> <input type="text" value="0"/>
		<b>Stop Position</b> <input type="text" value="0"/>	

## Structures

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> .mole <sup>-1</sup> )	Output
1		1.26	4.1	-16.7	-60.24	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
2		1.29	-3.9	-12	-44.56	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
3		1.36	-1.6	-13.9	-51.18	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
4		1.49	-1.6	-15.2	-55.98	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
5		1.56	-1.6	-15.9	-58.56	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
6		1.71	-8.9	-13.3	-50.34	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
7		1.91	-28.2	-8.8	-35.92	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
8		2.08	-7.9	-16.8	-63.33	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
9		2.24	-31	-9.7	-40.06	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>

**Dimer Sequence:**

5'- GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC -3'

**Maximum Delta G: -42.72 kcal/mole**

**Delta G: -3.9 kcal/mole Base Pairs: 3**

5' GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC

          |||      :::  
3'      CAACCGTCCTGTGTTCCCTTG

**Delta G: -3.29 kcal/mole Base Pairs: 3**

5' GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC

      |||  :          :  :::  
3' CAACCGTCCTGTGTTCCCTTG

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC

                  ||  
3'                  CAACCGTCCTGTGTTCCCTTG

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC

          ||  :  :  ::  
3'          CAACCGTCCTGTGTTCCCTTG

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC

          ||  ::  
3'          CAACCGTCCTGTGTTCCCTTG

**Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' GTTCCCTTTGTGTCCTGCCAAC

          ||  :          :  ::  
3'          CAACCGTCCTGTGTTCCCTTG

1R.7364-7387-23pb

GATACGACGACACCCTCTGAGAC

<b>Sequence</b> <span>5' MOD ▾ INTERNAL ▾ 3' MOD ▾ MIXED BASES ▾</span>	<b>Parameter sets</b>
<input type="text" value="GAT ACG ACG ACA CCC TCT GAG AC"/>	<input type="text" value="SpecSheet (Default)"/>
Bases 23 <span>CLEAR SEQUENCE</span>	<b>Target type</b> <input type="text" value="DNA"/>
<a href="#">Try the new batch mode here</a>	<b>Oligo Conc</b> <input type="text" value="0.25"/> $\mu\text{M}$
	<b>Na<sup>+</sup> Conc</b> <input type="text" value="50"/> mM
	<b>Mg<sup>2+</sup> Conc</b> <input type="text" value="0"/> mM
	<b>dNTPs Conc</b> <input type="text" value="0"/> mM

## Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- GAT ACG ACG ACA CCC TCT GAG AC -3'
COMPLEMENT	5'- GTC TCA GAG GGT GTC GTC GTA TC -3'
LENGTH	23
GC CONTENT	56.5 %
MELT TEMP	58.4 °C
MOLECULAR WEIGHT	7002.6 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	223500 L/(mole-cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	4.47
$\mu\text{g}/\text{OD}_{260}$ :	31.33

## MELTING TEMPERATURE SETTINGS

TARGET TYPE	DNA
OLIGO CONC	0.25 $\mu\text{M}$
Na <sup>+</sup> CONC	50 mM monovalent salt
Mg <sup>2+</sup> CONC	0 mM divalent salt

Sequence 5' MOD ▾ INTERNAL ▾ 3' MOD ▾ MIXED BASES ▾

GAT ACG ACG ACA CCC TCT GAG AC

Bases 23 CLEAR SEQUENCE

[Try the new batch mode here](#)

Parameter sets SpecSheet (Default) ▾

Target type DNA ▾


Oligo Conc 0.25 μM

Na<sup>+</sup> Conc 50 mM

Mg<sup>++</sup> Conc 0 mM

dNTPs Conc 0 mM

## General Information

 Image Batch date: 3/3/2019 9:11 PM

GATACGACGACACCCTCTGAGAC

Nucleotide type DNA ▾

Na Concentration 50 mM

Mg Concentration 0 mM

Suboptimality 50 %

Sequence type Linear ▾

Temperature 25 °C



Max Foldings 20

Start Position 0

Stop Position 0

UPDATE ADD TO ORDER

## Structures

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> .mole <sup>-1</sup> )	Output
1		-0.24	29.1	-17.4	-57.56	<span>Ct</span> <span>Det</span>
2		0.67	9.8	-12.5	-44.18	<span>Ct</span> <span>Det</span>

**Dimer Sequence:**

5'- GATACGACGACACCCTCTGAGAC -3'

**Maximum Delta G:** -40.66 kcal/mole

**Delta G:** -3.61 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5'           GATACGACGACACCCTCTGAGAC
              ||
3' CAGAGTCTCCACAGCAGCATAG
```

**Delta G:** -3.61 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5'           GATACGACGACACCCTCTGAGAC
              :  ||  ::  :
3' CAGAGTCTCCACAGCAGCATAG
```

**Delta G:** -3.61 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5'           GATACGACGACACCCTCTGAGAC
              :  ||  :
3' CAGAGTCTCCACAGCAGCATAG
```

**Delta G:** -3.17 kcal/mole **Base Pairs:** 3

```
5' GATACGACGACACCCTCTGAGAC
      |||  :::
3'           CAGAGTCTCCACAGCAGCATAG
```

**Delta G:** -3.17 kcal/mole **Base Pairs:** 3

```
5' GATACGACGACACCCTCTGAGAC
      |||  :::
3'           CAGAGTCTCCACAGCAGCATAG
```

**Delta G:** -1.95 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5' GATACGACGACACCCTCTGAGAC
      ||  ::
3'           CAGAGTCTCCACAGCAGCATAG
```

2F.6457-6477-20pb

CATCAATGCCTACACCACGG

<b>Sequence</b> <span>5' MOD ▾ INTERNAL ▾ 3' MOD ▾ MIXED BASES ▾</span>	<b>Parameter sets</b>
<input type="text" value="CAT CAA TGC CTA CAC CAC GG"/>	<input type="text" value="SpecSheet (Default)"/>
Bases 20 <span>CLEAR SEQUENCE</span>	<b>Target type</b> <input type="text" value="DNA"/>
<a href="#">Try the new batch mode here</a>	<b>Oligo Conc</b> <input type="text" value="0.25"/> $\mu\text{M}$
	<b>Na<sup>+</sup> Conc</b> <input type="text" value="50"/> mM
	<b>Mg<sup>++</sup> Conc</b> <input type="text" value="0"/> mM
	<b>dNTPs Conc</b> <input type="text" value="0"/> mM

## Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- CAT CAA TGC CTA CAC CAC GG -3'
COMPLEMENT	5'- CCG TGG TGT AGG CAT TGA TG -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	55%
MELT TEMP	56.1 °C
MOLECULAR WEIGHT	6031 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	188300 L/(mole·cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	5.31
$\mu\text{g}/\text{OD}_{260}$ :	32.03

## MELTING TEMPERATURE SETTINGS

TARGET TYPE	DNA
OLIGO CONC	0.25 $\mu\text{M}$
Na <sup>+</sup> CONC	50 mM monovalent salt
Mg <sup>++</sup> CONC	0 mM divalent salt

## General Information

Image Batch date: 3/3/2019 9:38 PM

CATCAATGCCTACACCACGG

Nucleotide type: DNA

Na Concentration: 50 mM

Mg Concentration: 0 mM

Suboptimality: 50 %

Sequence type: Linear

Temperature: 25 °C

Max Foldings: 20

Start Position: 0

Stop Position: 0

## Structures

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> mole <sup>-1</sup> )	Output
1		0.6	10.7	-12	-42.28	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
2		0.96	8.3	-16.2	-57.56	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
3		0.96	5.4	-13.7	-49.18	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>

**Dimer Sequence:**

5'- CATCAATGCCTACACCACGG -3'

Maximum Delta G: -38.78 kcal/mole

**Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CATCAATGCCTACACCACGG

3' GGCACCACATCCGTA ACTAC

**Delta G: -3.43 kcal/mole Base Pairs: 3**

5' CATCAATGCCTACACCACGG

3' GGCACCACATCCGTA ACTAC

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CATCAATGCCTACACCACGG

3' GGCACCACATCCGTA ACTAC

**Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CATCAATGCCTACACCACGG

3' GGCACCACATCCGTA ACTAC

**Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CATCAATGCCTACACCACGG

3' GGCACCACATCCGTA ACTAC

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CATCAATGCCTACACCACGG

3' GGCACCACATCCGTA ACTAC

2R.7279-7302-23pb

CACCGAATCAACCGTGTCTACTG

Sequence 5' MOD ▾ INTERNAL ▾ 3' MOD ▾ MIXED BASES ▾

CAC CGA ATC AAC CGT GTC TAC TG

Bases 23 CLEAR SEQUENCE

[Try the new batch mode here](#)

Parameter sets SpecSheet (Default) ▾

Target type DNA ▾

Oligo Conc   $\mu\text{M}$

Na<sup>+</sup> Conc  mM

Mg<sup>++</sup> Conc  mM

dNTPs Conc  mM

## Results

RESUSPENSION


DILUTION

SEQUENCE	5'-CAC CGA ATC AAC CGT GTC TAC TG -3'
COMPLEMENT	5'-CAG TAG ACA CGG TTG ATT CGG TG -3'
LENGTH	23
GC CONTENT	52.2%
MELT TEMP	57.6 °C
MOLECULAR WEIGHT	6968.6 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	216000 L/(mole·cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	4.63
$\mu\text{g}/\text{OD}_{260}$ :	32.26

## MELTING TEMPERATURE SETTINGS

TARGET TYPE	DNA
OLIGO CONC	0.25 $\mu\text{M}$
Na <sup>+</sup> CONC	50 mM monovalent salt
Mg <sup>++</sup> CONC	0 mM divalent salt

## General Information

 Image Batch date: 3/3/2019 9:57 PM

CACCGAATCAACCGTGTCTACTG

Nucleotide type:

Na Concentration:  mM

Mg Concentration:  mM

Suboptimality:  %

Sequence type:





Temperature:  °C

Max Foldings:

Start Position:

Stop Position:

## Structures

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> .mole <sup>-1</sup> )	Output
1		0.29	21.4	-23.4	-79.46	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
2		0.48	18.8	-22.7	-77.75	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
3		0.51	17.3	-19.2	-66.11	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
4		0.56	16.8	-19.9	-68.62	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>

**Dimer Sequence:**

5'- CACCGAATCAACCGTGTCTACTG -3'

Maximum Delta G: -42.13 kcal/mole

**Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'           CACCGAATCAACCGTGTCTACTG
              ||
3'  GTCATCTGTGCCAACTAAGCCAC
```

**Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'      CACCGAATCAACCGTGTCTACTG
          ||  :  :  ::
3'  GTCATCTGTGCCAACTAAGCCAC
```

**Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'  CACCGAATCAACCGTGTCTACTG
      :  :  ||  :  :
3'   GTCATCTGTGCCAACTAAGCCAC
```

**Delta G: -3.3 kcal/mole Base Pairs: 3**

```
5'           CACCGAATCAACCGTGTCTACTG
              ||| :  :  ::
3'  GTCATCTGTGCCAACTAAGCCAC
```

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'  CACCGAATCAACCGTGTCTACTG
      :  ||  :  :  :
3'   GTCATCTGTGCCAACTAAGCCAC
```

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'  CACCGAATCAACCGTGTCTACTG
      ||  :  :  :  :
3'   GTCATCTGTGCCAACTAAGCCAC
```

### 3F. 6669-6724-25pb

GGGAGGAGGTATCATTAGAGTAGG

Sequence 5' MOD ▾ INTERNAL ▾ 3' MOD ▾ MIXED BASES ▾

GGG AGG AGG TAT CAT TCA GAG TAG G

Bases 25 CLEAR SEQUENCE

[Try the new batch mode here](#)

Parameter sets  
SpecSheet (Default) ▾

Target type DNA ▾

Oligo Conc 0.25 μM

Na<sup>+</sup> Conc 50 mM

Mg<sup>++</sup> Conc 0 mM

dNTPs Conc 0 mM

## Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- GGG AGG AGG TAT CAT TCA GAG TAG G -3'
COMPLEMENT	5'- CCT ACT CTG AAT GAT ACC TCC TCC C -3'
LENGTH	25
GC CONTENT	52 %
MELT TEMP	57.6 °C
MOLECULAR WEIGHT	7851.1 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	263000 L/(mole-cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	3.8
μg/OD <sub>260</sub> :	29.85

## MELTING TEMPERATURE SETTINGS

TARGET TYPE	DNA
OLIGO CONC	0.25 μM
Na <sup>+</sup> CONC	50 mM monovalent salt
Mg <sup>++</sup> CONC	0 mM divalent salt

## General Information

Image Batch date: 3/3/2019 10:28 PM

GGGAGGAGGTATCATTGAGTAGG

Nucleotide type: DNA

Na Concentration: 50 mM

Mg Concentration: 0 mM

Suboptimality: 50 %

Sequence type: Linear

Temperature: 25 °C






Max Foldings: 20

Start Position: 0

Stop Position: 0

[UPDATE](#) [ADD TO ORDER](#)

## Structures

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> .mole <sup>-1</sup> )	Output
1		0.07	24	-20.7	-69.65	<a href="#">Ct</a> <a href="#">Det</a>
2		0.56	14.7	-15.8	-54.89	<a href="#">Ct</a> <a href="#">Det</a>
3		0.84	13.4	-20.7	-72.23	<a href="#">Ct</a> <a href="#">Det</a>
4		0.92	12.4	-20.9	-73.2	<a href="#">Ct</a> <a href="#">Det</a>
5		1.02	11.1	-20.9	-73.52	<a href="#">Ct</a> <a href="#">Det</a>

**Dimer Sequence:**

5'- GGGAGGAGGTATCATT CAGAGTAGG -3'

**Maximum Delta G: -44.62 kcal/mole**

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'          GGGAGGAGGTATCATT CAGAGTAGG
           ||           ::
3' GGATGAGACTTACTATGGAGGAGGG
```

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'          GGGAGGAGGTATCATT CAGAGTAGG
           :: ||           :: ::
3' GGATGAGACTTACTATGGAGGAGGG
```

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'          GGGAGGAGGTATCATT CAGAGTAGG
           ||           ::
3' GGATGAGACTTACTATGGAGGAGGG
```

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'          GGGAGGAGGTATCATT CAGAGTAGG
           ||           ::
3' GGATGAGACTTACTATGGAGGAGGG
```

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5' GGGAGGAGGTATCATT CAGAGTAGG
           ||           ::
3'          GGATGAGACTTACTATGGAGGAGGG
```

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5' GGGAGGAGGTATCATT CAGAGTAGG
           : || :: :
3'          GGATGAGACTTACTATGGAGGAGGG
```

3R.7185-7205-20pb

CTGACTACGAACCACCTGTG

Sequence 5' MOD ▾ INTERNAL ▾ 3' MOD ▾ MIXED BASES ▾

CTG ACT ACG AAC CAC CTG TG

Bases 20 CLEAR SEQUENCE

[Try the new batch mode here](#)

Parameter sets SpecSheet (Default) ▾

Target type DNA ▾

Oligo Conc   $\mu\text{M}$

Na<sup>+</sup> Conc  mM

Mg<sup>++</sup> Conc  mM

dNTPs Conc  mM

## Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- CTG ACT ACG AAC CAC CTG TG -3'
COMPLEMENT	5'- CAC AGG TGG TTC GTA GTC AG -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	55 %
MELT TEMP	55.1 °C
MOLECULAR WEIGHT	6062 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	186300 L/(mole-cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	5.37
$\mu\text{g}/\text{OD}_{260}$ :	32.54

## MELTING TEMPERATURE SETTINGS

TARGET TYPE	DNA
OLIGO CONC	0.25 $\mu\text{M}$
Na <sup>+</sup> CONC	50 mM monovalent salt
Mg <sup>++</sup> CONC	0 mM divalent salt

## General Information

Image Batch date: 3/4/2019 3:14 AM

CTGACTACGAACCACCTGTG

Nucleotide type: DNA

Na Concentration: 50 mM

Mg Concentration: 0 mM

Suboptimality: 50 %

Sequence type: Linear

Temperature: 25 °C

Max Foldings: 20

Start Position: 0

Stop Position: 0

[UPDATE](#) [ADD TO ORDER](#)

## Structures

structure	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> .mole <sup>-1</sup> )	Output
1	<input type="checkbox"/>	0.27	20.8	-18.9	-64.3	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2	<input type="checkbox"/>	0.46	11.8	-10	-35.09	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3	<input type="checkbox"/>	0.65	14.4	-17.6	-61.21	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
4	<input type="checkbox"/>	1.16	2.6	-14.2	-51.5	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
5	<input type="checkbox"/>	1.25	6.4	-18.8	-67.24	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

**Dimer Sequence:**

5'- CTGACTACGAACCACCTGTG -3'

**Maximum Delta G: -35.13 kcal/mole**

**Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CTGACTACGAACCACCTGTG

: || :

3' GTGTCCACCAAGCATCAGTC

**Delta G: -3.3 kcal/mole Base Pairs: 3**

5' CTGACTACGAACCACCTGTG

||| :::

3' GTGTCCACCAAGCATCAGTC

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CTGACTACGAACCACCTGTG

|| : : ::

3' GTGTCCACCAAGCATCAGTC

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CTGACTACGAACCACCTGTG

|| ::

3' GTGTCCACCAAGCATCAGTC

**Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CTGACTACGAACCACCTGTG

|| ::

3' GTGTCCACCAAGCATCAGTC

**Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' CTGACTACGAACCACCTGTG

|| ::

