



Universidad de Valencia
Facultad de Ciencias Biológicas

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética (2009-2010)
Especialidad Microbiología

*“Variabilidad clonal de la polimerasa NS5b del virus de la hepatitis C
en aislados de muestras clínica”*

Autor

Karina Alejandra Salvatierra

Director

Dr. F. Xavier López-Labrador

Lugar de realización

Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP)

ÍNDICE

Introducción	
Virus de hepatitis C.....	2
Características estructurales.....	2
Infección por HCV.....	4
Genotipos de HCV.....	4
Tratamiento.....	5
Objetivo General.....	7
Materiales y Métodos	
Muestras clínicas.....	8
Síntesis de cDNA.....	8
Amplificación del gen de la polimerasa NS5B.....	8
Electroforesis en gel de agarosa.....	10
Purificación de productos de PCR.....	10
Clonación.....	10
PCR de colonia.....	11
Secuenciación de productos de PCR.....	11
Análisis de secuencias de nucleótidos.....	12
Resultados.....	12
Discusión.....	16
Conclusiones.....	18
Bibliografía.....	19
Anexos.....	22

Resumen

La infección crónica provocada por el virus de la hepatitis C (VHC) sigue siendo un gran problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que 200 millones de personas (3% de la población mundial) se encuentran infectadas por este virus. El tratamiento actual basado en la combinación de dos fármacos no específicos, el interferón- α pegilado y la ribavirina; provoca numerosos efectos secundarios, el tratamiento es de larga duración y además es costoso y tiene poco éxito en pacientes infectados con genotipo 1. Esto ha impulsado al desarrollo de nuevos fármacos más específicos. Los más prometedores son los dirigidos contra proteínas específicas del virus, como la proteasa NS3 o la RNA polimerasa NS5B. Sin embargo, aunque estos nuevos fármacos han demostrado un potente efecto antiviral *in vitro* e *in vivo*, se han descrito numerosas mutaciones del virus asociadas con el desarrollo de resistencias. En este trabajo nos centraremos en estudiar la variabilidad clonal del VHC (mutaciones dentro de la población de genomas del virus en un individuo infectado) en el gen NS5B, diana de los inhibidores de la polimerasa en desarrollo, y compararla con la existente en distintos aislados naturales del VHC de distintos individuos. Para ello secuenciamos el gen NS5B del VHC en aislados naturales de 28 pacientes con infección crónica y en 20 derivados de clones de un mismo individuo, para investigar la presencia de sustituciones asociadas con resistencia a estos nuevos antivirales. Los resultados obtenidos demuestran la preexistencia de aislados del VHC resistentes en pacientes nunca tratados, sobre todo a un grupo de inhibidores llamados inhibidores no nucleosídicos. Además, el análisis clonal revela la existencia de variaciones minoritarias de aminoácidos, que confieren resistencia a inhibidores específicos para la RNA polimerasa RNA dependiente NS5B, en la población de la “cuasiespecie” circulante en un individuo, no habiéndose detectado dichas mutaciones mediante secuenciación directa. La influencia de estas variaciones deberá ser evaluada antes del comienzo del tratamiento para prevenir el fracaso terapéutico de los futuros fármacos y se deberán valorar también las variantes adicionales que circulan en un mismo individuo en baja frecuencia.

INTRODUCCION

Virus de hepatitis C

El VHC fue caracterizado molecularmente en 1989¹, después de múltiples investigaciones para la detección del genoma del virus de las hepatitis no-A, no-B (NANB), reconociéndose como la causa mayor de este tipo de hepatitis y una causa importante de las hepatitis crónicas. Pertenece al género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Comparte esta familia con miembros del género *Flavivirus* (Ej. Virus del dengue, virus de la fiebre amarilla y virus del Nilo occidental) y con miembros del género *Pestivirus* (Ej. Virus de la diarrea bovina, virus del cólera porcino). La familia *Flaviviridae* presenta características genómicas comunes que incluyen: a) la expresión de los genes virales a partir de un único gran marco de lectura abierto, y b) el procesamiento co- y post- traduccional de la poliproteína mediante una combinación de proteasas celulares y virales para generar productos génicos estructurales y no estructurales .

Características estructurales

La partícula viral de VHC está formada por una envoltura lipoproteica que rodea el *core* central, asociado al cual se encuentra su genoma. Este consiste en una única cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva con un único marco de lectura abierto de ≈ 9.000 bases, flanqueado por una región no codificante en cada extremo: hacia el 5', la región 5'NC (5' no codificante o 5'UTR) (≈ 341 bases) y hacia el 3', la región 3'NC (3' no codificante o 3'UTR) (≈ 200 bases).

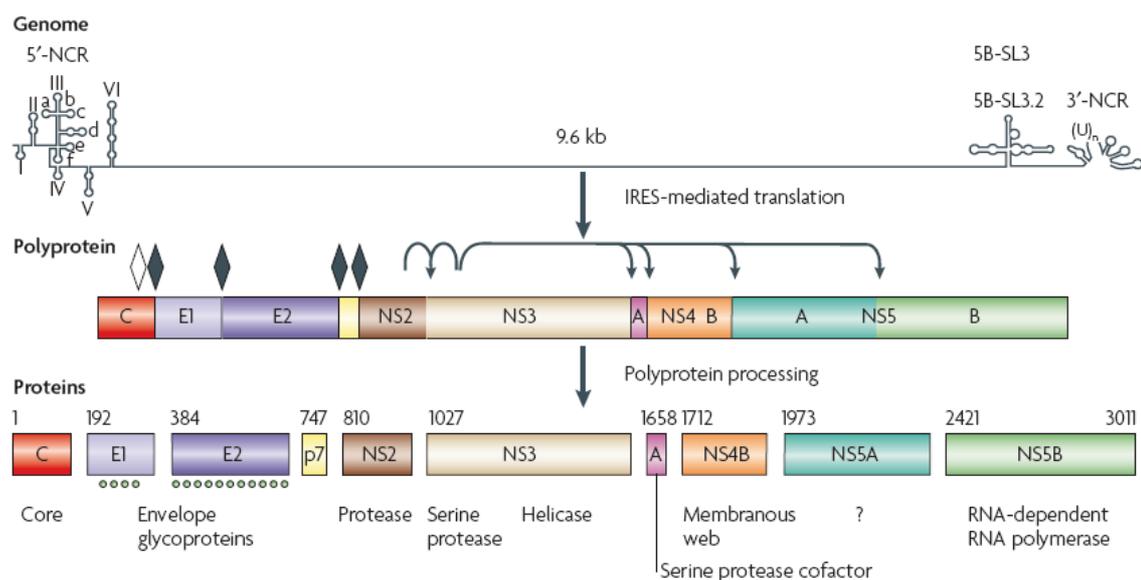


Figura 1. Organización genómica del virus de la hepatitis C².

La región 5'-NC es conservada, con analogías superiores al 98% entre las diferentes cepas aisladas y secuenciadas hasta el momento. Su principal función es permitir la unión del ribosoma de la célula del huésped al RNA viral, se yuxtapone casi totalmente con el sitio interno de entrada al ribosoma, en la estructura conocida como IRES (*internal ribosome entry site*), el cual se extiende hasta los primeros 30-40 nucleótidos del gen *core* y regula la traducción de la poliproteína viral. La región 3'NCR comprende la secuencia variable de 40 bases que precede a un región rica en poli-U de longitud variable, seguida por una secuencia muy conservada de 100 bases. Regula la traducción de la poliproteína por el ribosoma 80 S. El marco abierto de lectura codifica una única poliproteína precursora de ~ 3.011 aminoácidos, la cual es traducida por ribosomas unidos al RE de forma IRES-dependiente y es cortada co- y post- traduccionalmente por peptidasas celulares y proteasas virales en al menos 10 proteínas virales maduras³.

A pesar de la carencia de un sistema de cultivo celular adecuado para la infección y replicación del VHC, las proteínas virales fueron identificadas y caracterizadas mediante los sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, la transfección de clones recombinantes y la comparación con proteínas homólogas, previamente identificadas en otros miembros de la familia *Flaviviridae*.

Las proteínas virales desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal son las siguientes:

- proteínas estructurales: *core* (cápside icosaédrica), E1, E2 (glicoproteínas de la envoltura) y P7 (posible canal iónico dependiente de calcio)
- proteínas no estructurales (NS): NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Además, la proteína F, de función desconocida, es sintetizada por un cambio de marco de lectura que se superpone al gen *core* durante la traducción⁴.

La proteína integral de membrana NS2, junto con NS3, constituyen la serin-proteasa NS2-3 que cataliza el corte entre NS2 y NS3. NS3 posee actividad de ARN helicasa utilizada durante la replicación y, junto a su cofactor NS4A, participa en el procesamiento de la poliproteína actuando como serin-proteasa para el corte de las proteínas no estructurales remanentes. NS4B es una proteína integral de membrana, que funciona como un andamio sobre el cual se ensamblan los componentes restantes del complejo asociado a la replicación. NS5B es la ARN polimerasa dependiente de ARN. NS5A es un cofactor de NS5B requerido para la replicación viral y parece estar involucrado en la resistencia al interferón. Una vez cortadas las proteínas NS, éstas se ensamblan dentro del complejo replicasa del VHC asociado a la membrana del RE. El VHC se replica a través de un intermediario de polaridad negativa. NS5B inicia la transcripción de ambas cadenas (positiva y negativa) del genoma.

Las nuevas copias de ARN viral interactúan con la proteína *core* para formar la nucleocápside, que es finalmente rodeada por la envoltura viral que se forma por extrusión del RE. Los viriones maduros egresan de la célula hospedadora a través de la vía secretoria celular⁵.

Infeción por VHC

La transmisión de VHC es fundamentalmente parenteral y particularmente en niños la vía vertical (madre-hijo) contribuye ampliamente. El VHC tiene capacidad para realizar infecciones persistentes aún en presencia de una respuesta inmune humoral y celular específica del huésped, debido tanto a la alta tasa de mutaciones (quasiespecies) que facilita mecanismos de escape como a la elevada producción de viriones, la cual se produce a un ritmo de 10^{12} viriones/día, con una vida media del virión de 2,7 h.

La infección por VHC causa hepatitis aguda, generalmente asintomática dentro de los primeros tres a seis meses de iniciada la infección. El período de incubación puede variar entre 14 a 180 días (promedio 6-7 semanas)⁶. Entre el 10-15% de los pacientes infectados resuelven favorablemente la infección, pero la mayoría de los individuos VHC positivos (> 80%) desarrollan una infección persistente a pesar de la presencia de anticuerpos séricos contra el mismo y de una respuesta citotóxica antiviral multi-específica. Estos últimos individuos evolucionan hacia la cronicidad, de ellos un 10% desarrolla insuficiencia hepática, 20% muestra signos de cirrosis en un período de 15 años desde su infección, el 13-15% desarrolla una descompensación hepática y entre el 2-7% sufre un hepatocarcinoma celular. La mortalidad global oscila del 4-9% y el estadio terminal de la infección crónica por VHC es una de las principales indicaciones de trasplante hepático^{5,7,8}.

Genotipos y estructura genética del VHC.

La alta variabilidad genómica de los aislamientos de VHC ha permitido su clasificación en 6 genotipos diferentes (designados del 1 al 6) con una identidad de secuencias del orden de 69%; a su vez, cada genotipo incluye varios subtipos con una identidad cercana al 79%⁹. Se ha relacionado a los diferentes genotipos con una distribución geográfica particular (1a, 1b, 2a y 2c distribuidos en todo el mundo y 5a, 6a y 4 sólo en ciertas regiones específicas), con la vía de transmisión de la infección (por ej. 3a y 1a predomina en drogadictos endovenosos) y la respuesta al tratamiento¹⁰.

Por otra parte, la alta tasa de error de la RNA polimerasa causa la generación de mutantes durante la replicación del virus, aproximadamente 10^{-3} a 10^{-5} mutaciones por nucleótidos por replicación genómica (correspondiente a una tasa natural evolutiva de 10^{-4} base de sustituciones/sitio/año, siendo la mayoría de las mutaciones deletéreas)^{11,12}, por lo

que el virus circula dentro de cada individuo infectado con una mezcla de genomas estrechamente relacionados pero ligeramente diferentes denominados “cuasiespecies”. Por tanto, un amplio espectro de variantes genéticas, incluyendo algunas potencialmente resistentes a drogas, podría estar siempre presentes cuando se inicia una terapia antiviral. Normalmente, una cepa dominante es detectable en las cuasiespecies virales, junto con las variantes que están presentes a frecuencias más bajas. La frecuencia de las distintas variantes depende de eficacia replicativa y a factores del huésped ¹³.

Por lo general, muchas mutaciones tienen un coste para la eficacia replicativa (*fitness*), y muchas variantes están presentes en baja frecuencia, en comparación con la dominante, pero pueden ser rápidamente seleccionadas durante un cambio ambiental, como la terapia con drogas antivirales. Cuestiones clave relevantes para el desarrollo de la resistencia incluyen: a) el número de de las mutaciones necesarias para introducir el cambio de aminoácido, b) la *fitness* del virus variante, c) la frecuencia de la variante dentro de la cuasiespecie, d) el nivel de resistencia que confiere y e) la potencia y biodisponibilidad del agente antiviral ¹⁴.

Tratamiento

Actualmente no existe una vacuna profiláctica contra el VHC, y el tratamiento es costoso y frecuentemente asociado con morbilidad significativa, se limita en la combinación de dos fármacos no específicos inmunomoduladores, el peg-IFN- α (interferón α al que se le ha incorporado una molécula de polietilen-glicol para mejorar su farmacocinética) y la ribavirina análogo de la purina. El interferón- α es miembro de la familia de las citocinas (moléculas producidas por el sistema inmunitario en respuesta a diversos agentes externos como virus o células cancerígenas), aumenta efectivamente su concentración en el paciente intensificando la respuesta inmune. Por el contrario el mecanismo de acción de la ribavirina todavía no está totalmente caracterizado, pero se ha propuesto que actuaría en la inhibición directa de la polimerasa viral, en la inmunomodulación de la respuesta inmune celular tipo Th1, o en el incremento de la carga mutacional deletérea en los genomas virales nacientes ¹⁵. Sin embargo, la ribavirina y el interferón- α no erradican el VHC en un 50-60% de los pacientes infectados con los genotipos 1 y 4, ni en un 20% de los infectados con los genotipos 2 y 3 ¹⁶. Además, la larga duración del tratamiento (48 semanas para el genotipo 1) hace que sea difícil para los pacientes tolerar los efectos secundarios asociados ¹⁷. Estas limitaciones llevaron al interés en el desarrollo de nuevos fármacos más efectivos y con menos efectos secundarios, siendo los más prometedores, los dirigidos específicamente contra proteínas del virus (llamados STAT-C “Specifically Targeted Antiviral Therapy for HVC”). Cada paso del ciclo vital del virus constituye una diana potencial para moléculas inhibitoras, y las más

estudiadas entre las diferentes enzimas virales son la proteasa NS3/4A y la RNA polimerasa RNA dependiente NS5B. La proteasa NS3/4A es necesaria para el corte de la poliproteína, requerido para la formación del complejo replicasa, por lo que los inhibidores de la proteasa previenen este procesamiento y bloquean la formación del complejo replicasa. Por otra parte, la polimerasa NS5B es necesaria para la replicación del virus, ya que ensambla el complejo replicasa en la célula huésped y amplifica el material genético del virus; por esto su inhibición detiene la replicación viral ¹⁸. Los nuevos agentes inhibidores de estas dos enzimas del virus han demostrado una gran eficacia antiviral *in vitro* e *in vivo*.

En función de la estructura química y mecanismo de acción, los inhibidores específicos de NS5B se pueden dividir en dos grandes categorías: análogos de nucleósidos (NI) e inhibidores no nucleosídicos (NNI). Los análogos de nucleósidos (NI) se administran en forma de prodroga no fosforilada para facilitar su acceso a la célula, donde son convertidos en la forma trifosfato activa (NTP) por las quinasas de las células infectadas. Los NI son análogos ribonucleósidos que actúan como terminadores de cadena, compitiendo con los nucleótidos trifosfato por la incorporación a la cadena naciente de RNA. Esta función de terminación de cadena la consiguen debido a modificaciones relativamente pequeñas en las posiciones 2' y 4' de la ribosa. La ventaja de estas moléculas es que no se espera que sean reconocidas por DNA polimerasas endógenas, evitando de esta forma efectos secundarios citotóxicos y genotóxicos ¹⁹. Los inhibidores no nucleosídicos (NNI) por el contrario, no compiten con los NTPs sino que actúan bloqueando la enzima en la iniciación, a través de la inhibición de un cambio conformacional necesario para proseguir con la elongación del RNA naciente ¹⁹, es decir se unen a sitios menos conservados fuera del centro activo (sitios alostéricos), inhibiendo la eficacia catalítica del centro activo ¹⁸.

El uso de los STAT-C implica la posibilidad de selección de variantes resistentes. La resistencia a antivirales es el resultado de mutaciones en aminoácidos que producen cambios conformacionales que interfieren con la interacción fármaco-diana. Normalmente, estas mutaciones suponen un coste biológico y los virus portadores de estas mutaciones se encuentran en menor número que los que poseen el “genotipo salvaje”; sin embargo, pueden ser seleccionados positivamente durante la terapia ¹⁴. Es decir, teóricamente, en todos los pacientes infectados el VHC dispone de una población heterogénea de genomas que puede incluir variantes resistentes a inhibidores, antes del inicio de cualquier tratamiento. El potencial de emergencia de resistencias está afectado por múltiples factores que incluyen si el inhibidor es alostérico o análogo de nucleósido, el número de cambios requeridos para que se genere una variante resistente, el grado de resistencia conferido por un cambio de aminoácido

y la abundancia de la variante dentro de las “cuasi-especies”¹⁸. Hasta ahora, se han identificado cambios simples de aminoácidos en la proteasa NS3 y en la polimerasa NS5B, asociados con reducida sensibilidad a fármacos *in vitro*, aunque afortunadamente, no se han identificado mutaciones simples que confieran resistencia a inhibidores de proteasa y polimerasa a la vez¹⁴. Además de mutaciones simples que confieran alto nivel de resistencia, la acumulación gradual y sinérgica de mutaciones con menor efecto de resistencia puede llevar también al fallo de futuros tratamientos. Parece también bastante claro que la determinación de mutaciones de resistencia antes del tratamiento será útil para garantizar el éxito de un fármaco específico ya que pueden circular en la población infectada aislados del VHC resistentes naturales²⁰. Asimismo, dentro de cada individuo infectado la población de “cuasiespecies” virales puede conter algún genoma con mutaciones de resistencia en proporciones inferiores a las detectables mediante secuenciación directa estándar. Sin embargo, mediante el análisis clonal se puede aumentar la sensibilidad de la detección de variantes poblacionales virales minoritarias en un mismo individuo²¹, evaluando si se convierten en el genoma dominante durante el tratamiento^{14, 22}.

Por lo tanto, la caracterización de variantes resistentes es óptima cuando se aborda mediante el análisis de la secuencia de varios clones del genoma del virus aislado de cada paciente, obteniendo una alta sensibilidad. Mediante la secuenciación directa, sólo pueden ser detectadas variantes con una frecuencia de aproximadamente un 20%, mientras que mediante clonación y secuenciación de, por ejemplo, 10 clones, se detectan variantes virales presentes en aproximadamente un 5% de la población viral. Además, el enfoque clonal también permite el análisis de mutaciones ligadas en un aislado dado.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo es analizar la variabilidad clonal del VHC (mutaciones minoritarias dentro del individuo infectado) en el gen NS5B, diana de los inhibidores de la polimerasa en desarrollo, y compararla con la existente en distintos aislados naturales del VHC obtenidos de muestras clínicas de pacientes con infección crónica, partiendo de la hipótesis de que ya se encuentran en circulación virus resistentes a estos nuevos fármacos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras clínicas.

Para este trabajo se seleccionaron muestras de suero de pacientes infectados por el subtipo 1b, remitidas desde dos hospitales distintos de Valencia y Barcelona. El subtipo del virus fue determinado con anterioridad mediante la secuenciación de un fragmento de la región NS5b y análisis filogenético.

Síntesis de cDNA.

El RNA total fue extraído de 140 µl de suero utilizando el QIAamp viral RNA kit de Qiagen (Hilden, Alemania), y eluyendo en 50 µl finales. Para obtener DNA complementario al RNA viral (cDNA), se realizó una retrotranscripción (RT) de 5 µl del RNA extraído, usando la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, EEUU), y hexámeros como cebadores, en un volumen final de 25 µl de tampón de reacción RT (ANEXO 1). Las condiciones de temperatura para la síntesis de cDNA fueron las siguientes:

- desnaturalización inicial 65°C, 5 min.
- pasar a hielo 10 min.
- hibridación de cebadores 25°C, 10 min.; 35°C 10 min.
- retrotranscripción: 42°C 60 min.

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

Amplificación del gen de la polimerasa NS5B del VHC.

La región NS5B del virus se amplificó a partir del cDNA, utilizando amplificación anidada, debido a la relativamente baja concentración de virus circulante en suero y al tamaño de la región estudiada (figura 2). Para la primera amplificación se utilizaron 5 µl de cDNA, 25 pmol del cebador directo 1b-7481-F1 y del inverso 1b-9396-R1 (tabla 1), y 2 U de polimerasa termoestable de alta fidelidad de copia (Phusion™ Hot Start HS, Finnzymes, Espoo, Finlandia), en un volumen final de 50 µl de tampón de reacción de PCR. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

- desnaturalización del cDNA 2 minutos a 98°C
- 35 ciclos de 1 min. a 95°C, 30 seg. a 50°C y 4 min. a 72°C seguidos por un paso de elongación final de 10 min. a 72°C.

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

- (a) una segunda amplificación anidada del total del gen NS5b del VHC (cebadores 1b-7527-F1 e inverso 11-9371 a1)
- dos amplificaciones semi-anidadas por separado, (b) de la porción 5' (cebadores 1b-7527-F1 y ns5ba2a), o (c) de la porción 3' (ns5ba1g y 11-9371 a1).
- (d) una amplificación de un fragmento corto interno de NS5b como control positivo de amplificación (cebadores ns5ba1g y ns5ba2a).

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

- desnaturalización de 2 minutos a 98°C
- 35 ciclos de 1 min. a 95°C, 30 seg. a 55°C y 4 min. a 72°C seguidos por un paso de elongación final de 10 min. a 72°C.

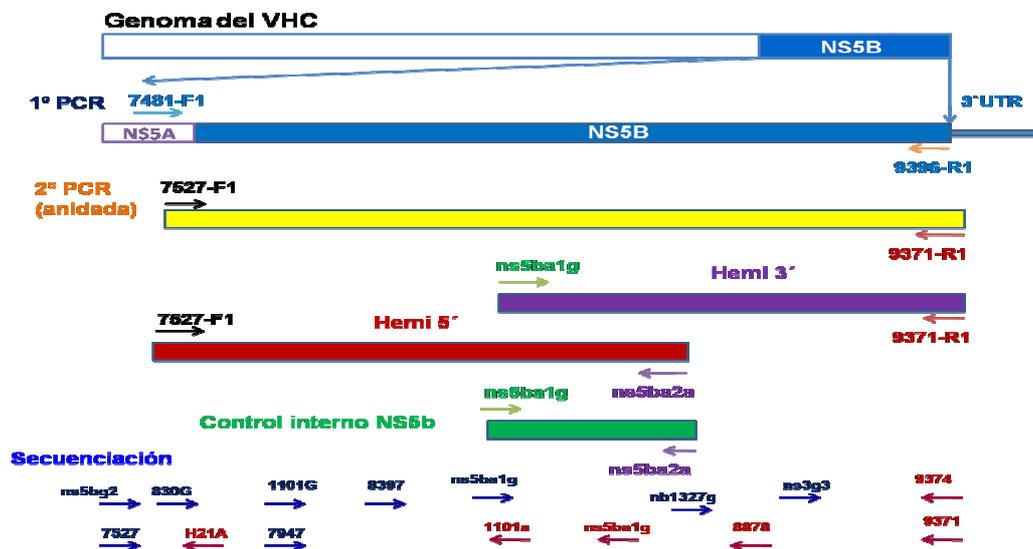


Figura 2. Estrategia seguida para la amplificación del gen de la polimerasa NS5B del VHC. En la figura se representan esquemáticamente las PCR realizadas así como los cebadores empleados en cada una de ellas. La segunda PCR (anidada) son en realidad cuatro amplificaciones secundarias en paralelo. También se muestran los cebadores utilizados para la secuenciación del gen.

La PCR secundaria (a) (segunda amplificación anidada del total del gen NS5b del VHC) da como resultado un fragmento de aproximadamente 2Kb, es decir, abarca todo el gen NS5b; con la semi-anidada de 5' (b) o de 3' (c) se obtienen dos fragmentos de ~ 1,2Kb correspondientes a la región 5' ó 3' del gen NS5b, respectivamente. Con la amplificación del control interno (d) se obtiene un fragmento corto de 300 pb. Tanto en la extracción de RNA,

la síntesis de cDNA, amplificaciones primarias como en las secundarias, se incluyeron controles negativos durante todo el proceso (de suero o de agua).

Electroforesis en gel de agarosa.

Tras cada PCR, para comprobar la amplificación correcta de los fragmentos de interés y para descartar la presencia de contaminantes, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Para ello se cargaron en el gel para cada muestra 5µl de producto de PCR más 2µl de tampón de carga y se utilizaron 2µl de un marcador molecular (DNA Ladder Mix, Fermentas, Vilnius, Lituania) dejándose correr durante 45min a 120V.

Purificación de productos de PCR.

Los productos de las amplificaciones anteriores fueron purificados mediante filtración en membrana con el kit PCR clean-up NucleoFast 96PCR (Marcherey-Nagel, Alemania). Durante el proceso, las muestras provenientes de PCR son aplicadas a una membrana de ultrafiltración y mediante vacío los contaminantes (cebadores, dNTPS, sales) son filtrados y desechados. Los productos de PCR son retenidos por la membrana y recuperados tras la adición de agua o tampón con bajo contenido en sales después de una corta incubación a temperatura ambiente.

Clonación.

El producto de PCR purificado de la región NS5b del paciente 482_194_010817 se utilizó para generar clones mediante ligación con *pBluescript SK(-)*, linearizado en el sitio de clonaje múltiple mediante digestión con EcoRV, seguido de transformación por electroporación²³ de *E.coli* competentes comerciales (ElectroMax DH10B cells, Invitrogen). Las células transformadas se pasaron inmediatamente a 1 ml de medio SOC y tras 1 hr. de incubación a 37°C en agitación (expresión fenotípica), se sembraron en placas de medio LB+ampicilina+X-gal+IPTG (ANEXO 1).

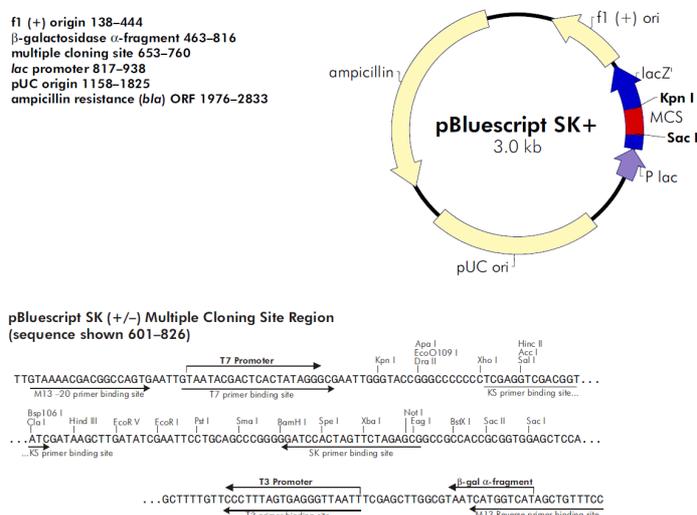


Figura 3. Esquema del vector plasmídico pBluescript II sk (-). En la figura aparecen indicados su origen de replicación (pUC ori), el gen que confiere a la bacteria resistencia a la ampicilina (ampicilina), el origen de replicación del bacteriófago filamentoso fl (fl (-) ori), el promotor del gen lac (P lac), el gen lacZ que codifica para la b-Galactosidasa (lacZ) y el sitio de clonaje múltiple (MCS).

PCR de colonia.

Se determinó la presencia del inserto en las bacterias que han incorporado y mantenido de forma estable el plásmido recombinante (colonias de color blanco en placas LB-Xgal-IPTG) mediante PCR en la que se amplificó el inserto con los cebadores del plásmido SK y KS, que flanquean el MCS (ANEXO 1). Seguidamente se comprobó que el tamaño del producto de amplificación obtenido correspondía al de NS5B (~2Kb), mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con un marcador de peso molecular de DNA. Luego se purificaron los productos de PCR que dieron la banda deseada de ~2Kb mediante el método explicado anteriormente.

Secuenciación de productos de PCR.

Los productos de PCR purificados se secuenciaron utilizando secuenciación cíclica Sanger con terminadores fluorescentes y comercial Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) y cebadores específicos, incluyendo los mismos empleados para las amplificaciones secundarias, y los cebadores SK y KS del plásmido en el caso de la secuenciación de clones. Las condiciones de secuenciación fueron: desnaturalización de 1 minutos a 95°C y 90 ciclos de 30seg. a 95°C, 5 seg. a 50°C y 4 min. a 60°C (ANEXO 1) utilizando de 2 a 5µl de ADN y 5 picomoles de cebador. Las reacciones de secuenciación se enviaron al servicio de secuenciación de ADN de la Univesitat de València (<http://scsie.uv.es/scsie-serv/sadn/index.htm>), para procesarlas en un secuenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de electroforesis capilar (4 capilares). La secuenciación automática se basa en la utilización de una mezcla de nucleótidos y dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia que se añaden a la síntesis enzimática de nuevo DNA a partir del DNA molde. Cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos está marcado con un fluorocromo diferente, de modo que cada vez que se incorpore un dideoxinucleótido a la cadena naciente se bloqueará la elongación, obteniéndose una población de fragmentos de DNA truncados de diferente longitud. Los productos de reacción se someten entonces a electroforesis capilar durante la cual se excitan los fluorocromos, se capta la luz emitida por cada uno de ellos y se traduce esa luz a señal electrónica, obteniéndose finalmente un gráfico (cromatograma) en el que cada uno de los cuatro nucleótidos está representado por picos de color diferente. Los diferentes cromatogramas obtenidos por el secuenciador automático son remitidos entonces a los investigadores para su análisis.

Análisis de secuencias de nucleótidos.

Las secuencias obtenidas (cromatogramas) fueron revisadas y ensambladas utilizando el paquete *Staden*, dedicado al trabajo con cromatogramas de secuencias de ADN que consta de varios módulos. Los cromatogramas proporcionados por el servicio de secuenciación son pasados primero por el módulo Pregap, el cual realiza una corrección automática de calidad. Las lecturas que superan este módulo son analizadas entonces con el módulo de ensamblaje (Gap4), con el que se construye una base de datos Gap4 para cada muestra. Mediante este módulo las lecturas se revisan, editan y ensamblan hasta conseguir un solo *contig* para finalmente obtener la secuencia consenso del ensamblaje (totalidad del gen ns5b del VHC) para cada una de las muestras de los diferentes pacientes. Las secuencias consenso de nucleótidos en formato *fasta* fueron alineadas usando el programa BioEdit. Este programa contiene un editor de alineamientos y módulos de análisis de secuencias con el que se tradujeron las secuencias de nucleótidos a aminoácidos y se alinearon éstas últimas en busca de polimorfismos relacionados con mutaciones de resistencia conocidas para NS5B. Como secuencia de referencia se utilizó la del aislado Con1 del VHC genotipo 1b, extraída de la base de datos GenBank (código AJ238799.1) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

RESULTADOS

Gracias a la estrategia de amplificación utilizada en este trabajo, obtuvimos la secuencia completa bidireccional de la región NS5B en 28 muestras y en 20 clones derivados de un paciente seleccionado, por separado. Se determinó el número y la frecuencia de variaciones/diferencias nucleotídicas y aminoacídicas en pacientes y en 20 clones de un paciente, con respecto al aislado Con1 del VHC genotipo 1b (Tabla 1).

Respecto a la secuencia de referencia Con-1, se encontró un número y porcentaje de diferencias ligeramente mayor a nivel de aminoácidos en clones de un mismo paciente que en aislados de distintos pacientes ($p = 0,000$; U-Mann-Whitney), pero no a nivel de nucleótidos ($p = 0,515$; U-Mann-Whitney), por lo que podríamos decir que existe una variación clonal significativa, similar a la que se observa en los aislados de distintos pacientes infectados a nivel de nucleótidos, pero aún mayor a nivel de aminoácidos.

De las posiciones asociadas con resistencia a antivirales, sólo S96, N142 y S282 están relacionadas con variaciones que confieren resistencia a análogos de nucleósidos (NI). Las mutaciones S96T, o N142T, disminuyen la eficacia del análogo de nucleósido R1479²⁴ y S282T, provoca menor sensibilidad al fármaco PSI-6130²⁵. Estas variaciones no fueron encontradas en esta población de pacientes; sin embargo, se encontró un polimorfismo natural N142S en una de las secuencias analizadas.

Las sustituciones asociadas con resistencia a inhibidores no nucleosídicos (NNI) incluyen L419M/I, M423T y I482L²⁶ o M426T, I482T y V494A²⁷, P495S/L/A/T, P496S/A y V499A²⁸, I424V, V494I/A y P495A²⁹ o L419M/N, M423T/I/V, I482L/V/T¹³ y L419S/M, M423/A/I/T/V²¹. De todas ellas, en la población estudiada en este trabajo se ha encontrado sólo la variación I424V en 2 de las secuencias analizadas, asociada a una disminución de la sensibilidad a BILB1941 (derivado del benzimidazol).

En el 100% de las secuencias analizadas fue encontrado el cambio de A338V, que afecta a la sensibilidad a inhibidores alostéricos de unión a la polimerasa, provocando un aumento de hasta 17 veces la resistencia a tiopenos y dihidropironas al combinarse con las sustituciones T19P, M71V, M423V y A442T³⁰. De estas últimas, el polimorfismo T19S se encontró en 26 de las 28 secuencias analizadas y la mutación A442T en una.

En cuanto a las sustituciones que provocan resistencia a la derivados de la benzotiazidina como el A-837093 (G554D, S368A, Y448H/C, Y555C, D559G o C451R/N/H/I/S/T/Y/V^{13, 14, 18, 22}, o el A-782759 (H95Q/R/L, N411S, M414L/T/Q/I, S556G o Y448H²², hemos encontrado C451H, C451Y, y S556G en 3, 2 y 4 de las 28 secuencias, respectivamente.

De las variantes que reducen la afinidad de NS5B por derivados del benzofurano que se unen un sitio alostérico como el VHC-796 (C316Y/N/F, S365T/S/A/L, R531K, K523Q o A300P^{22, 31}, se encontraron la variaciones R531K C316N K523R en 8, 13 y 3 de las 28 muestras estudiadas, respectivamente. Además, los polimorfismos A300S y A300T estaban presentes en 15 y 9 secuencias, respectivamente.

Finalmente, de las variaciones asociadas con resistencia a análogos de ciclosporina, (I432V, P538T o S556G^{29, 32, 33}, se encontró S556G en 4 de las secuencias. Esta variación provocaría una conformación distinta de la polimerasa provocando la resistencia a análogos de ciclosporina³⁴.

Con respecto a la variación dentro de un mismo paciente, en la **figura 2** se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuenciación de 20 clones

DISCUSIÓN

El tratamiento empleado en la actualidad para el virus de la hepatitis C está basado en la combinación de dos fármacos no específicos el interferón- α pegilado y ribavirina, es un tratamiento de larga duración, está asociado a numerosos efectos secundarios y es efectivo solamente en aproximadamente el 50% de los pacientes. Por eso, se encuentran en desarrollo nuevos fármacos más específicos, dirigidos específicamente a la inhibición del enzima RNA polimerasa RNA dependiente NS5B, esencial para la replicación del virus. En función de la estructura química y mecanismo de acción, los inhibidores específicos de NS5B se pueden dividir en dos grandes categorías: análogos de nucleósidos o los inhibidores no nucleosídicos. El uso de estos fármacos dirigidos específicamente contra enzimas del VHC implican la posibilidad de selección variantes resistentes preexistentes mediante presión selectiva. La existencia de virus resistentes circulando en la población infectada provocaría el fallo del tratamiento³⁵. De ahí la importancia de identificar y estudiar la existencia de este tipo de sustituciones en la población infectada.

En este trabajo se analizó la variabilidad del VHC en el gen NS5B en 28 pacientes con infección crónica por genotipo 1b, el de mayor prevalencia en todo el mundo, y se evaluó la presencia de mutaciones minoritarias a nivel clonal dentro de un individuo, partiendo de la hipótesis que las mutaciones relacionadas con resistencias a estos nuevos fármacos ya se encuentran circulando en los virus que infectan a la población antes del comienzo del tratamiento. La mayoría de los estudios publicados han evaluado la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia a fármacos inhibidores de análogos nucleosídicos y no nucleosídicos en aislados naturales de pacientes infectados con VHC genotipo 1, debido a que la mayoría de los inhibidores han sido desarrollados usando ensayos enzimáticos basados en polimerasas de este genotipo, sobre todo del aislado alemán Con1, de subtipo 1b.

En cuanto a la variación en pacientes, en los trabajos publicados por Kuntzen *et al*²⁰ y Legrand *et al*²⁹ no encontraron las sustituciones S96T, N142T y S282T que confieren resistencia a análogos de nucleósidos, pero sí la sustitución N142T y el polimorfismo N142S en el estudio realizado por Chinnaswamy *et al*²² y Kieffer *et al*²¹ la sustitución S282T. En nuestro estudio encontramos solo el polimorfismo N142S en una de las secuencias analizadas.

Sin embargo, en nuestro estudio encontramos varias sustituciones causantes de resistencia a inhibidores no nucleosídicos, observando ciertas similitudes a los resultados obtenidos por Kuntzen *et al*²⁰ y Legrand *et al*²⁹. De las variaciones que confieren resistencia

a los derivados del benzimidazol, encontramos la variación I424V en un 7,14% de las secuencias y la variación A338V, no descrita en estudios publicados, en el 100% de las secuencias analizadas. Además, encontramos la sustitución A442T en 1/28 secuencias y el polimorfismo T19S en un 92,9% de las secuencias analizadas.

También encontramos otras variaciones que afectan a los inhibidores de unión a la polimerasa, como la sustitución S556G no descrita previamente en el genotipo 1²⁹, en un 14,3% de las secuencias. Además, encontramos las mutaciones C451Y ó C451H, descritas recientemente por Chinnaswamy *et al*²² y que confieren resistencia a las benzotiazidinas, en 2/28 y en 3/28 secuencias, respectivamente. Finalmente, la variación C316N se encontró en un 46,4% de las secuencias, una proporción similar al estudio realizado por Chinnaswamy *et al*²².

Finalmente, la variación S556G, encontrada en 4 secuencias analizadas, se encuentra relacionada con la resistencia a análogos de ciclosporina, inhibidores no inmunomoduladores análogos a la ciclosporina A. Estas moléculas han demostrado una potente inhibición de la replicación del VHC, sugiriendo que las ciclofilinas, proteínas del hospedador a las que se une la ciclosporina, juegan un papel crítico en la replicación del virus, probablemente interaccionando con componentes virales del complejo de replicación³⁶.

En la segunda parte del trabajo, se determinó la variabilidad clonal de NS5B en un individuo en particular, para estudiar la población de “cuasiespecies” virales y determinar si ésta contiene genomas minoritarios con mutaciones de resistencia no detectables mediante secuenciación directa estándar. Este aspecto es importante porque que estas variantes minoritarias detectables sólo mediante análisis clonal podrían pasar en algún momento a ser población mayoritaria, por ejemplo cuando exista la presión de selección^{13, 14, 21}.

En este trabajo encontramos que las mutaciones detectadas por secuenciación directa del paciente seleccionado están en el 100% de los genomas analizados por análisis clonal (A338V, T19S, A300T, C316N y R531K). Sin embargo, en este análisis clonal encontramos mutaciones minoritarias en algún otro aminoácido asociado a resistencia en 3/20 genomas estudiados (K523R, M71V, y M/I462T), lo que hace presuponer una reducida susceptibilidad a los fármacos HCV-796, tiopenos y dihidropironas, y a otros inhibidores alostéricos. No se conoce si las variantes minoritarias resistentes podrían ser seleccionadas y persistir a largo plazo en mayor o menor proporción de la cuasiespecie en todos los pacientes o sólo en algunos. Por lo tanto, el análisis de la secuencia genotípica será necesario realizarlo en los primeros días durante tratamiento, al final de tratamiento, y a corto y a largo plazo después.

Sin embargo, la caracterización inicial del perfil de resistencia a los agentes

antivirales utilizando un método de alta sensibilidad como es la secuenciación de clones sería ideal, pero es tedioso. Se están desarrollando otros métodos alternativos de análisis exhaustivo de secuencias, tales como PCR específica (TaqMAMA), ensayos de hibridación y de restricción enzimática, y métodos basados en ultrapirosecuenciación de profundidad (454). Queda por determinar qué enfoque será el más útil para identificar mutaciones de resistencia a antivirales en la práctica. Además, el primer trabajo de caracterización de variantes resistentes al VHC seleccionados durante la monoterapia con telaprevir, un inhibidor de la proteasa NS3, ha identificado mutaciones no predecidas ni utilizando el análisis clonal¹³. En consecuencia, es necesario diseñar futuras estrategias de detección de mutaciones de resistencia para el estudio y la caracterización de virus resistentes a los nuevos antivirales específicos con objeto evitar la selección de variantes resistentes, o al menos retrasar su extensión, prolongando el período de efectividad de dichos inhibidores.

CONCLUSIONES

- Numerosas sustituciones que confieren resistencia a los inhibidores no nucleosídicos, están presentes en aislados naturales de VHC de la población estudiada. Esto demuestra la preexistencia en pacientes nunca tratados de variaciones de aminoácidos asociadas con resistencia a estos nuevos fármacos.
- Por otra parte, encontramos solo el polimorfismo N142S en una de las secuencias analizadas y no las sustituciones S96T, N142T y S282T que están asociadas con resistencia a los análogos de nucleósidos. Actualmente estos fármacos son los más prometedores debido al escaso número de mutaciones de resistencia descritas y la baja frecuencia de éstas en los virus circulantes en la población.
- También se encontró una variación relacionada a la resistencia a análogos de ciclosporina.
- Las mutaciones detectadas por secuenciación directa del paciente seleccionado están en el 100% de los genomas analizados.
- Además en este análisis clonal se detectó en 3/20 genomas, variaciones en un aminoácido asociado con la resistencia a inhibidores de la polimerasa. Demostrando así que la población de “cuasi-especies” virales minoritaria circulantes en un individuo que contenga algún genoma con mutaciones de resistencia a estos nuevos fármacos inhibidores específicos de la polimerasa NS5B no detectables mediante secuenciación directa estándar, pueden ser detectados con este tipo de análisis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Choo, Q.; Kuo, G.; Weiner, A.; Overby, L.; Bradley, D. y Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**; 244:359-362.
2. Moradpour, D.; Penin F. y Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. **Nature Reviews Microbiology**; 5:453-463.
3. Waris, G.; Tardif K. y Siddiqui, A. (2002). Endoplasmic Reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces and ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. **Biochem. Pharmacol**; 64:1425-1430.
4. Xu, Z.; Choi, J.; Yen, T.; Lu, W.; Strohecker, A.; Govindarajan, S.; Chien, D.; Selby, M.; Ou, J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus potein by ribosomal frameshift. **EMBO J**; 20 (14):3840-8.
5. Block, T.; Mehta, A.; Fimmel, C. y Jordan R. (2003). Molecular viral oncology of hepatolellular carcinoma. **Oncogene**; 22:5093-5107.
6. CDC (1998). Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. **MMWR**; 47 (No. RR-19):1-39.
7. Lauer, G. M.; Walker, B. D. (2001). Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**; 345:41-52.
8. Pawlowsky J. (2004). Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends Microbiol**; 12 (2):96-102.
9. Simmonds, P.; Alberti, A.; Alter, H.; Bonino, F.; Bradley, D.; Bréchet, C.; Brouwer, J.T.; Chan, S.W.; Chayama, K.; Chen, D.S.; *et al.* (1994). A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. **Hepatology**; 19:1321-1324.
10. Zein N. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin Microbiol Rev.**; 13:223-35.
11. Bartenschlager, R.; Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. **J Gen Virol**; 81(Pt 7):1631-1648.
12. Duffy, S.; Shackelton, L.A.; Holmes, E.C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nat Rev Genet**; 9(4): 267-276.
13. Sarrazin, C. y Zeuzem, S. (2010). Resistance to Direct Antiviral Agents in Patients With Hepatitis C Virus Infection. **Gastroenterology**; 138:447-462.
14. Thompson, A. J. V. y McHutchison, J. G.. (2009). Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HVC (STAT-C). **Journal of Viral Hepatitis**; 16:377-387.
15. Cuevas, J.M.; Lopez-Labrador, X.; Sentandreu, V.; Bracho, M. A.; González-Candelas, F. (2009). Estrategias de adaptación a antivirales en virus de RNA” Sociedad Española de Biología Evolutiva (SESBE); 1-6.
16. Fried, M.W.; Shiffman, M.L.; Reddy, K.R.; Smith, C.; Marinos, G.; Gonçalves, F.L. Jr; Häussinger, D.; Diago, M.; Carosi, G.; Dhumeaux, D.; Craxi, A.; Lin, A.; Hoffman, J.; Yu, J. (2002). Peguinterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**; 347:975-982.
17. Manns, M.P.; Wedemeyer, H.; Cornberg, M. (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects and complications. **Gut**; 55:1350-1359.

18. Kwong, A.D.; McNair, L.; Jacobson, I.; George, S. (2008). Recent progress in the development of selected hepatitis C virus NS5A protease and NS5B polymerase inhibitors. **Current opinion in Pharmacology**; 8:522-531.
19. De Francesco, R.; Carfi, A. (2007). Advances in the development of new therapeutic agents targeting the NS3-4A serine protease or the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. **Advanced Drug Delivery Reviews**; 59 (12):1242-1262.
20. Kuntzen, T.; Timm, J.; Berical, A.; Lennon, N.; Berlin, A. M.; Young, S. K.; Lee, B.; Heckerman, D.; Carlson, J.; Reyor, L.; Kleyman, M.; McMahon, C.M.; Birch, C.; Schulze zur Wiesch, J.; Ledlie, T.; Koehrsen, M.; Kodira, C.; Roberts, A. D.; Lauer, G. M.; Rosen, H.R.; Bihl, F.; Cerny, A.; Spengler, U.; Liu, Z.; Kim, A.Y.; Xing, Y.; Schneidewind, A.; Madey, M.A.; Fleckenstein, J.F.; Park, V.M.; Galagan, J.E.; Nusbaum, C.; Walker, B.D.; Lake-Bakaar, G.V.; Daar, E.S.; Jacobson, I.M.; Gomperts, E.D.; Edlin, B.R.; Donfield, S.M.; Chung, R.T.; Talal, A.H.; Marion, T.; Birren, B.W.; Henn, M.R.; Allen, T.M. (2008). Naturally occurring dominant resistance mutations to HCV protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. **Hepatology**; 48(6):1769-78.
21. Kieffer, T.L.; Kwong, A.D.; Picchio, G.R. (2010). Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). **Journal Antimicrobial Chemotherapy**; 65:202–212.
22. Chinnaswamy, S.; Cai, H.; Kao, C. (2010). An update on small molecule inhibitors of the HCV NS5B polymerase: effects on RNA synthesis *in vitro* and in cultured cells, and potential resistance in viral quasispecies. **Virus Adaptation and Treatment**; 2:73-89.
23. Dower, W.J.; Miller, J.F.; Ragsdale, C.W.(1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acid Res.** 16:6127-6145.
24. Smith, D.B.; Martin, J.A.; Klumpp, K.; Baker, S. J.; Blomgren, P.A.; Devos, R.; Granycome, C.; Hang, J.; Hobbs, C.J.; Jian, W.R.; Laxton, C.; Le Pogam, S.; Leveque, V.; Ma, H.; Maile, G.; Merrett, J.H.; Pichota, A.; Sarma, K.; Smith, M.; Swallow, S.; Symons, J.; Vesey, D.; Najera, I.; Cammack, N. (2007). Design, synthesis and antiviral properties of 4'-substituted ribonucleosides as inhibitors of hepatitis C virus replication: the discovery of R1479. **Bioorg med Chem Lett**; 17:2570-2576.
25. Murakami, E.; Bao, H.; Ramesh, M.; McBrayer, T.R.; Whitaker, T.; Micolochick Steuer, H.M.; Schinazi, R.F.; Stuyver, L.J.; Obikhod, A.; Otto, M.J.; Furman, P.A. (2007). Mechanism of activation of β -D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine and inhibition of hepatitis C virus NS5B RNA polymerase. **Antimicrobial Agents Chemother**; 51:503-509.
26. Herlihy, K.J.; Graham, J.P., Kumpf, R., Patick, A.K., Duggal, R., Shi, S.T. (2008). Development of intergenotypic chimeric replicons to determine the broad spectrum antiviral activities of hepatitis C virus polymerase inhibitors. **Antimicrobial Agents Chemother**; 52:3523-3531.
27. Shy, S.T.; Herlihy, K.J., Graham, J.P., Fuhrman, S.A., Doan, C., Parge, H., Hickey, M., Gao, J., Yu, X., Chau, F., Gonzalez, J., Li, H., Lewis, C., Patick, A. K., Duggal, R. (2008). *In vitro* resistance study of AG-021541, a novel nonnucleoside inhibitor of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. **Antimicrobial Agents Chemother**; 56:675-683.
28. Kukolj, G.; McGibbon, G. A.; McKercher, G.; Marquis, M.; Lefebvre, S.; Thavette, L.; Gauthier, J.; Goulet, S.; Poupart, M.A.; Beaulieu, P.L. (2005). Binding site characterization and resistance to a class

- of non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase. **J Biol Chem**; 280:39260-39267.
29. Legrand-Abravanel, F.; Henquell, C.; Le Guillou-Guillemette, H.; Balan, V.; Mirand, A.; Dubois, M.; Lunel-Fabiani, F.; Payan, C.; Izopet, J. (2009). Naturally occurring substitutions conferring resistance to hepatitis C virus polymerase inhibitors in treatment-naïve patients infected with genotypes 1-5. **Antiviral Therapy**; 14:723-730.
30. Howe, A.Y.M.; Cheng, H.; Thompson, I.; Chunduru, S.K.; Herrmann, S.; O'Connell, J.; Agarwal, A.; Chopra, R.; Del Vecchio, A.M. (2006). Molecular mechanisms of a thumb domain hepatitis C virus nonnucleoside RNA-dependent RNA polymerase. **Antimicrobial Agents Chemother**; 50:4103-4113.
31. Howe, A.Y.M.; Cheng, H.; Johann, S.; Mullen, S.; Chunduru, S.K.; Young, D.C.; Bard, J.; Chopra, R.; Krishnamurthy, G.; Mansour, T.; O'Connell, J. (2008). Molecular mechanisms of hepatitis C virus replicon variants with reduced susceptibility to a benzofuran inhibitors, HCV-796. **Antimicrobial Agents Chemother**; 52:3327-3338.
32. Robida, J.M.; Nelson, H.B.; Liu, Z.; Tang, H. (2007). Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro. **J Virol**; 81:5829-5840.
33. Hopkins S., *et al.* (2008). The genetic and biochemical basis for resistance to SCY-635. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases. Abstract 1915.
34. Fernandes, F.; Poole, D.S.; Hoover, S.; Middleton, R.; Andrei, A.C.; Gerstner, J.; Striker, R. (2007). Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural protein NS4A and NS5B. **Hepatology**; 46:1026-1033.
35. Dryer, P.D.; Limketkai, B.N.; Martin, C.M.; Ma, G.; Sherman, K.E.; Taylor, L.E.; Mayer, K.H.; Jamieson, D.J.; Blackard, J.T. (2009). Screening for hepatitis C virus non-nucleotide resistance mutations in treatment-naïve women. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**; 64:945-948.
36. Pawlotsky, J. M. (2009). Therapeutic implications of hepatitis C virus resistance to antiviral drugs. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**; 2(4) 205-219.

ANEXO 1

Mezcla de reacción de retrotranscripción

RNA (15µl); hexámeros 25-250ng (3µl); H₂O DEPC (18.3µl); dNTP 25mM (1,2µl), Tampón SuperSriptII x5 (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 a temperatura ambiente; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), (12µl); DTT 0,1M (6µl) RNA sin promega 40U/µl (1,5µl); SuperScriptII 200U/µl (3µl). Volumen final: 60µl

Mezcla de reacción de PCR de alta fidelidad (Phusion HS)

Tampón PhuHS HF (7,5mM MgCl₂) x5 (10µl), dNTP (2mM), cebador directo (2,5µl), cebador reverso (2,5µl), H₂O DEPC, Phusion HS 2U/µl (0,5µl), cDNA (5µl) para PCR-1; (1µl) para PCR-2. Volumen final: 50µl

Mezcla de reacción de PCR de colonia

Tampón (5 mM MgCl₂) x10 (10µl), dNTP (25mM) (0,4µl), cebador directo 10 uM (2µl), cebador reverso 10uM (2µl), H₂O DEPC, Taq DNA polimerasa (Biotools) 1U/µl (2 µl), Volumen final: 100µl

Mezcla de reacción de secuenciación

Secuencia de los cebadores utilizados

Reacción	Cebador (sentido)	Secuencia (5'-3')
Retrotranscripción	-hexámeros	nnnnnn
Primera amplificación	-1b-7481-F1 -1b-9396-R1	ATGCCCCCCTYGAGGGRGARCCRGGGGA ATGGCCTAWTRWCCTGGAGTG
Segunda amplificación 1º ronda	-1b-7527-F1 -11-9371-R1	CTCAGYGACGGGTCHTGGTCTACCGTGAG AYCGGTTGGGGAGSAGGTAGA
Segunda amplificación Heminested 3'	-ns5ba1g- F -11-9371-R1	TATGATACYCGCTGYTTYGACTC AYCGGTTGGGGAGSAGGTAGA
Segunda amplificación Heminested 5'	-1b-7527-F1 -ns5ba2a-R	CTCAGYGACGGGTCHTGGTCTACCGTGAG CTCKYAGGCTCGCCGRTCCCTC
Segunda amplificación Control interno	-ns5ba1g-F -ns5ba2a-R	TATGATACYCGCTGYTTYGACTC CTCKYAGGCTCGCCGRTCCCTC
Secuenciación (sentido directo)	-Ns5bg2 -7527-F1 -1101G -7947 -8397-F1 -ns5ba1g -nb1327g -UTR3g1	CTCAGYGACGGGTCHTGGTC CTCAGYGACGGGTCHTGGTCTACCGTGAG CCACATYMRCTCCGTGT TCCGTGTGGRAGRACYTGCTGGAGACA GGGCAGARCTGYGGTTATCGCCGGTGGCCG TATGATACYCGCTGYTTYGACTC ACAGYHMGRCACTC ACGGACCTTTCACAGCTAGCCGTG
Secuenciación (antisentido)	-830a -1101a -ns5ba1a -nb1279a -8878 -9374 -9371	CRNACGACRAGYTACAG GGTGTARKYGAGGCACA GTACCTRGTCATAGCCTCCGTGAA TKATRTTKCCYARCCAGG GAGAAGAARTGRGTCATCARAATCAT TTAKCTCMMCGYTCAYCGRKYGGGGAG ACCGGTTGGGGCGSAGGTAGAA
Secuenciación (clones)	-SK -KS	CGCTCTAGAACTAGTGGATC TCGAGGTCGACGGTATCG

Medio SOC:

2% w / v Bacto- triptona (20 g); 0,5% w/v Bacto-extracto de levadura (5 g); NaCl 8.56mM NaCl (0,5 g) o 10 mM de NaCl (0,584 g); KCl 2.5mm KCl (0,186 g); MgCl 2MgSO 410 mM MgCl 2 (0.952 g) o 20mM MgSO4 (2,408 g); dd H 2 O [4]dd H 2 O a 1000 ml; 20mM glucosa (3,603 g) y pH ajustado a 7,0 mediante la adición de concentrado de hidróxido de sodio .

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

En nuestro caso, utilizamos medio SOC comercial (Invitrogen).

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

Extracto de levadura (5g); Bactotripton (10g); NaCl (10g); Agar 1,6%; H₂O hasta 1l; NaOH, ajustar a pH 6,1; ampicilina (100 μ g/ml)X-gal (500 μ M); IPTG 40 μ g/ml.