



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



**UTILIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E2 y NS2
PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE
LA HEPATITIS C EN PACIENTES INFECTADOS CRONICOS**

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Marianny L. Yopez M.

C.I.: V-24.618.205

Tutor:

Dra. Siham Salmen Halabi

Mérida, Agosto de 2019



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



**UTILIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E2 y NS2
PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE
LA HEPATITIS C EN PACIENTES INFECTADOS CRONICOS**

(Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título
de licenciada en Bioanálisis)

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Marianny L. Yopez M.

C.I.: V-24.618.205

Tutor:

Dra. Siham Salmen Halabi

Mérida, Agosto de 2019

DEDICATORIA

Este gran paso en mi vida y mi carrera es dedicado primero a DIOS todo poderoso por darme vida y salud, gracias a él todos mis sueño son posibles.

A mis padres, Rafael Yépez y Mirla Méndez, los pilares de mi vida, mis mejores profesores, enseñándome desde pequeña que el amor, la constancia, la responsabilidad y la disciplina me llevaran muy lejos. Gracias a los dos son lo que más amo en el mundo, sé que con ellos a mi lado todo lo puedo lograr.

A toda mi familia, que siempre están pendiente de mí. Principalmente, mi abuela querida Aminta Valera, lo más grande que tengo; su amor por mí es lo que me da impulso por ser una gran persona todos los días. A mis dos ángeles que desde el cielo me observan José Dionicio y Juana Paula, todos los días lo extraño. A todos míos tíos, por siempre llamarme para darme ánimos y apoyarme en las buenas y en las malas. Gracias por ser tan especiales conmigo.

A mis hermanos Mariely, Oscar Eduardo, Oscar Edgardo y Osmary. La vida no sería la misma sin ustedes a mi lado, son mi tesoro más apreciado. El Universo me premio con los mejores hermanos que alguien pudiera tener.

A dos personas importantes, mi madrina Elibeth Castellanos y Louisiana Aguirre que desde muy lejos, siempre están cerca de mí apoyándome.

A mis amigos que estuvieron a lo largo de mi carrera universitaria, son ángeles que me acompañaron cada semestre. A los que siguen luchando por su sueño en Venezuela, y aquellos amigos que se fueron para luchar por sueños en otro país. Gracias por demostrarme que es una verdadera amistad.

Marianny Lisbeth Yépez Méndez

AGRADECIMIENTO

Eternamente agradecido con mi Dios Todopoderoso, quien me puso en este camino y guía mis pasos, me da vida y salud.

Especialmente a toda mi gran familia, mis padres, mis abuelos, mis tíos, mis primos y hermanos. En particular mis Tías Zulay, Nereida y Olga por estar siempre ayudándome durante toda mi carrera, las tres son unas madres para mí. Gracias a todos por apoyarme en cada proyecto, por sus consejos y palabras que han sido de gran apoyo para mis proyectos.

A la ilustre Universidad De Los Andes mi segunda casa, que me abrió la puerta durante 5 años de mi carrera, agradecida con todos los profesionales que laboran en esta ilustre casa de estudio, son grandes personas que todos los días dan lo mejor de sí, dando con amor su conocimiento y experiencia para hacer que nuestra universidad sea reconocida a nivel mundial a pesar de las adversidades. Siempre estaré agradecida.

A mi querida tutora la Dra. Siham Salmen, un gran ser humano, generoso y gentil, gracias a usted por aceptar y ayúdame en cada etapa de este proyecto tan grande, gracias por brindarme su ayuda, dedicación y esfuerzo. Usted es un persona de admirar, gracias por permitirme realizar esta tesis.

Al Instituto de Inmunología Clínica, por abrirme sus puertas, a las personas que laboran en él, que de una manera u otra hicieron muy agradable mi estadía ahí.

Marianny Lisbeth Yépez Méndez

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	5
Epidemiología	5
Rutas de Transmisión	6
Estructura de VHC	7
Genoma de VHC	8
Proteína de la cápside o core (C)	9
Proteínas de la envoltura	10
Proteína P7	10
Proteína NS2	11
Proteína NS3	11
Proteína NS4	11
Proteína NS5	11
Estadio de la infección	12
Infección aguda	12
Infección Crónica y cirrosis hepática	13
Hepatocarcinoma	13
Evaluación virológica y serológica	13
JUSTIFICACIÓN	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPOTESIS	16
OBJETIVOS	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	17
MATERIALES Y METODOS	18
Selección de los pacientes	18
Transformación de Células Competentes	18
Expansión de las cepas de <i>Escherichia coli</i> transformadas	18
Purificación por Cromatografía de afinidad	19

Electroforesis en gel	20
Diseño de ELISA HVC 4.0 con proteínas recombinante del HVC	20
Cuantificación de la carga viral mediante PCR en tiempo real	21
Análisis Estadístico	22
RESULTADOS	23
Obtención y purificación de las proteínas E2 y NS2 del HVC	23
Cuantificación de la carga viral	28
Valoración diagnóstica del ensayo inmunoenzimático	28
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del E2-VHC	26
Tabla 2. Propiedades físico-químicas del NS2-VHC	27
Tabla 3. Correlaciones de las Proteínas E2 y NS2	34
Figura 1. Distribución mundial de los genotipos de VHC	6
Figura 2. Estructura de Virus de la hepatitis C	8
Figura 3. Organización del genoma de VHC	9
Figura 4. Esquema de la historia natural de la infección por el VHC	12
Figura 5. Corrida electroforética de las fracciones colectadas luego de la elución y el lisado total post inducción	24
Figura 6. Densidades ópticas de las fracciones proteicas obtenidas durante el proceso de purificación	24
Figura 7. Corrida electroforética de las fracciones colectadas luego de la elución y el lisado total post inducción	25
Figura 8. Densidades ópticas de las fracciones proteicas obtenidas durante el proceso de purificación	25
Figura 9. Corrida electroforéticas y tinción con azul de coomasie de las proteínas E2 (b) y Ns2(c)	27
Figura 10. Promedio e intervalos de confianza de las cargas virales cuantificadas en pacientes y controles	28
Figura 11. Valores de absorbancias de los individuos evaluados mediante el ensayo inmunoenzimático con las proteínas E2 (2a) y NS2 (2b).	29
Figura 12. Curva operador-receptor (ROC) para la detección de pacientes infectados crónicos mediante el ensayo inmunoenzimático con proteína E2-VHC	29
Figura 13. Curva operador-receptor (ROC) para la detección de pacientes infectados crónicos mediante el ensayo inmunoenzimático con proteína NS2-VHC	30
Figura 14. Análisis de correlación entre las absorbancias de la Proteína E2 y las absorbancias de la prueba casera diseñada en el IDIC	31
Figura 15. Análisis de correlación entre las absorbancias de la Proteína NS2 y las absorbancias de la prueba casera diseñada en el IDIC	32

Figura 16. Análisis de correlación entre las absorbancias de la 33
Proteína NS2 y CV

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA
LÍNEA DE INVESTIGACION: INMUNOLOGIA



UTILIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E2 y NS2 PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN PACIENTES INFECTADOS CRONICOS

Trabajo de Grado

Autor: Marianny L. Yepez M.

C.I.: V-24.618.205

Tutor: Dra. Siham Salmen Halabi

RESUMEN

La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) se considera una de las causas más comunes de cirrosis y carcinoma hepatocelular. En la actualidad la búsqueda de nuevos marcadores serológicos de progresión de la enfermedad es uno de los mayores retos para la salud pública. Aunque E2/NS2 son inmunogénicos, su papel en la respuesta serológica aún no ha sido dilucidado. El objetivo de este trabajo fue evaluar utilidad de las proteínas recombinantes E2 y NS2 para la detección de la infección por el VHC en pacientes infectados crónicos. En primera fase se expresó e indujo los genes E2 y NS2 previamente clonados en los vectores pQE31-30 usando *Escherichia coli*, como sistema de expresión. El proceso de purificación se realizó por cromatografía de afinidad al níquel, la pureza se analizó mediante electroforesis de poliacrilamida. En una segunda fase se procedió a valorar la prueba de inmunoensayo para evaluar su utilidad mediante la determinación de anticuerpos en suero de pacientes infectados crónicos y pacientes sanos. Así como también su correlación con la carga viral y con la prueba casera del IDIC Nuestros resultados muestran que las proteínas tienen alta especificidad (100%), sin embargo, por si solas tienen una sensibilidad inferior al 92%, por otro lado, conseguimos la correlación entre las absorbancias de las proteínas E2/NS2, con los niveles de carga viral, lo que pudiera sugerir su asociación con actividad replicativa del virus.

Palabras claves: Hepatitis C, E2, NS2, carga viral, infección crónica, diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis es una enfermedad del hígado de etiología multifactorial, que puede remitir espontáneamente o evolucionar hacia la fibrosis (cicatrización), cirrosis o carcinoma hepatocelular^{1, 2}. Entre las causas más frecuentes están las hepatitis causadas por virus, medicamentos o toxinas, secundarias a enfermedades metabólicas, consumo excesivo de alcohol³ o por la alteración del sistema inmune ocasionando hepatitis autoinmune².

En el caso específico de las hepatitis virales, estas se dividen: *según su evolución* clínica en agudas o crónicas según el tiempo de evolución y capacidad del hospedador de resolver el proceso infeccioso; y *según el agente etiológico viral*, debido a que además estos tienen diferentes mecanismos de transmisión e inmunopatogénicos, que determinan la evolución y severidad de la enfermedad. Dentro de los agentes causales virales están: el virus de la hepatitis A (VHA), la hepatitis B (VHB), la hepatitis C (VHC), la hepatitis Delta (VHD) y otras que se encuentran en estudio como la hepatitis G, GB y F^{3,4}. Es por ello, que han alcanzado especial importancia en todo el mundo y en la actualidad son considerados como un problema de salud pública, ya que se ha estimado que anualmente afecta a millones de personas, causando discapacidad y muerte⁵.

Millones de personas viven con hepatitis virales y se encuentran en situación de riesgo para desarrollar lesiones hepáticas irreversibles. La mayoría de los infectados por largo tiempo con los virus de VHB o VHC no saben que padecen una infección crónica y en general estas personas tienen alto riesgo de padecer una enfermedad hepática crónica grave, y transmitir involuntariamente la infección⁵. En el caso específico del VHC, que es objeto de estudio de este trabajo, las principales vías de transmisión la vía parenteral bien sea por inoculaciones repetidas por vía cutánea o por una gran inoculación como sucede en casos de transfusiones, utilización de droga intravenosa o trasplante de órganos⁶⁻⁸. Existen otras vías tales como tatuajes, piercing, la transmisión por vía vertical de madre-hijo, y todo procedimiento que conlleve al contacto con sangre contaminada. Aunque la transmisión sexual ha sido documentada

en hombres que tienen sexo con hombres, no es una vía de transmisión frecuente ^{9,10}.

Alrededor de 180 millones de persona poseen infección por VHC, equivalente a 3% de la población global¹¹. Su prevalencia en la población general varía entre 0.2 y el 5% según las zonas geográficas consideradas¹². Entre las zonas con mayor prevalencia se encuentran: Mediterráneo Oriente y Europa con 2,3 % y 1,5% de la población. Mientras que las zonas con prevalencia intermedia destacan: Pacífico Occidental, África y América con 1% de la población. Finalmente Asia Sudoriental se considerada como la zona de baja prevalencia de la infección por VHC¹³. En Venezuela, se han reportado prevalencias de 1,1%, en poblaciones urbanas, rurales y de 0% a 71% en poblaciones de riesgo, como trabajadoras sexuales (0%), usuarios de drogas intravenosas (1%), crack oral (43,1%), receptores de transfusiones múltiples (24%) y pacientes hemodializados (39% a 71%) ¹⁴.

Una vez que el individuo se expone al VHC puede eliminar o contener el virus sin un tratamiento durante los primeros 6 meses, esto solo ocurre en aproximadamente 20% de los casos¹⁵, lamentablemente el resto de las personas infectadas no pueden eliminar el virus y desarrollan una infección crónica¹⁶, esto se debe a que 75% de las personas desarrollan una infección aguda por lo general asintomática lo cual hacen difícil su identificación, generando mayor riesgo en la evolución de la enfermedad ¹⁷. Por otro lado, alrededor del 15 – 30 % de los pacientes con infección crónica evolucionan a cirrosis hepática en un plazo de 20 años y el 15% de los pacientes con cirrosis desarrollan hepatocarcinoma ^{18,19}.

El VHC durante el proceso de replicación produce diferentes proteínas tanto estructurales y no estructurales, las cuales originan una respuesta serológica muy variada. Las primeras proteínas que son identificadas por los anticuerpos del hospedador infectado son la proteína del Core y NS3 ⁸, por lo que su inclusión es importante en el diseño de los estuches para el diagnóstico temprano de la infección por este virus. En la actualidad existen ensayos indirectos de cuarta generación que incorporan estas proteínas y otras de la región no estructural del virus, como NS4 y NS5 que le dan una mayor

sensibilidad y especificidad al ensayo. Sin embargo, existen otros componentes antigénicamente relevantes como E2 y NS2 que forman parte de la región estructural y no estructural, determinan el tropismo viral, sin embargo su valor en el diagnóstico y seguimiento de la infección, aún no se ha establecido de manera clara, es por ello que el objetivo de este trabajo es evaluar la utilidad de las proteínas recombinantes E2 y NS2 para la detección de la infección por el virus de la hepatitis C.

www.bdigital.ula.ve

MARCO TEÓRICO

Epidemiología

La infección por el VHC es en la actualidad la causa de enfermedad hepática de mayor importancia a escala mundial ²⁰, estimándose una cifra aproximada de 180 millones de personas infectadas en el mundo, de las cuales 80% progresan a una infección crónica por este virus, siendo una de las principales causas de cirrosis, carcinoma hepatocelular y necesidad de trasplante hepático. El VHC es responsable del 27% de los casos de cirrosis hepática y del 15% de los casos de carcinoma hepatocelular en el mundo, representando una considerable carga social y económica ^{21, 22}.

La prevalencia de VHC en la población general varía considerablemente, en los países industrializados es del 1-2%, mientras que en países Mediterráneos del Este y África la prevalencia es mayor (hasta 13% en Egipto) ²³. Las estimaciones más recientes realizadas por la OMS respecto al número de muertes muestran 53.700 muertes al año directamente atribuibles al VHC. Sin embargo, la OMS estima que más de 308.000 muertes al año son probablemente debidas al cáncer de hígado causado por el VHC, junto a una proporción significativa de 785.000 muertes por cirrosis. En conjunto, estos datos sugieren que el VHC es responsable de aproximadamente un millón de muertes al año ^{24, 25}.

Solo en Estados Unidos esta infección es responsable de 10.000 muertes anuales constituyendo además la primera causa de indicación de trasplante hepático en este país ^{26,27}. Se ha descrito que el rango de edad en el que predomina la infección está comprendido entre 45 y 65 años ^{28, 29}. En América latina la prevalencia es alrededor del 1,23: México 1%, Argentina 1.9%, Brasil 1.4%, Colombia 0.97% ^{30,31}. En nuestro país, para el año 2000, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), estimó la tasa de infección en 1,4% ³². Ahora bien, ajustándola y proyectándola según la data de Instituto Nacional de Estadística (INE) para el 2016 superaríamos los 450.000 de infectados ^{32,33}.

Desde el punto de vista de la epidemiología molecular, existen al menos seis genotipos de VHC y alrededor de 100 cepas diferentes, cuya prevalencia varía

geográficamente³⁴. Además, se han detectado múltiples cuasi especies que coexisten dentro de un individuo infectado, lo que refleja la amplia variabilidad genética del VHC³⁵. En Europa, América, Australia y el este Asiático, los genotipos 1, 2 y 3, tienen una amplia distribución, con predominio del genotipo 1 representando aproximadamente del 60% al 70% de las infecciones mundiales. El genotipo 4 predomina en Egipto, Oriente Medio y África central, mientras que los genotipos 5 y 6 predominan en el sudeste asiático y en el sur de África³⁶. En la figura 1 se muestra como es la distribución mundial del VHC.

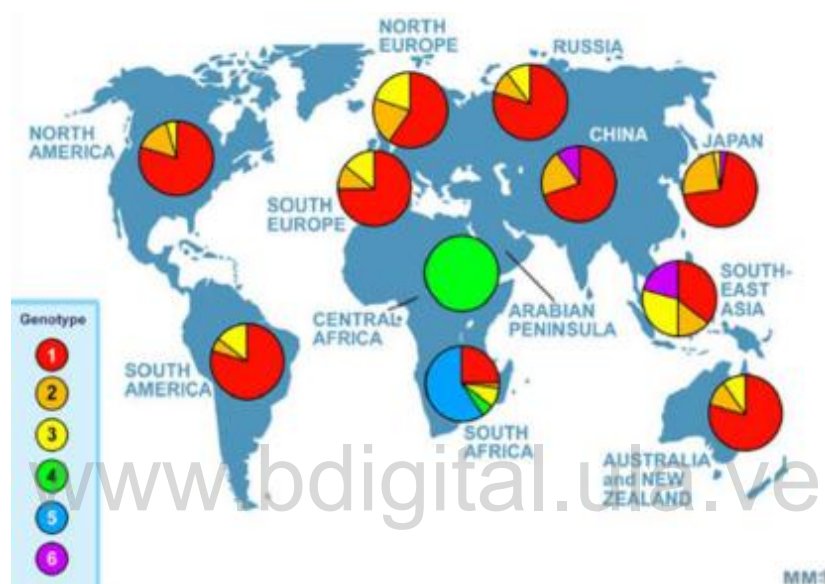


Figura 1 Distribución mundial de los genotipos de VHC³⁷

Ruta de Transmisión.

El virus se transmite principalmente por exposición a sangre infectada a través de: transfusiones de sangre o productos sanguíneos y trasplante de órganos de donantes no analizados; uso de jeringas contaminadas al consumir drogas por vía intravenosa; uso de inyecciones terapéuticas o material cortopunzante contaminado u otro procedimiento incorrectamente realizado en el ámbito sanitario; realización de tatuajes o intervenciones con objetos punzantes contaminados con sangre infectada^{38,39}.

Las mujeres infectadas por el VHC también pueden transmitirlo a sus hijos durante el parto, mientras que la transmisión a través de las relaciones sexuales con personas infectadas es posible pero poco eficiente. También se ha descrito que existe riesgo de infección por compartir objetos personales

contaminados con sangre infectada. Es importante destacar que la hepatitis C no se transmite por la leche materna, los alimentos, el agua, ni por contactos casuales como los abrazos, los besos o el hecho de compartir alimentos o bebidas con personas infectadas. El riesgo de infección por el VHC en el contexto ocupacional se estima que es de aproximadamente 1,8% ⁷.

Tras la introducción del “screening” en las transfusiones sanguíneas, el uso de drogas por vía intravenosa ha pasado a ser la fuente principal de la infección ⁴⁰. La prevalencia de infección por el VHC es alto en este grupo de riesgo llegando a ser hasta del 90% ⁴¹. No obstante se ha observado un descenso en los últimos años realizado campañas sanitarias y la disponibilidad de utilizar jeringas de un solo uso. Dado que la infección se adquiere en los primeros meses de iniciarse en la drogadicción, hasta el 80% de los adictos presentan anticuerpos a los 12 meses de haber iniciado el uso de las drogas ⁴².

Estructura del VHC

El VHC es un virus humano que se clasifica dentro de un tercer género, (Hepacivirus), de la familia de los *Flaviviridae*. Fue identificado en 1989, como el principal agente causante de las hepatitis post-transfusionales no-A no-B ⁴³. Es un virus esférico, de aproximadamente 30-60 nm de diámetro. El cual presenta una nucleocápside de simetría icosaédrica y además consta de una envoltura glicoproteína que le permite asociarse a lipoproteínas de baja densidad plasmática ⁴⁴⁻⁴⁶. Así mismo su genoma es una molécula de ARN de cadena simple de polaridad positiva y se caracteriza por un alto grado de heterogeneidad genómica, cuya consecuencia evolutiva, a largo plazo, es la aparición de grupos virales genéticamente distintos ^{7, 30,47}. En la figura 2, se muestra una representación de la estructura de la partícula viral del VHC

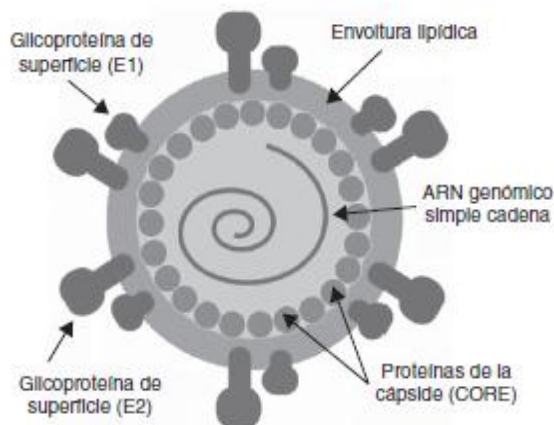


Figura 2. Estructura del virus de la hepatitis C⁴⁸

Genoma del VHC

El genoma de VHC consiste en una molécula de ARN de aproximadamente 9600 nucleótidos, estructurada en una región codificante que contiene un marco de lectura abierto grande, flanqueado por regiones traducidas (UTR) en el extremo 5' y 3'⁴⁹. Los genes estructurales (core, E1 y E2), están localizados en la zona próxima al extremo 5' del genoma, mientras que los genes no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4 y NS5) son adyacentes a 3' que flanquea la ORF⁵⁰ (ver figura 3). La región 5' no traducida (5'UTR) consiste en 341 nucleótidos con secuencias altamente conservadas entre aislados de VHC. Por otra parte la región 3' no traducida (3'UTR) contiene el poli A o poli U típico. Seguido de una secuencia única de 98 nucleótidos para proteger el ARN genómico de la degradación y ayuda en la traducción⁴⁹.

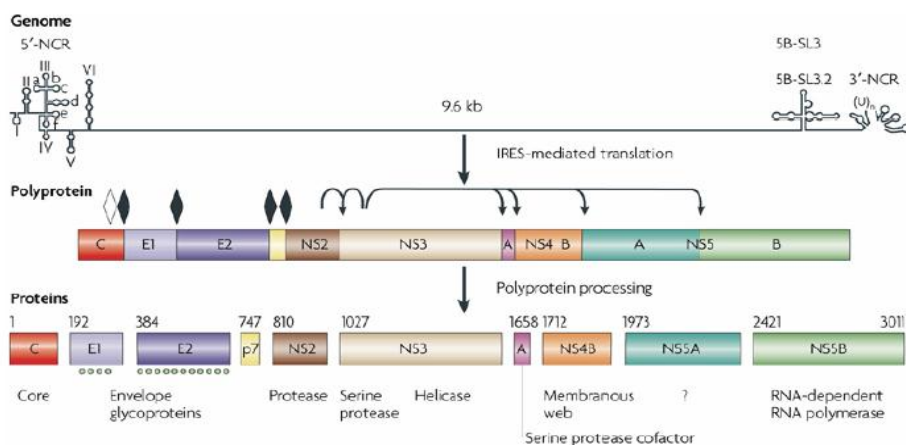


Figura 3. Organización del genoma de VHC⁴⁹

La región N-terminal de la poliproteína codifica 3 proteínas estructurales: la base, que presumiblemente forma nucleocápside viral, y 2 glicoproteínas, E1 y E2, que median la entrada viral. E1 y E2 forman heterodímeros que se conservan en el retículo endoplasmático (ER), el sitio probable de la gemación viral. Esto implica heterodimerización de residuos dentro de los anclajes de glicoproteínas cargadas⁵¹. A su vez la región E1-E2 posee una variabilidad genómica máxima, que incluye la secuencia denominada región hipervariable 1 (RHP-1). Lo que le permite al virus la persistencia al sistema inmunológico⁵².

La región C-terminal de la poliproteína codifica siete proteínas no estructurales (NS). Numerosas funciones se han descrito para las proteínas del VHC. La proteína NS2 codifica los sitios activos para la autoproteasa de cisteína NS2-3 y juega un papel esencial, pero sin definir en el ensamblaje del virus de partículas. La proteína NS3 es una proteína bifuncional que codifica un dominio de serina proteasa N-terminal; NS4A es una pequeña proteína que se une a NS3, funciona como un cofactor para la proteasa de serina y actividades helicasa de ARN. La proteína NS4B es una proteína de membrana multispinning que es importante para la organización de la maquinaria de replicación de ARN viral unida a la membrana. La NS5A es una fosfoproteína de unión al ARN y el conjunto de partículas del virus. Por último, la NS5B codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN⁵¹.

Proteína de la cápside o core (C)

La proteína del core se origina de la región amino terminal (N-terminal) del precursor proteico por la acción de las proteasas de señal de la célula huésped. Codifica las proteínas de la cápside. El antígeno del core es una proteína de 22kD y 173 aminoácidos de longitud. Juega un papel importante en la regulación del crecimiento de las células infectadas por VHC, en la apoptosis, inmunomodulación, carcinogénesis y metabolismo lipídico⁵³. La respuesta inmunológica más intensa de IgM está dirigida contra el antígeno del core y en algunos casos es el primer marcador que aparece tras la infección del virus⁵⁴.

Proteínas de la envoltura

Las proteínas se encuentran en la superficie del virión y son los principales antígenos virales que evocan respuestas inmunes protectoras. E1 y E2 son dos proteínas de envoltura del VHC. La glicoproteína E1 contiene 192 aminoácidos que van desde la posición 192 en la poliproteína hasta la 38, mientras que la glicoproteína E2 es una proteína de 363 aminoácidos que se extiende desde la posición 384 a 746 en la poliproteína^{98,99}. Entre las regiones E1 y E2 se encuentra una zona denominada hipervariable (HVR1), de unos 27 aminoácidos de longitud, región que permite al virus evadir la respuesta inmunitaria y, por tanto, favorece la aparición de infecciones persistentes y fracasos terapéuticos⁵³.

La región hipervariable (HVR2) de la glicoproteína E2 del VHC, está ubicada aproximadamente entre el aminoácido 384 y el aminoácido 414, es una región del VHC de rápida evolución, y es probable que esté bajo una selección inmune positiva. Se ha descubierto dentro de estas regiones hipervariables fracciones inmunogénicas que son el objetivo principal de las respuestas humorales, tales como anticuerpos neutralizantes^{54, 99}.

Proteína P7

P7 es una proteína de 63 aminoácidos que se localiza en el retículo endoplasmático y contiene dos dominios transmembrana (TM1 y TM2) conectados por un ciclo corto citoplásmico con los extremos amino y carboxi⁵⁵. Actúa como un canal de protones oligoméricos para reducir los gradientes de pH circundantes en las vesículas secretoras, protegiendo el virión intracelular lábil a los ácidos durante la salida^{56, 100}.

Hay evidencia de que p7 tiene diferentes funciones en la producción de VHC, incluida una contribución al ensamblaje de la progenie viral, así como a la liberación de partículas de virus de las células infectadas. Además, se han descrito interacciones de p7 con otras proteínas virales, lo que sugiere que la actividad del canal iónico de p7 y sus funciones durante la producción del virus pueden estar reguladas a través de interacciones específicas proteína-proteína⁵⁷.

Proteína NS2

La proteína no estructural 2 del VHC, es una proteína de membrana no glicosilada. Formada por un extremo N-terminal (residuos 1-94) que es altamente hidrófobo y por tres dominios transmembrana; y el C-terminal (residuos 94-217) es globular y reside en el citoplasma. Las interacciones de NS2 con las proteínas estructurales (E1 y E2) y no estructurales (p7, NS3-4A y NS5A) sugieren que la proteína NS2 podría actuar como un mediador central en el ciclo de vida del VHC mediante la atracción de la proteína viral para la replicación y ensamblaje ⁵⁸.

Proteína NS3

Es una proteína de 630 aminoácidos, cuyo extremo amino tiene actividad serin proteasa mientras que los otros dos tercios poseen actividad helicasa de ARN. La actividad proteasa es más eficiente en presencia de su cofactor no covalente NS4A. La actividad helicasa, es una de las enzimas esenciales que se requieren para el ciclo de vida de la replicación viral, ya que acoplan la unión e hidrólisis del nucleósido trifosfato a la separación de cadenas complementarias en ácidos nucleicos. Esta actividad es necesaria en casi todos los aspectos del metabolismo del ADN y el ARN, como la remodelación del ARN^{59,101}.

Proteína NS4

La proteína codificada por NS4A, está constituida por 54 aminoácidos, y forma un complejo estable con la proteína NS3, funcionando como un cofactor esencial de la proteasa NS3. La proteína codificada por NS4B, p27 de 27 kDa, es rica en residuos de aminoácidos hidrofóbicos y se ha detectado primariamente en la fracción de membrana. Su principal función es alterar las membranas intracelulares y formar una red de membranas tipo “andamio”⁵³.

Proteína NS5

La proteína NS5A, está localizada en la membrana periplasmica, y su función es interferir con el metabolismo intercelular de los lípidos y de las lipoproteínas, con efecto directo en el desarrollo de esteatosis, característico en los sujetos infectados por el VHC. También se cree que es importante en la regulación del

ciclo celular en la célula hospedadora, ya que interviene en la replicación al modular la actividad polimerasa de NS5B e interactuar con la proteína karioferina $\beta 3$, que participan en la modulación de la función nuclear y en el transporte celular⁶⁰.

Estadio de la infección

Una infección por el VHC resulta frecuentemente en inflamación hepatocelular progresiva que evoluciona a los eventos culminantes de cirrosis y cáncer hepatocelular, eventos que se resumen en la figura 4. La secuencia clásica incluye hepatitis aguda, hepatitis crónica, fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma⁶¹.

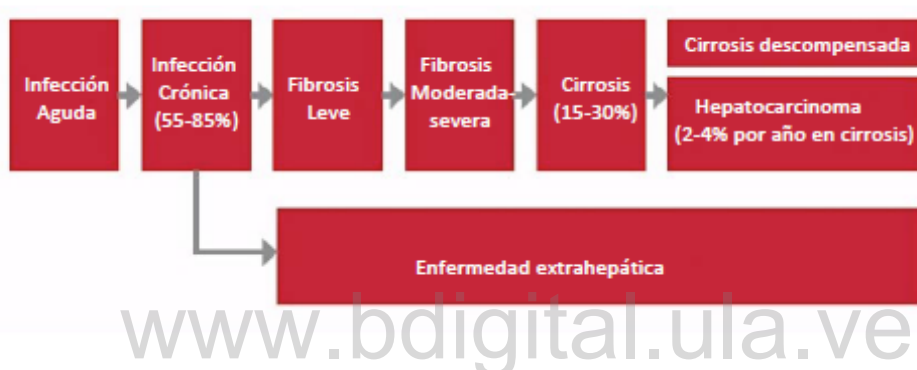


Figura 4 Esquema de la historia natural de la infección por el VHC.⁶²

Infección aguda

Solo el 20% de las infecciones por VHC, cursan con una hepatitis aguda clínicamente evidente, el 80% restante son asintomáticos, por lo que su diagnóstico temprano es difícil. En los casos de infección aguda sintomática, se presentan síntomas inespecíficos como malestar, anorexia, astenia, pérdida de peso, náuseas, artralgias, mialgias e incluso fiebre y sólo el 25% de estos casos cursan con ictericia⁶².

La enzima alanino aminotransferasa (ALT) se aumenta como resultado de la necrosis de los hepatocitos, comienza a aumentar entre 2 y 8 semanas posteriores a la exposición al virus y puede llegar a tener niveles 10 veces los normales. EL ARN del VHC se puede detectar en el suero de los pacientes entre 1 y 2 semanas después de la exposición, en tanto la aparición de anticuerpos solo comienza a hacerse evidente después de 8 a 12 semanas (periodo de ventana). En el caso de la hepatitis aguda que se resuelve, los

síntomas pueden permanecer varias semanas y comienza a desaparecer una vez los niveles de ALT y el ARN del VHC empieza a disminuir⁶³.

Infección crónica y cirrosis hepática

La mayoría de los pacientes con infección crónica son asintomáticos o solo presenta síntomas leves o inespecíficos⁶⁴. El síntoma más frecuente es la fatiga; otras manifestaciones menos comunes incluyen náuseas, anorexia, mialgias, artralgias, debilidad y pérdida de peso. Los síntomas rara vez son incapacitantes y puede ser difíciles de atribuir a enfermedad hepática solamente y no a otras enfermedades como la depresión. Estos síntomas pueden ocasionar una disminución en la calidad de vida. Algunos pacientes infectados pueden desarrollar la enfermedad hepática severa después de pocos años, pero la mayoría desarrollan luego de varias décadas; sin embargo, prácticamente todos los individuos infectados presentan anormalidades histológicas^{63, 65,66}.

Son múltiples las manifestaciones extrahepáticas que se presentan y se han relacionado en la infección crónica: crioglobulinemia mixta, trastornos linfoproliferativos como el linfoma de Hodgkin, porfiria hepatocutánea tarda, liquen plano, daño renal como glomerulonefritis; diabetes mellitus tipo 2 o síndrome de resistencia a la insulina; síndrome de Sjögren, cuadros de artritis reumatoide o la producción de autoanticuerpos⁶⁷.

Hepatocarcinoma

Es una complicación tardía de la hepatitis C crónica, que usualmente se presenta después de 2 o 3 décadas de infección persistente y en paciente con cirrosis previa. Los síntomas como fatiga, ascitis, ictericia y dolor en hipocondrio derecho aumentan su severidad, y comienzan a aparecer niveles aumentados de alfa-fetoproteína sérica⁶³.

Evaluación virológica y serológica

Las pruebas para la determinación de marcadores en el diagnóstico y seguimiento de la infección por el VHC han logrado un gran desarrollo y optimización desde sus inicios, las mejoras están desde la fuente y purificación

de las proteínas antigénicas empleadas hasta los anticuerpos y principios técnicos en que se fundamenten las pruebas⁶⁸.

En un primer contacto con el virus surgen los síntomas asociados y se producen antígenos y anticuerpos únicos, que hacen posible el diagnóstico de la infección y posible pronóstico. El diagnóstico de laboratorio mediante la detección y cuantificación a partir de suero o plasma, de los marcadores serológicos y virológicos, que incluyen antígenos, anticuerpos y ADN viral a través de pruebas serológicas convencionales como el inmunoensayo, métodos moleculares como PCR. Se han convertido en herramientas indispensables para el buen entendimiento de la patología, así como también permite clasificar a los pacientes en los diferentes estadios de la infección desde la fase aguda hasta convertirse en enfermedad crónica, que incluye cirrosis y hepatocarcinoma^{69,70}.

El VHC durante el ciclo de replicación sintetiza las diferentes proteínas estructurales (core o nucleocápside y envoltura) y no estructurales (NS) que poseen diversas funciones, frente a las cuales se desarrollan anticuerpos específicos. De todos ellos, los anticuerpos contra la proteína core y NS3, son los que se detectan en la fase más temprana durante la primoinfección aguda por VHC. Aun así, hay un periodo de ventana serológica, cuya duración se estima entre 4 y 12 semanas, etapa donde no se detecta la presencia de anticuerpos con el VHC⁷¹.

Una vez desarrollados los anticuerpos frente al VHC estos permanecen detectables mientras dure la infección viral, ya sea aguda autolimitada o evolucione a la cronicidad. Sin embargo, hay situaciones en la que las Pruebas Enzimoinmunoensayo (EIA) comerciales de diagnóstico no son capaces de detectar la presencia de anti-VHC porque: a) No se desarrollan anticuerpos anti-VHC; b) la seroconversión a anti-VHC es muy tardía o transitoria, pues excepcionalmente se pierde el anti-VHC, es decir se produce serorreversión y c) los títulos de anti-VHC que se producen son muy bajos⁷¹.

Los ensayos de primera generación, que incorporaron el epítipo recombinante c100-3 de la región NS4, se usaron hasta 1992, cuando fueron reemplazados por ensayos de segunda generación, que adicionalmente incorporaron epítipos

c22-3 y c33c del núcleo del VHC y las regiones NS3, respectivamente. Los ensayos de tercera generación contenían antígenos núcleo y NS3 reconfigurados y, además, un antígeno recién incorporado de la región NS5. Se ha documentado que el período de ventana disminuyó de aproximadamente 16 semanas a 10 semanas y finalmente a 8 semanas con la introducción de ELISA anti-VHC de primera, segunda y tercera generación, respectivamente⁷²⁻⁷⁴.

La última generación de ELISA, es decir, la cuarta generación, es aquella que detecta simultáneamente el antígeno de la cápside del VHC así como los anticuerpos contra las regiones NS3, NS4 y NS5 del virus. Con estos ensayos se reduce el periodo de ventana de detección del VHC en 17 días en comparación a los ensayos ya existente. Pero los estudios que apoyan la inclusión de estos ensayos de 4ta generación sobre la base de sensibilidad y especificidad mejorada son limitados^{75, 76}.

JUSTIFICACIÓN

El virus de la hepatitis C presenta una elevada variabilidad genética, siendo descritos seis genotipos distintos, subgenotipos cepas y quiasiespecies; lo que determina su distribución entre la población mundial y su resistencia al tratamiento antiviral específico. Una de las características más importante de esta infección por el VHC es que las formas agudas de la enfermedad por lo general son asintomáticas, pudiendo pasar hasta veinte años sin que exprese sus efectos patológicos, lo cual hacen difícil la identificación de aquellas personas infectadas con riesgo de contraer una enfermedad grave por VHC⁷⁷. En Venezuela, en la actualidad hay un grave problema con la adquisición de pruebas diagnósticas de VHC. Es por ello, que es necesario tomar medidas para encontrar un modo de detección temprana de la infección con pruebas diagnósticas nacionales, evitando así el contagio a las personas sanas, que por ejemplo ameriten ser tranfundidos.

Aunado a esto, se hace necesario incluir proteínas recombinantes E2 y NS2 con capacidad inmunogénica, con el fin de evaluar su utilidad para la detección de la infección por el VHC y de esta manera contribuir con una mejora de la calidad del diagnóstico, aun incluso en ausencia de manifestaciones clínicas durante la etapa temprana de la infección por el VHC. Es importante resaltar,

que producción y obtención de proteínas recombinantes forman parte de los métodos moleculares que poseen una alta tasa de replicación, lo que permiten obtener en poco tiempo muchas copias de un gen que codifica para una proteína heteróloga ⁷⁸, haciendo esta herramienta más sensibles y relativamente más económicas para su aplicación en la construcción de métodos serológicos altamente sensibles y específicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Hepatitis C es una enfermedad que afecta a millones de personas alrededor del mundo, su eficaz diagnóstico a través de la detección de anticuerpos contra el virus, ayuda de manera significativa a evitar posibles complicaciones de la enfermedad, mediante el diagnóstico oportuno e intervención terapéutica acertada. A pesar de que recientes estudios han asociado la presencia de las proteínas E2 y NS2 con la patogenia de la enfermedad y con la aparición de anticuerpos neutralizantes, no se ha dilucidado su papel en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la infección. Es por ello que mediante la utilización de proteínas recombinantes, expresadas en *Escherichia coli*, como una de las herramientas de producción más utilizadas, rápidas, económicas y simples de aplicación, nos planteamos la obtención de las proteínas E2 y NS2 para evaluar la presencia de los anticuerpos contra estas proteínas en los pacientes infectados crónicos y de esta manera determinar su utilidad en el diagnóstico de la infección por VHC.

HIPOTESIS

Los pacientes infectados por el virus de la hepatitis C, desarrollan anticuerpos contra las proteínas E2 y NS2, su caracterización pudiera tener relevancia en el mejoramiento de las herramientas diagnósticas para la detección de la infección por este virus y en el seguimiento de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la utilidad de las proteínas recombinantes E2 y NS2 en la detección de la infección por el virus de la Hepatitis C, en pacientes infectados crónicos del

Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de Los Andes en el estado Mérida entre febrero de 2017 hasta junio 2018.

Objetivos específicos

- ✓ Expresar las proteínas E2 y NS2 en el sistema de *Escherichia coli*.
- ✓ Comprobar el aporte de las proteínas E2 y NS2 para la detección y diagnóstico del Virus de la Hepatitis C.
- ✓ Evaluar la sensibilidad y especificidad del ELISA diseñado con proteínas recombinantes pertenecientes al Virus de la Hepatitis C
- ✓ Correlacionar las densidades óptica ELISA diseñado con E2 y NS2 con las densidades óptica de la prueba casera diseñada en el Idic-ULA
- ✓ Correlacionar los niveles de anticuerpo anti-E2 y anti-NS2 con la carga viral de los pacientes infectados crónicos

www.bdigital.ula.ve

MATERIALES Y METODOS

Selección de los pacientes

El grupo de estudio estuvo representado por 12 pacientes seropositivos, caracterizados mediante carga viral y evaluación serológica mediante el uso del estuche casero del IDIC y 4 controles seronegativos. Las muestras de suero fueron obtenidas previo consentimiento informado y siguiendo las normas de la comisión ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, de los pacientes que asistieron al Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de Los Andes (IDIC-ULA) en Mérida desde febrero de 2017 hasta junio de 2018. Fueron clasificadas según el estatus serológico de las mismas.

Transformación de Células Competentes

Las bacterias *E. coli* M15 competentes, se transformaron mediante choque térmico, como se indica en el protocolo descrito por Sambrook y Russell en 2001. Para la transformación de esta cepa M15 con los plásmidos recombinantes pQE31-E2-HVC y pQE-30-NS2-HVC, fueron incubadas con 5µl del plásmido durante 30 min en hielo, por consiguiente se sometieron a una temperatura de 42°C a baño maría durante 1 min, e inmediatamente se colocaron en hielo. Por último se le añadió 1 ml del Medio Luria-Bertani (LB) frío, previo a ser transferidas a 37°C e incubadas por 1 h, de esta manera se permitirá a las bacterias que adquieran el gen de resistencia al antibiótico Ampicilina. Una vez transcurrido el tiempo, se tomó un inóculo de 200 µl para ser inoculado en el medio LB, el cual contiene Cloruro de sodio 5.0%, Extracto de levadura 5.0%, Peptona de caseína 10.0% pH 7.2; más kanamicina (25 µg/ml), y Ampicilina (50 µg/ml), y se dejó crecer toda la noche a 37°C con agitación (140rpm). Por último, del cultivo bacteriano se obtuvo alícuotas con glicerol al 20% para su almacenamiento a -80°C, hasta su posterior uso.

Expansión de las cepas de *Escherichia coli* transformadas

Para su expansión se tomó una alícuota congelada de las cepa *E. coli* M15, la cuales poseen las proteínas de interés clonadas en los vectores pQE-30-NS2VHC y pQE-31-E2VHC. Se inoculo a 50 ml del Medio LB líquido con Ampicilina (50µg/ml) y Kanamicina (25µg/ml) a 37°C con agitación durante toda

la noche. Transcurrido este tiempo, para sobre expresar las proteínas de interés, las cepas fueron sembradas en 3 litros del Medio LB, más glucosa (0,1%), magnesio (1mM) y Ampicilina (50µg/ml) en incubación a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de ~ 0.6 a 600nm. Una vez llegado a la densidad deseada se agregó isopropil-β-D- tiogalactósido (IPTG 0,1mM) y se dejará por 3 horas para inducir la síntesis de proteínas.

Una vez concluido el tiempo de la síntesis de proteína, las células fueron centrifugadas a 5000 rpm por 30 min para la obtención del pellet, el cual se congelará durante toda la noche.

El pellet se resuspendió en buffer de lisis (1% de Tritón X- 100, 50 mM de Tris pH 8, 150mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 1 mM de DTT y 1µg/ml de Leupeptina, 1 µg/ml de Aprotinina y 500 µg/ml de Lisozima) durante 20 min en frío. Seguidamente al homogenato celular se aplicó lisis mecánica mediante sonicación en frío (cinco pulsos de 30 seg a intensidad 7, con intervalos de 30 seg). Luego se trató con urea (4M) como agente solubilizante y se disgregó en un homogenizador para su posterior purificación por cromatografía de afinidad.

Purificación por Cromatografía de afinidad

Para la purificación de las proteínas E2 y NS2, se utilizó la matriz IMAC de BioRad. Este proceso se llevó a cabo debido a la presencia 6 residuos de histidina ubicados en el extremo C-terminal en las proteínas de interés, que favoreció el proceso de purificación de las mismas, de modo que la cola de poli-histidina se unió de forma específica a la columna, la cual fue empacada y equilibrada con buffer de unión (250mM de Tris, 150mM de NaCl y 100 mM de Imidazol), seguidamente se trató con sulfato de níquel NiSO₂ (100mM). Luego de que todo el homogenato se aplicó a la columna, se emplearon varios lavados, y se midió por espectrofotometría a 280nm, la densidad óptica hasta ser menor a 0,05. Seguido a esto, la proteína unida se eluyó con una solución de EDTA (100mM), de esta manera se colectaron las fracciones con mayor contenido proteico, que además fueron comprobadas para la pureza mediante electroforesis en gel.

Electroforesis en gel

Se sometieron a la corrida electroforética muestras provenientes de las alícuotas del cultivo LB pre y post inducción del sobrenadante producto de la centrifugación del cultivo del pellet bacteriano y de las fracciones eluídas de la columna. Se diluyeron a partes iguales con el buffer de muestra (BM 2x: 100mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 20mM DTT, 20% glicerol, 0,05% de azul de bromofenol), las cuales se hirvieron durante 5 minutos, y seguidamente se sometieron a electroforesis en un gel discontinuo de poliacrilamida al 10%. Al comenzar la corrida electroforética se aplicó 70V hasta atravesar el gen concentrador, luego se aumentó el voltaje a 100V para la corrida en el gen separador. Al finalizar la corrida el gel se colocó durante 20 minutos con azul de Coomassie y posteriormente se decoloró. Después de la visualización de las bandas, se seleccionó las fracciones con las proteínas de interés, que se unieron en un pool que fue sometido a diálisis durante 48 horas en frío con tres cambios de agua miliQ y dos cambios con tampón Tris 25mM, con el fin de eliminar el contenido de urea, EDTA e Imidazol. El producto de la diálisis fue posteriormente liofilizado por 24h y resuspendido en 1ml de agua destilada para determinar la concentración de la misma por espectrofotometría, utilizando como referencia el coeficiente de extinción molar de la proteína.

Diseño de ELISA VHC con proteínas recombinante E2/NS2 del VHC

Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100µl por pozo de una suspensión de cada una de las proteínas por separado y una línea con una mezcla en igual proporción, durante un período de 2h a temperatura ambiente (Buffer carbonato 50mM, pH 9.6), luego se incubaron con PBS-BSA al 2% durante toda la noche a 4°C. Posterior al bloqueo se realizó una incubación con diferentes diluciones (1:20 o 1:200) de sueros, permitiéndoles reaccionar por periodo de 2 h a temperatura ambiente, seguido por cinco lavados con Tween (0.5%). Para la detección de anticuerpos se utilizó la Proteína G de *Streptococcus* sp, conjugado a peroxidasa de Rábano Picante (HRP), se diluyó 1:2500 en PBS-BSA al 2% y se aplicó a los pocillos, permitiendo la reacción por 1 h. subsiguiente a la realización de cinco lavados con PBS, se añadió al sistema la

solución contentiva del sustrato de peroxidasa, H₂O₂ y tetrametilbenzidina (TMB) como cromógeno (Buffer citrato 10mM, pH 5.5). La reacción se detuvo con la adición de ácido sulfúrico 1N. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro empleando una longitud de onda de 450 nm y con el filtro de referencia de 630 nm.

Cuantificación de la carga viral mediante PCR en tiempo real

Las muestras de suero de los pacientes usadas para el estudio estuvieron almacenadas en -80 ° C, la separación de las muestras se realizaron siguiendo unas medidas estrictas con el fin de obtener el genoma del VHC puro sin contaminantes. Para la extracción de ARN del VHC, se usó el método de columnas del estuche DNA/ARN viral Extraction Mini Kit (Favorgen, Korea) a partir de 200 µL de suero siguiendo los parámetros de la casa comercial; los sueros fueron tratados con detergentes y posteriormente se sirvieron en columnas de sílica, con el objetivo de eliminar el material no adherido a la columna las muestras se centrifugaron y lavaron dos veces, por último el ADN fue eluido de la columna y utilizado para la PCR en tiempo real. La amplificación en tiempo real se llevó a cabo en un sistema detector de fluorescencia en tiempo real de cuatro colores Chromo4™ (BioRad), y una mezcla (MasterMix) que contiene los componentes de la reacción del RT-PCR incluyendo el (EUROGENTEC, San Diego California USA). En paralelo se utilizó un estándar de concentración conocida (ACURRUN 325, BBI Diagnostic, Boston USA) y se estableció una curva de regresión lineal y se obtuvo la concentración en copias/ml (Opticon3, Inc). Posterior a la paso de RT llevado a cabo a 40⁰C durante 10 min, se realizó una pre-incubación a 95⁰C durante 10 min a fin de activar la HotStarTaq DNA polymerase, seguido de 40 ciclos que incluyeron desnaturalización (94 °C, 15s), empalme (60°C, 20 s) y extensión (72 °C, 25 s). Al finalizar la amplificación se llevó a cabo la curva de fusión que incluyó calentamiento de 72°C a 95°C y lecturas cada 0,2 °C a fin de discriminar las señales de fluorescencia inespecífica.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico, así como los de correlación lineal y los gráficos se realizaron con los programas SPSS versión 22 (IBM Corporation, New York, Us) Excel 213 (Microsoft Corporation, Redmond, US) y y Graph Pad Prism versión5 & Quickcalcs (Graph Pad Software Inc, La Jolla, USA). La valoración diagnóstica del ensayo inmunoenzimático, se realizó determinando los parámetros de validez y seguridad para pruebas diagnósticas como lo son sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y valores predictivos negativos; estos parámetros se determinaron estableciendo previamente un punto de corte obtenido a partir de la evaluación de las curvas operador-receptor (ROC). Lo que permitió validar estadísticamente la capacidad diagnóstica para la detección de los anticuerpos patógeno-específicos en la pesquisa de hepatitis C. Se determinó el punto de corte con el índice de Youden bajo la fórmula $IY = sensibilidad + especificidad - 1$ y se tomó el valor más cercano a 1; se clasificó los resultados obtenidos con el inmunoensayo para cada una de las muestras según el índice de Youden en positivo y negativo. El análisis de correlación (regresión lineal) se realizó determinando los coeficientes de correlación (R2) y su significancia estadística asociada (valor de p). Las diferencia entre los datos cuantitativos se evaluación la prueba de ANOVA, la significancia estadística se consideró para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Obtención y purificación de las proteínas E2 y NS2 del VHC

Desde que se inició el uso y la implementación de las proteínas recombinantes en especial aquellas provenientes de agentes infecciosos, se han incrementado los avances en los estudios de sus funciones y participación en el desarrollo de importantes enfermedades, de esta manera y a través de múltiples ensayos *in vitro* se ha logrado determinar en parte que las proteínas E2/NS2 juegan un papel fundamental en la estructura, variabilidad, replicación e inmunopatogenia del VHC. Por esta razón, se decidió obtener la proteína pura empleando la obtención y purificación por medio de la síntesis de proteínas E2/NS2 recombinantes, utilizando *E. coli* como sistema de expresión debido a su facilidad de manipulación genética, la sencillez y la gran versatilidad por su capacidad de producir una apropiada cantidad de proteína. Seguido de la purificación de las proteínas, que se llevó a cabo, a través de una columna cromatográfica de afinidad al níquel mediado por los residuos de 6-histidina incluidos en las proteínas recombinantes.

La elución de la proteína de la columna se realizó mediante el uso de una solución de EDTA 100Mm a pH 4. Como resultado se obtuvieron 8 fracciones de 3ml cada una, para luego analizarlas en gel de electroforesis. La corrida electroforética de la proteína E2 se muestra en la figura 5, y se evidencia que la mayor cantidad de proteínas después de la elusión se recolecto en las fracciones de la 1 a la 5, sustentado además por las absorbancias obtenidas en estas fracciones (ver figura 6). Así mismo, en la figura 7 se puede destacar la obtención pura de la proteína NS2, ubicada en las fracciones de la 1 a la 7, validada por las absorbancias post-elución de cada una de las fracciones mostradas en la figura 8.

Las muestras 2-6 fueron agrupadas para el proceso de diálisis y posterior liofilización, en la figura 9 se evidencia la corrida única en gel de electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie realizadas con las fracciones obtenidas luego de la diálisis y liofilización realizada para comprobar la identidad de la proteína.

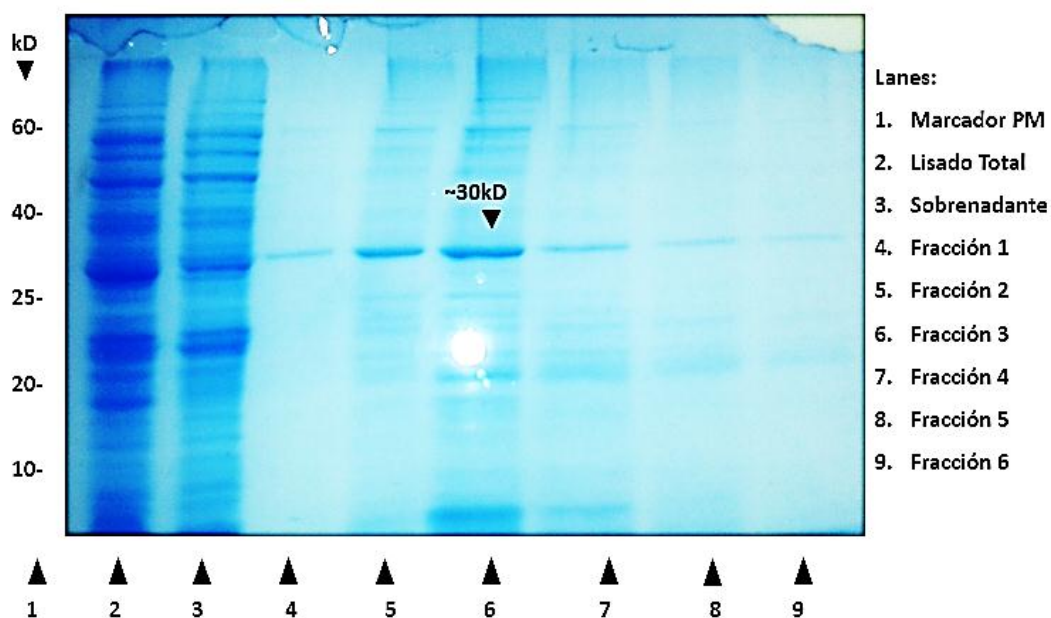


Figura 5 Corrida electroforética de las fracciones colectadas luego de la elución y el lisado total post inducción. Se indica el patrón de peso molecular y la flecha señala la proteína purificada. Los números 4-8 indican las fracciones obtenidas posteriores a la elución de la Proteína E2

www.bdigital.ula.ve

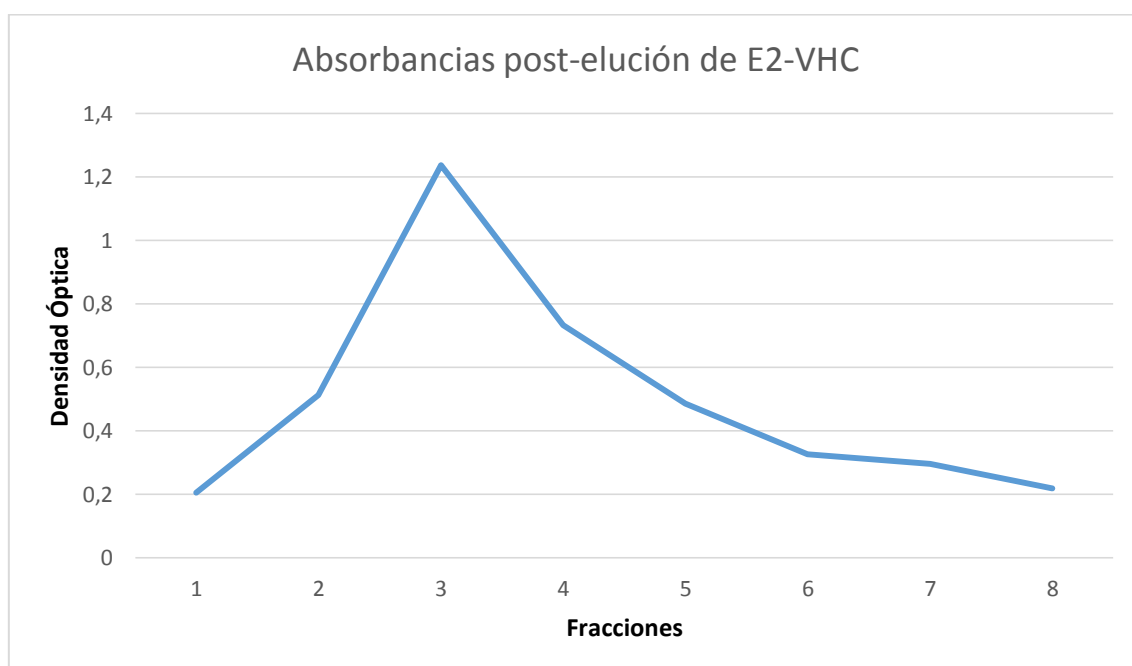


Figura 6 Densidades ópticas de las fracciones proteicas obtenidas durante el proceso de purificación.

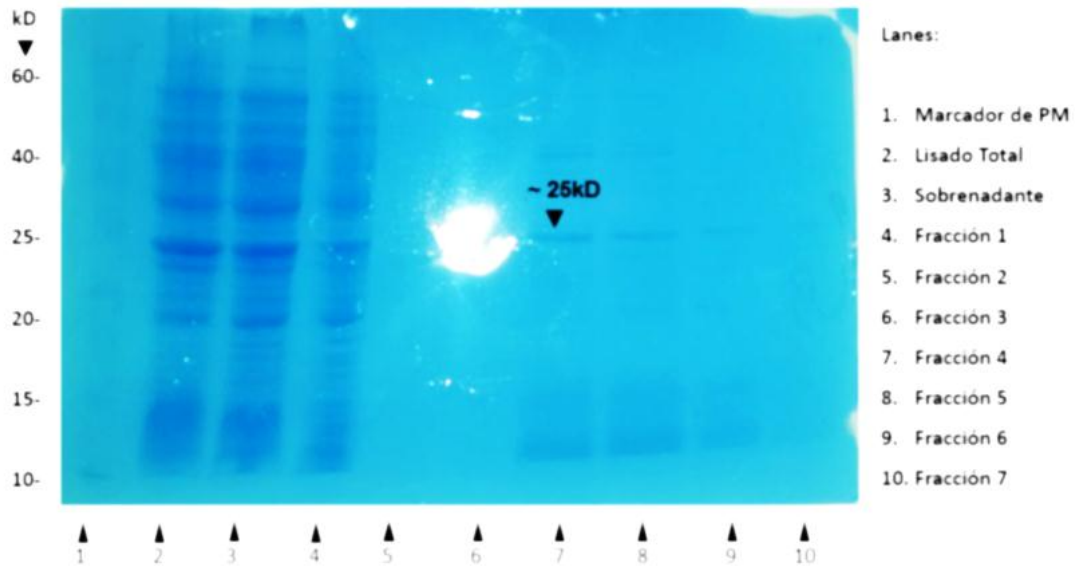


Figura 7 Corrida electroforética de las fracciones colectadas luego de la elución y el lisado total post inducción. Se indica el patrón de peso molecular y la flecha señala la proteína purificada. Los números 4-10 indican las 7 fracciones obtenidas posteriores a la elución de la Proteína NS2

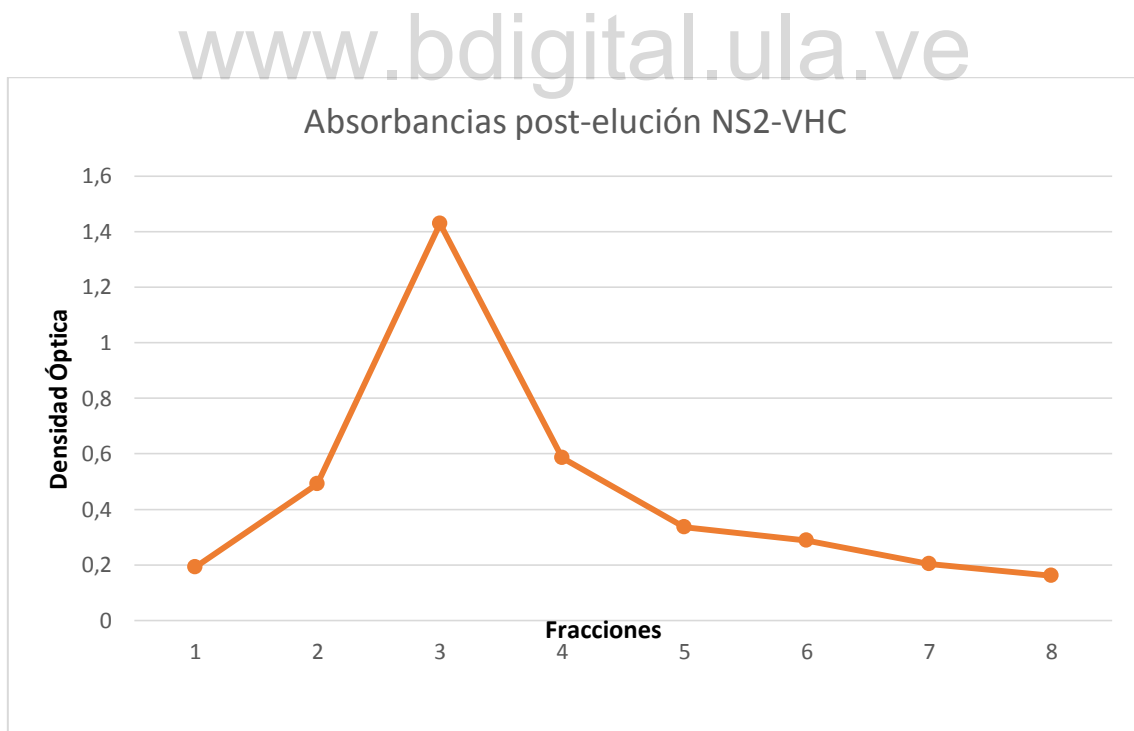


Figura 8 Densidades ópticas de las fracciones proteicas obtenidas durante el proceso de purificación

La caracterización físico-químicas de la proteína E2 se constata en la tabla 1 y comparando el coeficiente de extinción molar 1.mg/ml correspondiente a una densidad óptica de 2.381 a 280 nm; se dedujo que la cantidad de proteína purificada fue 1.322mg/dl debido que obtuvimos una densidad óptica de 1,8.

De igual forma, NS2 caracterizada por tener un peso molecular de 25kD y ser de una proteína de 229 aminoácidos, según el coeficiente de extinción molar 1mg/ml perteneciente a una densidad óptica de 2.191 a 280nm (ver tabla 2); pudimos cuantificar la cantidad de proteína purificada fue de 2.191mg/dl .

Tabla 1 Propiedades físico-químicas del E2-VHC

Características		Secuencia
Peso molecular	30kDa	Aethvtggsagrntaglvglitpg akqniqlintngswhinstalnc
Número de residuos	279	neslntgwlaglflyqhkfnssg
Carga	7,0	cperlascrrltdfaqgwgpis
Punto isoelectrico	7,9028	angsglderpycwhypprpc givpaksvcpvycfppsvvvt
Coeficiente de extinción molar (A280)	72880	tdrsgaptyswgandtdvfvln ntrpplgnwfgctwmnstgftk vcgappcviggvgnntllcptd
Coeficiente de extinción molar (A280) 1 mg/ml =	2.381	cfrkhpeatysrcsggpwitpr cmvdypyrllwhypctinytifkv
Improbabilidad de ubicarse en los cuerpos de inclusión	0,956	rmyvggverleaacnwtgrger cdledrdsels

Tabla 2 Propiedades físico-químicas del NS2-VHC

Características		Secuencia
Peso molecular	25 kDa	Mrgshhhhhhgsldevaas cgvvvlvglmaltlspyykryi swclwwlqyfltrveaqlhvww pplnirggrdavillmcavhptlv fditklllavfgplwllqasllkvpv fvrvgllricalvqkmagghyv qmviirigaltgyiynhltpldw ahnglrdlavavepvifsrmet klvtwgadtaacgdiinglpsar rgreillgpadmvsgrll
Número de residuos	229	
Carga	13,5	
Punto isoeléctrico	9.6325	
Coefficiente de extinción molar (A280)	55920	
Coefficiente de extinción molar (A280) 1mg/ml =	2.191	
Improbabilidad de ubicarse en los cuerpos de inclusión	0,751	

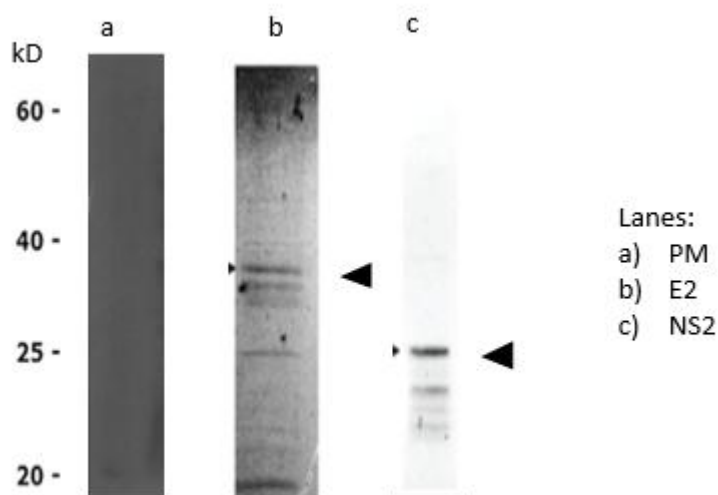


Figura 9. Corrida electroforéticas y tinción con azul de coomasie de las proteínas E2 (b) y NS2(c). Posterior a la diálisis y liofilización, patrón de peso molecular y la flecha de la derecha indican las proteínas puras.

Cuantificación de la carga viral

La cuantificación de la carga viral a las 16 muestras seleccionadas se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real, obteniendo la concentración en copias/ml (ver figura 10).



Figura 10 Promedio e intervalos de confianza de las cargas virales cuantificadas en pacientes y controles

Valoración diagnóstica del ensayo inmunoenzimático

Una vez realizado el ensayo inmunoenzimático se procedió a determinar la validez diagnóstica de las proteínas E2/NS2 en pacientes infectados crónicos por VHC y en pacientes sanos, en comparación con la prueba casera, en la figura 11a y 11b se muestran los valores de densidades ópticas de cada muestra implementada (11a E2 y 11b NS2). Teniendo en cuenta los valores y de los dos grupos de individuos evaluados, se elaboró la curva de operador receptor (ROC) para cada proteína. En la figura 12, muestra el comportamiento de la proteína E2, en este caso el área bajo la curva fue de 0,957, indicativo de que el ensayo puede diagnosticar a los individuos correctamente en un 95% de los casos, además mediante las coordenadas de la curva ROC se pudo determinar que el punto de corte para E2, es de 0,256, mediante la aplicación del índice de Youden.

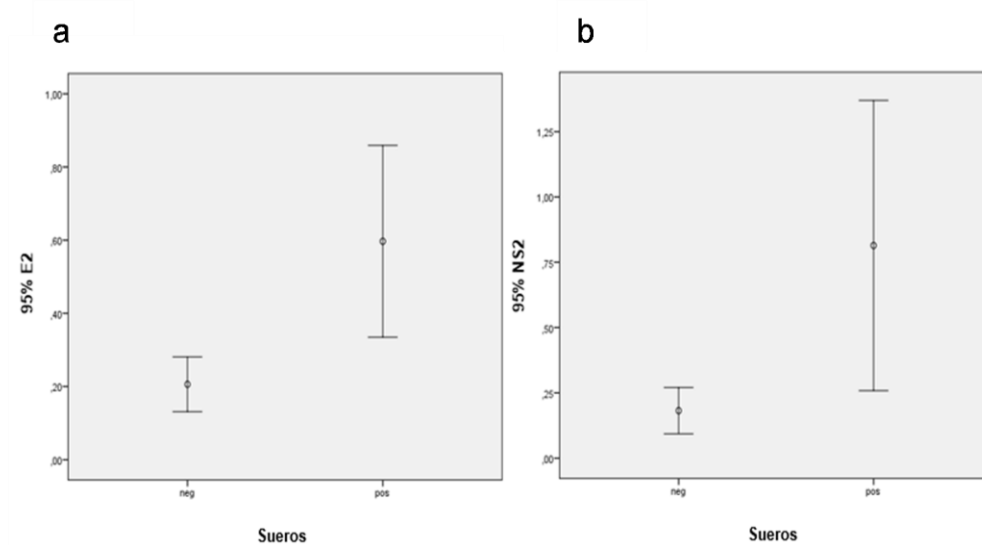


Figura 12 Valores de absorbancia de los individuos evaluados mediante el ensayo inmunoenzimático con las proteínas E2 (2a) y NS2 (2b).

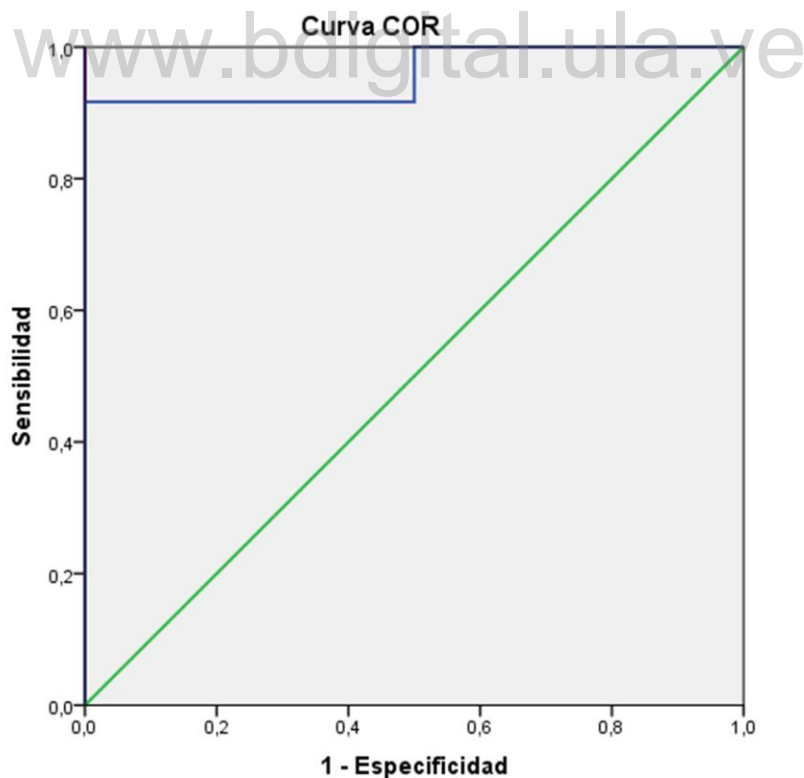


Figura 11 Curva operador-receptor (ROC) para la detección de pacientes infectados crónicos mediante el ensayo inmunoenzimático con proteína E2-VHC. Área bajo la curva: 0,956

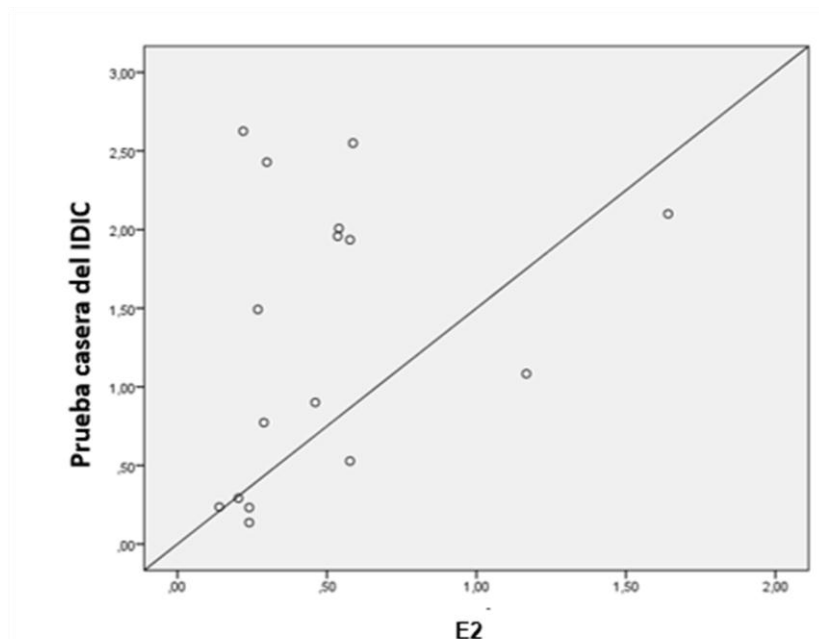


Figura 13 Análisis de correlación entre las absorbancias de la proteína E2 y las absorbancias de la prueba casera diseñada en el IDIC. Valor de P = 0,243

www.bdigital.ula.ve

Del mismo modo en la figura 13, para la proteína NS2, se determinó el área bajo la curva de 0,856, lo que indica que el ensayo puede diagnosticar a los individuos correctamente en un 85% de los casos, también gracias a las coordenadas de la curva ROC se pudo determinar un punto de corte de 0,240 a través de índice de Youden.

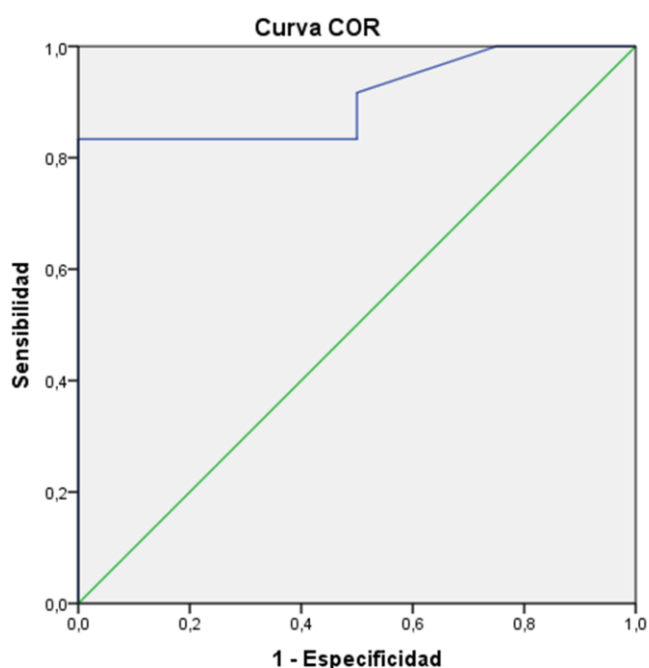


Figura 14 Curva operador-receptor (ROC) para la detección de pacientes infectados crónicos mediante el ensayo inmunoenzimático con proteína NS2-VHC. Área bajo la curva: 0,806

www.bdigital.ula.ve

Seguidamente se determinó la existencia de correlaciones entre los valores de absorbancia de E2 y NS2, con la carga viral y con el de las pruebas caseras. En la figura 14 se evidencia la comparación entre las absorbancias de la proteína E2 con las absorbancias de la prueba casera diseñada en el IDIC. La aplicación del ANOVA, nos indica que no existe correlación ($p = 0,243$), comportamiento similar fue evidenciado con NS2 ($p = 0,617$), ver figura 15. Es decir que los valores individuales de cada una de las proteínas, no se correlacionan con la sumatoria de las proteínas utilizadas en el kit casero

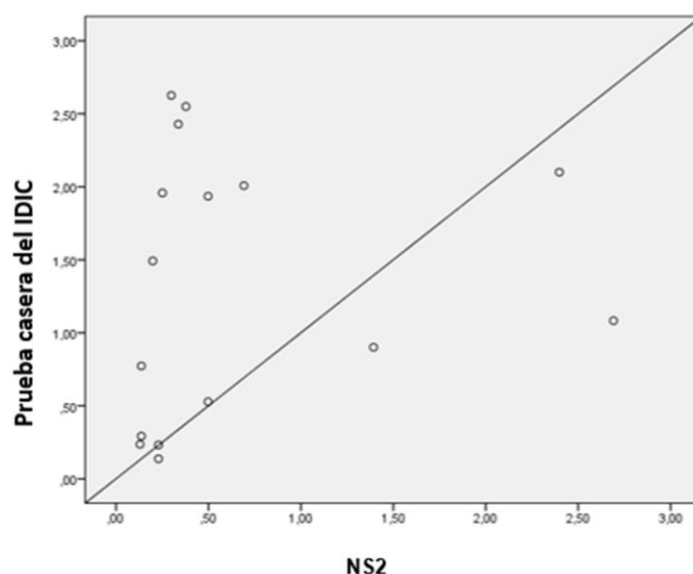


Figura 15 Análisis de correlación entre las absorbancias de la Proteína NS2 y las absorbancias de la prueba casera diseñada en el IDIC. Valor de P = 0,617

El análisis de correlación entre las densidades óptica del anti-E2 con la carga viral, reflejó un coeficiente de correlación de Pearson de 0,476 y un valor de p de 0,063. (Ver figura 16), que a pesar de no ser significativo, posiblemente por el bajo número de pacientes estudiados, pudiera indicar una tendencia entre los niveles de anticuerpos contra la proteína de envoltura 2 y el nivel de replicación viral. El caso de NS2, se muestra en la figura 17, donde se observa la relación de las densidades ópticas del inmunoensayo del anti-NS2 con las cargas virales de los pacientes. En este caso la R fue 0,535 y el valor de la p fue de 0,03.

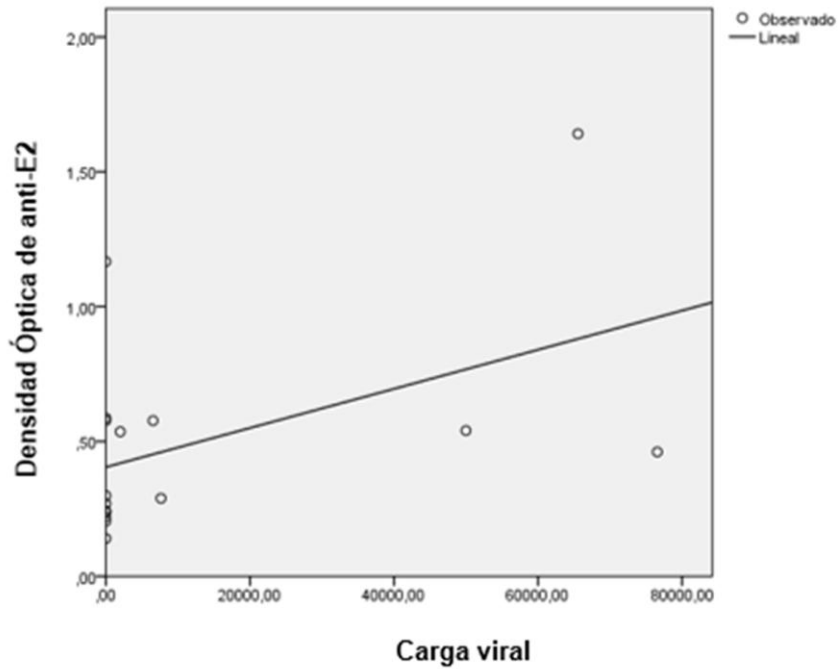


Figura 16 Análisis de correlación entre las absorbancias de la Proteína Ns2 y CV. Valor de $p = 0,063$

www.bdigital.ula.ve

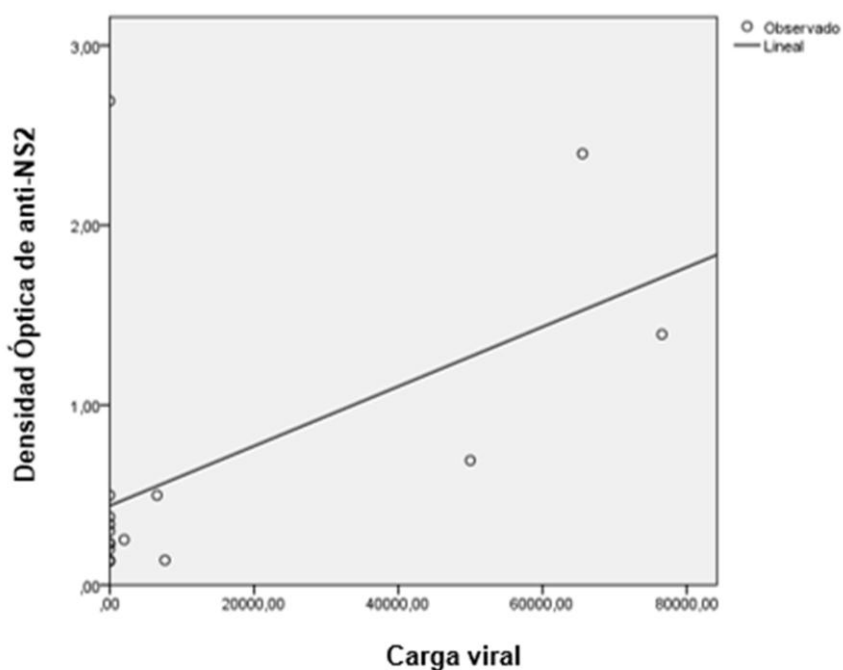


Figura 17 Análisis de correlación entre las absorbancias de la Proteína NS2 y CV. Valor de $p = 0,033$

www.bdigital.ula.ve

Por último, en la Tabla 3 se refleja la correlación de las proteínas E2 y NS2 con la Prueba Casera contra VHC, con la Carga Viral y la correlación entre sí, destacando una correlación entre las proteínas con $R: 0,885$ y $p: 0.000$. Lo cual evidencia una significancia estadística importante entre nuestras proteínas.

Tabla 3. Correlaciones de las Proteínas E2 y NS2

		E2	NS2	CV	Absor Prueba casera
E2	Correlación de Pearson	1	,885	,476	,443
	Sig. (bilateral)		,000	,063	,086
	Suma de cuadrados y productos vectoriales	2,340	4,198	72929,698	1,173
	Covarianza	,156	,280	4861,980	,078
	N	16	16	16	16
NS2	Correlación de Pearson	,885	1	,535	,353
	Sig. (bilateral)	,000		,033	,180
	Suma de cuadrados y productos vectoriales	4,198	9,628	166552,268	1,898
	Covarianza	,280	,642	11103,485	,127
	N	16	16	16	16
CV	Correlación de Pearson	,476	,535	1	,300
	Sig. (bilateral)	,063	,033		,259

	Suma de cuadrados y productos vectoriales	72929,698	166552,268	10050105995,000	52077,000
	Covarianza	4861,980	11103,485	670007066,333	3471,800
	N	16	16	16	16
Absorbancia	Correlación de Pearson	,443	,353	,300	1
Prueba casera	Sig. (bilateral)	,086	,180	,259	
	Suma de cuadrados y productos vectoriales	1,173	1,898	52077,000	32,016
	Covarianza	,078	,127	3471,800	,250
	N	16	16	16	129

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas).

www.bdigital.ula.ve

DISCUSIÓN

En este trabajo se lograron obtener las proteínas recombinantes E2 y NS2 del VHC totalmente puras con propiedades antigénicas intactas para así determinar su utilidad en pruebas diagnósticas como el inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) en pacientes infectados crónicos. Luego de evaluar cada proteína por separado utilizando las curvas operador-receptor (ROC), se evidencio que las proteínas tienen alta especificidad (100%), sin embargo, por si solas tienen una sensibilidad inferior al 92%, por lo que no todos los individuos seronegativos a E2 o a NS2, indican que están sanos, de hecho no conseguimos correlación entre las absorbancias de la prueba casera de realizada en IDIC con estas proteínas E2/NS2 individualmente, pero si con los niveles de carga viral, lo que pudiera sugerir su asociación con actividad replicativa del virus, bien sea como mecanismos de respuesta del hospedador para evitar la entrada del virus a su células blanco o como parte de los mecanismos de inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para eliminar células infectadas.

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus hepatotrópico de ARN de una sola hebra, pequeño y envuelto, de la familia *Flaviviridae*, transmitido por vía parenteral que a menudo causa una infección crónica, que puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular^{79,80}. Su genoma viral de 9,6 kb de largo está flanqueado por 2 regiones no traducidas en sus extremos 5' y 3' y contiene un único marco de lectura abierto que codifica una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. Las proteínas estructurales, que forman la partícula viral, incluyen la proteína del núcleo y las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2. Las proteínas no estructurales incluyen las proteínas p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B⁸¹.

E2 es una glicoproteína que muestra grandes variaciones entre los genotipos del VHC y contiene una secuencia de 27 aminoácidos en su término amino, que es altamente variable y se designa como la región hipervariable 1 o HVR1.^{82,83} Pero a su vez posee regiones conservadas esenciales para facilitar las interacciones con los receptores de la célula huésped durante la entrada del virus.⁸⁴⁻⁸⁷ Se ha informado que la interacción de E2 con CD81 en células B o T

produce una agregación de células B. Adicionalmente, estas regiones son unos de los principales objetivos de los anticuerpos neutralizantes (bNAbs) ^{85,88}. Y se ha demostrado que los anticuerpos ampliamente neutralizantes se desarrollan más rápidamente y en títulos más altos en individuos con infección aguda ⁸⁶. Además, los anticuerpos anti-E2 tienen propiedades aditivas que aumentan la neutralización cruzada de cepas heterólogas de varios genotipos de VHC

Así mismo la proteína E2 puede activar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) importante en la protección contra las infecciones virales ⁹⁰ o para prevenir la unión y la captación de partículas virales estos anticuerpos específicos pueden unirse a los antígenos víricos presentes en la superficie celular ^{91,92}. Estos anticuerpos contra E2 se han evidenciado sus presencias tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección ⁹³. Es por ello que se destaca la importancia de incluir la proteína E2 en pruebas serológicas para una estrategia de diagnóstico y pronóstico eficaz ⁸⁹.

En el caso de NS2 es una proteína de 217 aminoácidos, que además de la actividad de autoproteasa, tiene un papel independiente en el ensamblaje viral temprano, envoltura, maduración y liberación ^{94,95}. Comprende un dominio transmembrana N-terminal que consta de tres segmentos transmembrana supuestos (TMS) y un dominio citoplasmático C-terminal que reside en la cara citoplasmática de la membrana ER ^{94,96}. El último de los cuales contiene la actividad de autoproteasa de cisteína. La actividad de la enzima está codificada dentro de NS2 pero se ve reforzada por elementos del extremo N de NS3. La división NS2-NS3 es esencial en el ciclo de vida del virus. Aunque NS2 no desempeña un papel directo en el proceso de replicación del genoma de NS3, se requiere una función mediada por NS3 que es esencial en el establecimiento de complejos de replicación. ⁹⁴ por su parte, las interacciones de NS2 con proteínas estructurales (E1 y E2) y no estructurales (p7, NS3-4A y NS5A) sugieren que NS2 podría actuar como un mediador central en el ciclo de vida del VHC al atraer proteínas virales a la replicación y al ensamblaje del virus. De esta manera, se confirma que estas proteínas E2 y NS2 interactúan juntas en el contexto del virus ⁹⁷.

Los antígenos no estructurales presentan el antígeno viral más conservado genéticamente de tal forma que permite detectar varios genotipos del virus; lo que es de gran importancia para las pruebas diagnósticas, debido a que en el país cohabitan diferentes genotipos del VHC. Así como también es una enzima clave esencial para el ciclo de vida viral, por lo que es una excelente molécula candidata para el desarrollo de terapias antivirales y vacunas contra la infección por el VHC¹⁰².

La alta tasa de mortalidad como consecuencia de la infección crónica por el VHC y sus secuelas ya sea por cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular han conllevado al desarrollo de nuevas técnicas que ayuden a la detección precoz de la infección, en la actualidad las proteínas E2 y NS2 ha sido objetos de estudios y a pesar de que existen pocos datos sobre su utilidad para el pronóstico, diagnóstico, los estudios revelan que pudieran utilizarse en el manejo de pacientes infectados, dado que las proteínas E2/NS2 aportan una alta especificidad y sensibilidad, y su relación con la carga viral, debido a esto profundizar en los hallazgos de nuestro estudio es de vital importancia a fin de aporta nuevas alternativas de seguimiento y pronóstico frente la infección por el VHC.

CONCLUSIONES

El trabajo de investigación realizado y los resultados obtenidos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. El sistema elegido para la obtención y purificación de las proteínas recombinantes E2 y NS2 fue el ideal debido a que la proteína purificada conservó sus propiedades antigénicas intactas.
2. Las proteínas E2 y NS2 individualmente son específicas pero poco sensibles para el diagnóstico de infección de VHC.
3. Existe una relación estrecha entre nuestras proteínas estudiadas.
4. La importancia de obtener proteínas recombinantes E2 y NS2 purificadas radica en que puede convertirse en una valiosa herramienta para el estudio de la infección por VHC, ya que los anticuerpos contra estas proteínas pueden ser utilizados como marcadores serológicos de diagnóstico de infección en fase crónica por VHC, así como también para fines terapéuticos contra la infección.

RECOMENDACIONES

1. Continuar las investigaciones con respecto a las utilidades de E2 y NS2 en la infección en VHC
2. Sería interesante determinar el papel de estos anticuerpos como predictor de respuesta antiviral y marcador de progresión.
3. Extender los estudios relacionados con las proteínas E2 y NS2 en la infección crónica por el VHC
4. Ampliar la población de estudio en los futuros trabajos de investigación.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOGRAFÍA

1. Llenera S, Arias M, Cuadrado A. Cabezas J y Crespo J. Hepatitis Concepto y clasificación, hepatitis por el virus B otras hepatitis víricas. *Medic.* 2016 Abr; 12 (9) 473-483. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.04.001>
2. Organización Mundial de la Salud. Hepatitis. Ginebra: OMS; 2014. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/76/es/>
3. Halabe J. y Angulo F. Hepatitis Viral. *Rev Fac Med UNAM* 2000; 43(3): 90-101
4. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Manual de Procedimientos Estandarizados para la vigilancia Epidemiológica de las Hepatitis Virales. México: Secretaría de Salud; 2012 [citado 11 dic de 2017]. Disponible en: http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/11_Manual_HepatitisVirales.pdf
5. Organización Mundial de la Salud. Prevención y control de las Hepatitis virales: Marco para la acción mundial. Ginebra: OMS; 2012.
6. Carnicer F. Epidemiología de la Hepatitis C. *Rev Soc Valencia Patol Dig.* 2002; 21(3): 160-165. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-sociedad-valenciana-patologia-digestiva-160-articulo-epidemiologia-hepatitis-c-13039760>.
7. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolo de Vigilancia y Alerta de Hepatitis C. España: sVEA; 2016.
8. Rodríguez C. Actualización sobre Hepatitis Viral: Etiología, Patogenia, Diagnostico microbiológico y prevención. *Rev Med Gen Integr.* 2000; 16(6):574- 85.
9. Perazzo R, Quijada O y Velásquez I. Infección por el virus de hepatitis C. Consulta de hígado del Hospital Miguel Pérez Carreño. Análisis descriptivo, Quinquenio 2007-2011. *Revista Gen.* 2013 Dic; 67(4): 199-202
10. Castro F. Utilidad de la monitorización del ARN del virus de la Hepatitis C durante el tratamiento antiviral como factor predictor de respuesta

- mantenida. [Tesis doctoral en Internet] [España]: Universidad Autónoma de Barcelona; 2001. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=4241>
11. Izquierdo E, Escobar I. Interacciones de los nuevos inhibidores de la proteasa para el tratamiento de las hepatitis C: telaprevir y boceprevir. *Farm Hosp.* 2012; 36(6): 469-482. Doi: 10.7399/FH.2012.36.6.47
 12. Calderón E, Yang R, Calero M, Martínez M, Calderón M y Horra C. Hepatitis Crónicas virales B y C en la población inmigrante en España. *Rev Esp Salud Pública.* 2014 dic; 88: 811-818.
 13. Organización Mundial de la Salud. Global Hepatitis Report, 2017. Ginebra: OMS; 2017:12–16.
 14. Sulbarán M, Montaña L, Sulbarán Y, Loureiro CL, Flores CR, Farías Y, Maldonado A, Guillen G, Rangel H, Pujol F. Caracterización molecular del virus de la Hepatitis C en pacientes remitidos al Laboratorio Regional de Salud Pública del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Venezuela. *Invest Clin* 2016; 57: 13-24
 15. U.S Department of Health and Human Services. Hepatitis C. Estados Unidos: CDC; 2015 [citado 15 dic de 2017]. Disponible en: www.cdc.gov/hepatitis
 16. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Plan estratégico para el abordaje de la hepatitis C en el sistema nacional de salud. España: MSSSI; 2015.
 17. Cordeiro N, Taroco R y Chiparello H. Virus de las Hepatitis. En: Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene. *Temas de Bacteriología y Virología Médica.* 2ª ed. Uruguay: FEFMUR; 2006. p. 477- 513.
 18. Caballería L, Pera G, Bernad J, Canut S, Navarro E y Bruguera M. Estrategias para la detección de infección por virus de la hepatitis C en población general. *Rev Clin Esp.* 2014; 214(5): 242-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2014.01.024>
 19. Valdespino J, Conde C, Olaiz G, Palma O, Kershenobich D y Sepúlveda J. Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿un problema de salud pública emergente?. *Salud Pub Mex.* 2007; 49 (3): 395-403.

20. Alter MJ. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. *Clinics in liver disease* 1997;1:559-68.
21. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:2436-2441.
22. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013;57:1333-1342.
23. Baldo V, Baldovin T, Trivello R, Floreani A. Epidemiology of HCV infection. *Curr Pharm Des.* 2008;14(17):1646-54.
24. Mühlberger N, Schwarzer R, Lettmeier B, Sroczynski G, Zauzem S y Siebert U. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC Public Health* 2009; 9: 34.
25. Perico N, Cattaneo D, Bikbov B, Remuzzi G. Hepatitis C infection and chronic renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(1):207-20.
26. Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998;351:351-5.
27. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel Statement: Management of Hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:2s-10s.
28. Daniels D, Grytdal S, Wasley A. Surveillance for acute viral hepatitis – United States, 2007. *MMWR Surveill Summ.* 2009 May 22;58(3):1-27.
29. De Jesús J, Toro DH, Rodríguez F, Ruiz H, Dueño MI, Alvarez M, et al. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C in Puerto Rico. *Bol Asoc Med P R.* 2008 Jul-Sep;100(3):15-20.
30. Lavanchi D. Evolving Epidemiology of Hepatitis C Virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 107-115.
31. Kershenovich D, Razavi H, Sanchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L., et al. Trends and projections of HCV epidemiology in Latin America. *Liver International,* 2011; 31 (S2): 18-29. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02538.x
32. Monsalve F, Chacín L, Atencio R, Porto L, Costa L, Echevarría J. Low prevalence of hepatitis C virus infection in Amerindians from Western Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(1): 107-110.

33. INE: Instituto Nacional de Estadísticas. [Internet]. Caracas: INE; [citado 15 de diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.ine.gov.ve/>
34. Izquierdo E. y Escobar I. Interacciones de los nuevo inhibidores de la proteasa para el tratamiento de la hepatitis C: telaprevir y boceprevir. *Rev Farm Hosp.* 2012; 36(6):469-482. DOI: 10.7399/FH.2012.36.6.47
35. Rallón N, Soriano V y Benito J. Respuesta inmunitaria celular adaptativa frente a la infección por el virus de la hepatitis C. *Rev Med Clin (Barc).* 2007; 129(12): 469-76.
36. Páez O y Peñaloza F. Guías de diagnóstico y tratamiento de hepatitis C: Epidemiología. *Rev Col Gastroenterol.* 2012; 27(4): 4-6.
37. World Gastroenterology Organisation. Diagnóstico, manejo y prevención de la hepatitis C. WGO: 2013. Guías Mundiales.
38. Conselleria de Sanidade. Xunta de Galicia. Guía de práctica clínica de Hepatitis C. Santiago de Compostela 2010.
39. Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Generalitat Valenciana. Protocolo de hepatitis C. Protocolos EDO. Valencia. 2006
40. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factor for acute nonA nonB hepatitis in th united States and association with hepatitis C. *JAMA* 1990; 264:2231-5.
41. Alter MJ. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1997; 1:559-68.
42. Garfein R, Vlahov D, Galai N, et al. Viral infection in short-term injection drug users; the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B human inmunodeficiency, and human T lymphocitropic viruses. *Am J Pub Health* 1996; 86:655-61.
43. Farci P, Purcell R. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 103-126.
44. Ramos M. EL virus de la Hepatitis C como agente causal de eneferdad autoinmine. *Rev Med Integral* 2002; 39(7): 295-6.
45. Ramos M, García M, Font J y Ingelmo M. Manifestaciones clínicas e inmunológicas asociadas a la infección crónica por el virus de la hepatitis C. *Rev Clin Esp* 2002; 202(4): 224-32.

46. Pontificia Universidad Católica de Chile, Escuela Medicina. Hepatitis C: conceptos actuales. [Internet]. Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile; 2000 [citado 20 ene 2018]. Disponible en: <http://medicina.uc.cl/publicaciones/hepatitis-c-conceptos-actuales>
47. Huarte M. y Casi M. Virología, pruebas diagnósticas, epidemiología y mecanismos de transmisión del VHC. *An Sist Sanit Navar* 2004. 27(2) 41-49.
48. Llanes M, Palacios N, Piccione M, Ruiz M y Layana C. Aspectos moleculares de la respuesta antiviral contra el virus de la hepatitis C importantes para el desarrollo de vacunas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33(4): 273-280.
49. Suwana Noppornpanth. Genetic diversity and molecular evolution of hepatitis C virus [Tesis Doctoral] Erasmus University Rotterdam;2008.
50. Casanova Aurora y Casanova Teresa. Hepatitis por el virus de la hepatitis C. Disponible: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/vhc.pdf>
51. Stapleford K. y Lindenbach B. Hepatitis C Virus NS2 coordinates Virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme complexes. *Rev Journal of Virology*. 2011;85 (4): 1706-1717 doi:10.1128/JVI.02268-10
52. Navarro D, Jimenez M y Martinez M. Métodos moleculares para la determinación del genotipo del virus de la hepatitis C. *Rev Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25(3): 66-71.
53. Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama*. 2001; 55:133-159.
54. McCaffrey K, Gouklani H, Boo I, Pountourios P y Drummer H. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *Journal of Genr Virol*. 2011; 92: 112.-121 doi: 10.1099/vir.0.026385-0.
55. Atoom A, Jones D y Russel R. Evidence suggesting that HCV p7 protects E2 glycoprotein from premature degradation during virus production. *Virus Research*. 2013; 176: 199-210.

56. Tedbury P, Welbourn S, Pause A, King B, Griffin S y Harris M. The subcellular localization of the hepatitis C virus non-structural protein NS2 is regulated by an ion channel-independent function of the p7 protein. *Journal of Genr Virol.* 2011; 92: 819-830. Doi: 10.1199/vir.0.02741-0.
57. Vieyres G, Brohm C, Friesland M, Gentzsch J, Wölk B et al. Subcellular localization and function of an Epitope-tagged p7 Viroporin in hepatitis C virus-producing Cells. *Journal of Virol.* 2013; 87(3):1664-1678 doi: 10.1128/JVI.02782-12.
58. Gorzin Z, Gorzin A, Tabarraei A, Behnampour N, Irani S y Ghaemi A. Immunogenicity evaluation of a DNA vaccine expressing the Hepatitis C virus non-structural protein 2 gene in C57BL/6 mice. *Iran Biomed J.* 2014; 18(1): 1-7. DOI:10.6991/ibj.1231.2013
59. Brass V, Moradpour D, Blum H. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV). *Int J Med Sci.* 2006; 3 (2): 29-34.
60. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chrétien Y y cols. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002;16: 185-194.
61. Cosme E y Geert L. Inmunilogia de la hepatitis C. *Rev Invest Clin.* 1999; 51: 315.322.
62. Palomo M. Virus de la hepatitis C: variabilidad en las regiones del CORE y NS5A y su impacto en la infección por el genotipo 1b. [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid; 2016.
63. Restrepo J y Toro A. Hepatitis C. *Rev Medc y Lab.* 2011; 17 (9): 411-428.
64. Merican I, Sherlock S, McIntyre N y Dusheiko GM. Clinical, biochemical and histological features in 102 patients with chronic hepatitis C virus infection. *Q J Med.* 1993; 86: 119-125.
65. Spiegel B, Younossi Z, Hays R, Revicki D, Robbins S y Kanwal F. Impact of hepatitis C on health related quality of life: a systematic review and quantitative assessment. *Rev Hepatology.* 2005; 41:790-800.

66. Rodger A, Jolley D, Thompson S, Lanigan A y Crofts N. The impact of diagnosis of hepatitis C virus on quality of life. *Rev Hepatology*. 1999; 30: 1299-1301
67. Izquierdo S. Actividad TNF α y TGF β ₁ en la hepatitis Crónica C: correlaciones bioquímicas e histológicas. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid; 2009.
68. Bonino F, Piratvisuth T, Brunetto MR, Liaw Y-F. Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease. *Antiviral therapy*. 2010(3);15:35.
69. Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008;2:553-62.
70. Changotra H, Dwivedi A, Nayyar AK, Sehajpal PK. Diagnosing different stages of hepatitis B infection using a competitive polymerase chain reaction assay. *Indian journal of medical microbiology*. 2008; 26(2):138-42.
71. Carrerño V, Bartolomé J, Quiroga J y Castillo I. Infección oculta por el virus de la hepatitis C. *Rev Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(3): 14-19
72. Barrera JM, Francisc B, Ercilla G, Nelles M, Archod D, Darner J, et al. Detección mejorada de anti-VHC en Hepatitis después de transfusión mediante ELISA de tercera generación. *Vox Sang*. 1995; 68: 15-8.
73. Morishima C, Gretch DR. Uso clínico de la prueba del virus de la hepatitis C para el diagnóstico y la monitorización durante la terapia. *Clin Liver Dis*. 1999; 3: 717-40.
74. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyoud-Kraemer L, Bailley F, Trepo C HEPATITIS Group. Sensibilidad y especificidad de los ensayos de detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C de tercera generación: análisis de la literatura. *J Viral Hepat*. 2001; 8 : 87-95.
75. Forman MS, Valsamakis A. Virus de la hepatitis C. En: Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warrock DW, editores. *El Manual de Microbiología Clínica de Murray*. 10^a ed. Washington: American Society of Microbiology Press; 2011. pp. 1437-55.

76. Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. hepatitis C virus, Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci* 2014; 8: 19-25.
77. Álvarez G, Sotelo N, Cano M. Epidemiología del virus de la hepatitis C en niños. *Rev Mex Pedria*. 2007; 74(4):161-170.
78. Ferrer N, Domingo J, Corchero J, Vázquez E, Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factor*. 2009; 8(1):8-17.
79. Goel A, Bhaduria D, Aggarwal R. Hepatitis C virus infection and chronic renal disease: A review. *Indian J Gastroenterol*. 2018; 37(6):492-503. doi: 10.1007/s12664-018-0920-3
80. Tovo P, Calitri C, Scolfaro C, Gabiano C y Garazzino S. Infección por el virus de la hepatitis C adquirida verticalmente: correlatos de transmisión y progresión de la enfermedad *Mundo J Gastroenterol* . 2016; 22 (4): 1382-1392. doi: 10.3748 / wjg.v22.i4.1382
81. Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden T. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 Suppl 1:S43-8. doi: 10.1093/cid/cis368
82. Zhen-Yong K, De Beeck A, Hadlock K. Xia J, Ta-Kai L., Dubuisson J, et al. Kenneth G. Hepatitis C Virus E2 Has Three Immunogenic Domains Containing Conformational Epitopes with Distinct Properties and Biological Functions. *J Virol*. 2004; 78(17): 9224–9232. doi: 10.1128/JVI.78.17.9224-9232.2004
83. Alter, HJ 1995. A C o n o a C: estas son las preguntas. *Sangre* 1995; 85: 1681-1695
84. Ball JK, Tarr AW, McKeating JA. 2014. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2014; 105:100-111. doi:10.1016/j.antiviral.2014.02.013.
85. Rodríguez M. Tello D. Gomez J. Peterson D. Gavilanes F y Yélamo B. Fusogenic properties of the Ectodomain of HCV E2 envelope protein. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018; 1860(3): 728-736 <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.12.017>

86. Boisvert M, Zhang W , Elrod EJ , Bernard NF, Villeneuve JP , Bruneau J et al. Novel E2 glycoprotein tetramer detects hepatitis c virus-specific memory B cells. *J Immunol* 2016; 197: 4848-4858. doi: 10.1128 / JVI.02700-15
87. Pietschmann T., Brown R. Hepatitis C Virus. *Trends in Microbiol.* 2019; 27(4): 379-380 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.001>
88. Esteban L, Depaulis F, Moreau A, Bacq Y, Dubois F, Goudeau A, et al. Rapid and sustained autologous neutralizing response leading to early spontaneous recovery after HCV infection. *Virology*. 2013; 444: 90–99
89. Beaumont E, Roch E, Chopin L, and Roingeard P. Hepatitis C Virus E1 and E2 Proteins Used as Separate Immunogens Induce Neutralizing Antibodies with Additive Properties. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0151626. doi: 10.1371/journal.pone.0151626
90. Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhart C, Roost H, et al. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science*. 1997; 276(5321):2024-7. DOI:10.1126/science.276.5321.2024
91. Yamada T , Watanabe N, Nakamura T, Iwamoto A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity via humoral immune epitope of Nef protein expressed on cell surface. *J Immunol*. 2004; 172(4):2401-6. DOI:10.4049/jimmunol.172.4.2401
92. Duesberg U, Schneiders AM, Flieger D, Inchauspé G, Sauerbruch T, Spengler U. Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2001; 35(5):650-657
93. Nattermann J, Schneiders AM, Leifeld L, Langhans B, Schulz M, Inchauspé G, et al. Serum antibodies against the hepatitis C virus E2 protein mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *J Hepatol*. 2005; 42(4):499-504. DOI:10.1016/j.jhep.2004.12.018
94. Shaw J., Mark H., Fishwick C. Identification of a lead like inhibitor of the hepatitis C virus non-structural NS2 autoprotease. *Antiviral Research* 2015; 124: 54- 60 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.001>

95. De la Fuente C., Goodman Z., and Rice C.M. Genetic and functional characterization of the N-terminal region of the hepatitis C virus NS2 protein. *J. Virol.* 2013; 87 (8), 4130–4145. doi: 10.1128 / JVI.03174-12
96. Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, Migliaccio G, Monica N. La proteína NS2 del virus de la hepatitis C es un polipéptido transmembrana . *J. Virol.* 1995.; 69 (12) : 7461–7471
97. Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, et al. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001278. doi: 10.1371 / journal.ppat.1001278
98. Consorcio UniProt. Reorganizando el espacio de la proteína en el Universal Protein Resource (UniProt) *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (D1): D71–5. doi: 10.1093 / nar / gkr981
99. Ghasemi F, Ghayour-Mobarhan M, Gouklani Hamed, Meshkat Z. Development of Preventive Vaccines for Hepatitis C Virus E1/E2 Protein *Iran J Pathol.* 2018; 13(2): 113–124. doi: 10.3390 / v7082826
100. Ying, B., Pang, S., Yang, J., Zhong, Y., & Wang, J. Computational Study of HCV p7 Channel: Insight into a New Strategy for HCV Inhibitor Design. *Interdiscip Sci.* 2019; 11 (2): 292-299. doi: 10.1007 / s12539-018-0306-3.
101. Wei Cheng. Mechanisms of HCV NS3 Helicase Monitored by Optical Tweezers. *Methods Mol Biol.* 2015; 1259: 229–255. doi: 10.1007/978-1-4939-2214-7_15
102. Lorenz I. The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2 (NS2): An Up-and-Coming Antiviral Drug Target. *Viruses.* 2010; 2(8): 1635–1646. doi: 10.3390/v2081635