



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de mutaciones en el promotor del gen *core* viral
aislado en pacientes mexicanos infectados con el virus de la
Hepatitis B (HBV).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

JANET GARCÍA PILLADO

TUTORA:

DRA. MA. ROSALÍA LIRA CARMONA

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del Alumno.

García
Pillado
Janet
58 62 61 63
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Bióloga
099126531

2. Datos del tutor

Doctora
Lira
Carmona
María Rosalía

3. Datos del sinodal 1

Doctora
Iglesias
Chiesa
María Candela

4. Datos del sinodal 2

Doctora
Fiordelisio
Coll
Tatiana

5. Datos del sinodal 3

Doctor
Rojas
Del Castillo
Emilio

6. Datos del sinodal 4

Doctor
Ramírez
González
José Ernesto

7. Datos del trabajo escrito

Análisis de mutaciones en el promotor del gen *core* viral aislado en pacientes mexicanos infectados con el virus de la Hepatitis B (HBV)
90 p.
2008

*...y en lo que
a mi amor sáfico respecta:
¡es cierto!,
vivo enamorada
de la Srita. Biología.
JGP*

Dedicatoria.

*A la mujer más extraordinaria de esta tierra;
extraordinaria porque infinita es toda ella;
infinito su corazón y con él su amor;
infinita para mí desde mi llegada
a esta vida:
¡¡¡Mami lo logramos!!!*

Agradecimiento especial.

Con afecto agradecido a la Dra. Chalía Lira pues si no fuera por ella, esta tesis ni siquiera hubiera existido: afortunada fui aquél invierno de 2006 cuando recibí su llamada: me invitaba a trabajar con ella...

A decir verdad, mi ventura comenzó en Biomédicas, pues allí la conocí. Sin embargo, entonces no imaginaba que ella llegaría a formar parte importante en mi formación profesional. Así, con orgullo y emoción quiero dejarle saber que me siento afortunada por la oportunidad que brindó: de aprender de Ud., de trabajar junto a Ud., afortunada por encontrarme con alguien como Ud.

Agradezco además su paciencia, su consejo, su cuidado, su guía, sus enseñanzas, su apoyo, su confianza en mí: ora en el laboratorio, ora en su oficina, ora en su casa; en las presentaciones, en las revisiones, ora siempre... de corazón, quiero dejarle saber mi admiración y respeto a su persona e infinito es mi agradecimiento...

Agradecimientos I.

A todos y cada uno los pacientes.

Siempre tuve en el pensamiento la esperanza de que lo uno hace en el laboratorio pueda ser útil a ustedes. Por tanto, el entusiasmo y la esperanza no faltaron nunca, y sé que por ello, valiosa tinta hubo para escribir este trabajo. Muchas Gracias de verdad.

A la *Dra. LR Torres* del Hospital de Infectología Centro Médico Nacional La Raza; por su valioso apoyo en el proyecto.

Al Biól. Othón Rojas.

Por dos cosas: primero por tu cálida amistad y grata persona que eres. Luego, por tu ejemplo como un hombre de hierro, de acero inoxidable. Si pusiera en práctica un poco de lo que tú haces, quizás mi vida sería más fácil y sabes, por ese compromiso tuyo con la vida, con tu trabajo, con tu familia y contigo mismo te hace un amigo y colega excepcional: te admiro mucho! Y además agradezco tu paciencia infinita todas las veces que trabajamos juntos.

A la M. en C. Angélica Maldonado.

Por todas y cada una de las cosas que me enseñaste a hacer en el laboratorio, por tu empeño y honestidad en el trabajo. Por tu paciencia y las valiosas observaciones que le hiciste a la tesis. Aprendí mucho de tí y fui muy afortunada en que hayas sido mi maestra en el laboratorio. Gracias!

A la QFB. Ma. Teresa Álvarez.

Por darme la oportunidad de acercarme a sus virus; por su apoyo para tener material de trabajo; por su experiencia; por sus palabras; y por el ejemplo de una mujer comprometida con su trabajo.

A los revisores Candela, Tatiana, Emilio y Ernesto.

Primero, por haber aceptado ser mis sínodos, y luego, por todo lo que me dejaron aprender con sus observaciones y comentarios que le hicieron al escrito. Por su disposición y paciencia, por su ayuda valiosa para la conclusión de mi tesis: de verdad, gracias!

Agradecimientos II.

A mi mamá

A ti solamente por acompañarme a buscar y encontrar algo que por amarlo así, me diera *motivos* para amar a la vida tanto como lo hago, y también te amo mamita...

A mi borreguito Daniel

Por tu amor y tu fuerza constante, porque no me abandonaste nunca, porque siempre, aunque callado, estuviste para mí. Te quiero y te admiro mucho hermano!

A mi Chiquis Ivonne

Por ser mi amiga y cómplice incondicional, por estar juntas en momentos difíciles, por tu ejemplo de fortaleza y por tu cariño aunque a veces un poquito crudo!

A mi papá.

Por “mi semana”. Por tu muy *peculiar* modo de quererme...y cuando niña, quería hacer la letra como tú...

A mi tío Ale

Porque siempre, siempre y aún desde que la memoria de mi niñez ya se impregnaba perdurablemente; infalible y amoroso, desinteresado y aún a pesar de ti mismo y de todo, fuiste para mí toda vez que acudí a ti. Gracias por tu escucha, por ser aquél que aunque lejos, se mostró cerca, tan cerca... te quiero títo.

A mi abuelita Paula

Abue, cómo no!, si lo único que he recibido de ti es tu cariño y tu ánimo para seguir. Y de tantas cosas, cómo olvidar por ejemplo, aquéllas madrugadas en San Pablo en las que salías a acompañarme (junto con tu escoba, por protección claro!) a tomar el microbús para ir a la Facultad. Gracias por preocuparte y acordarte de mí siempre, por dejarme ser tu “mo”. Abue, vives en mi corazón y esto también va y es por tí!

A mis tías y tíos

A mi tía Chucha por sus pláticas en las que después me dejabas sentir con más fuerza, emocionada, amada, porque con tu presencia lo llenas todo: llenas siempre mi vida. A mi tía Aura, a mi tío Toño por su ternura y empeño, por que siempre has sido un hombre maravilloso. Y a míos tíos y tías todos, y a mi abuelita Aurelia por los buenos deseos que siempre tuvieron para mí. También a mi dulce prima Karla M.

A mis amigas, las mejores!

A *Guadalupe* “michava”, qué afortunado aquel nuestro encuentro en el pasillo de Prepa 9! y desde entonces, debo decirte, que estar contigo me hace muy feliz, bien feliz. Y en este recorrido largo por la Facultad, tu siempre me has acompañado, de uno y otro modo (¿te acuerdas de las clases a las que me fuiste conmigo, a la práctica de Ecología, con Higinio, al Coro, al Prometeo, al laboratorio, al café?... y la lista sigue!). Y no sé cómo agradecerte tu escucha, tus palabras, tus consejos, tus carcajadas espontáneas y maravillosas que me dejan sentir que tu felicidad es la mía también, y ver de igual modo que mi

emoción es igualmente tuya... Eres única y una mujer estupenda!: nada como una amiga que lo acompañe a uno en las cosas lindas de la vida, como esta... Te quiero un chorro!!

A *Elisa*, por tu amistad que aunque de origen algo raro (¿te acuerdas?) pero ontogénicamente, bien valiosa. Gracias por tu dulzura y valentía. Y no dejaré de decirlo, he aprendido mucho de ti, y por ti luché para que “mis ondas” no me venganzan; gracias por tu ejemplo de empeño y optimismo en este camino, a veces un tanto *particular* para nosotros los biólogos. Y gracias por las veces que me llamaste a las 4 de la mañana para despertarme e ir a clase!!!

A *Yanita*, por tu amistad sincera y neta, por tu carácter fuerte y decidido, por el modo en que siempre me motivaste y por recordarme lo que las demás personas no quieren recordarme y sabes eso no lo olvido. Te quiero amiga!

A los cuates todos.

Que de uno u otro modo me acompañaron con su amistad, apoyo y alegría en momentos particulares de este largo camino: Pedro Polansky, Kareu, Denisse; ora Tere en el laboratorio (hermosa, gracias!), ora Leo, ora Onasis, y tu mi querida Itzahuí. Y cómo olvidar al Dr. Víctor, a Adriana e Hilda que hicieron más divertida la vida en el laboratorio.

A mi hermosa y ahora memorable Facultad de Ciencias.

En ti me encontré y llegué a amar tanto aquello que hallé, que me descubrí entonces feliz y orgullosa de formarme contigo. Y en efecto, en ti y por ti también tuve la fortuna de sentirme como el mitológico Prometeo... Me recibiste con semejante cariño que no dolió ver dejar irse a la chamaca de 19 años que llegó a tus aulas y me diste la oportunidad de vivir cosas inolvidables y valiosas: la más importante de ellas sea quizás, descubrir mi vida en la Biología y más ambicioso aún, en la ciencia. Además, ahí contigo conocí a personas increíbles, decir por ejemplo, a los profesores David Benavides de plantas, a la Dra. Silvia Santiago de Protistas, a Magdalena Contreras de Hongos, a Adolfo Olea de Filosofía, a Antonio Lazcano de Origen de la Vida... y no me olvido a mis iniciadores, los maestros Alejandro Gómez, Miguel Ángel Martínez y Viki Evangelista.

Sabes, no dejo de extrañarte y sentirme emocionada toda vez que camino por tus pasillos, porque hueles a recuerdos míos, maravillosos...

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Qué desde que entré la Preparatoria No. 9 te he amado y admirado; he soñado contigo despierta y dormida y me has dado tanto, tanto: reconozco que has contribuido importantemente y de un modo muy especial a que ame la vida como la amo. Gracias por dejarme ser parte de ti!

Y de modo especial, gracias a aquéllas personas que me dieron la oportunidad de terminar por fin esta tesis...

Este trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Virología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIyP) del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional siglo XXI.

Se agradece la beca otorgada para la realización de este trabajo por parte de CONACYT - SALUD 2004-01009.

Índice

página

Índice de Abreviaturas

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Generalidades del agente etiológico de la Hepatitis B	3
1.2. El Genoma de HBV.	4
1.2.1. <i>Gen s (ORF S)</i>	5
1.2.2. <i>Gen c (ORF C)</i>	5
1.2.3. <i>Gen p (ORF P).</i>	6
1.2.4. <i>Gen x (ORF X).</i>	6
1.2.5. <i>Otros elementos en el genoma de HBV.</i>	6
<i>Promotores.</i>	6
<i>Incrementadores.</i>	6
<i>Elemento regulador negativo (NRE)</i>	7
<i>Región que Responde a Glucocorticoides (GRE).</i>	7
<i>Señal de encapsulación en el RNA pregenómico (ϵ).</i>	7
<i>Repeticiones directas cortas (DR).</i>	8
1.2.6. <i>Transcripción génica en HBV y su regulación.</i>	8
1.3. Ciclo biológico de HBV y Replicación Viral.	9
1.3.1. <i>Replicación Viral</i>	10
1.4. Patogénesis de la infección por HBV.	11
1.5. Características clínicas de la Hepatitis B.	12
1.5.1. <i>Hepatitis Aguda</i>	12
1.5.2. <i>Hepatitis Crónica.</i>	13
1.6. Rutas de Transmisión de HBV.	14
1.7. Diagnóstico.	16
1.7.1. <i>Serología.</i>	16
1.7.2. <i>Pruebas de FH</i>	18
1.8. Tratamiento.	18
1.8.1. <i>Quimioterapia.</i>	19
<i>Interferón pegilado.</i>	19
1.8.2. <i>Vacunas.</i>	20

1.9. Variantes Moleculares de HBV	20
1.9.1. <i>Diversidad genética en HBV a nivel poblacional.</i>	23
1.9.2. <i>Clasificación del virus de la Hepatitis B.</i>	23
1.9.3. <i>Genotipos y subgenotipos de HBV.</i>	24
2. ANTECEDENTES	26
2.1. Epidemiología de la Hepatitis B en México.	26
2.2. Genotipos de HBV en México.	27
2.3. Biología del gen precore/core: ORF C.	28
2.3.1. <i>Importancia del antígeno e.</i>	28
2.4 El promotor del gen core (CP).	29
2.4.1. <i>El promotor básico del core (BCP).</i>	30
2.4.2. <i>Secuencia reguladora río arriba (URS).</i>	30
2.4.3. <i>Secuencia reguladora del core en dirección 5' (CURS).</i>	30
2.4.4. <i>Incrementador II (EnhII)</i>	31
2.5. Factores de Transcripción Hepáticos y Funcionamiento del promotor del gen core: Tropismo viral.	32
2.6. Mutaciones en el promotor del gen core.	33
2.6.1. <i>Mutaciones en los nts. 1753 - 1757.</i>	35
2.6.2. <i>Mutación A1765T-G1767A.</i>	36
2.6.3. <i>Mutaciones en los nts. 1809-1812.</i>	36
2.6.4. <i>Otras mutaciones.</i>	36
2.7. Significado clínico de las mutaciones.	36
2.8. Mutaciones en el promotor del core asociados a Genotipos de HBV	39
2.9. Mutaciones y respuesta a tratamiento antiviral con INF.	41
3. JUSTIFICACIÓN	43
4. HIPÓTESIS	44
5. OBJETIVOS	45
5.1. Objetivo General	45

5.1. Objetivos Particulares	45
6. MATERIAL Y MÉTODOS	46
6.1. Pacientes.	46
6.1.1. <i>Obtención de plasma y suero.</i>	46
6.1.2. <i>Determinación de la carga viral.</i>	47
6.2. Obtención de DNA total.	47
6.2.1. <i>Extracción de DNA total por columna QIAmp DNA micro™(QIAGEN, EUA).</i>	47
6.2.2. <i>Extracción de DNA total por columna QIAmp DNA ultrasens virus™ (QIAGEN, EUA)</i>	48
6.3. Ensayo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa): Amplificación del fragmento de 339 pb: Promotor del gen core de HBV.	48
6.3.1. <i>PCR anidado.</i>	49
6.3.2. <i>Purificación y cuantificación.</i>	50
6. 4. Reacción de Secuenciación con BigDye® Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing.	51
6.5. Clonación.	52
6.5.1. <i>Preparación de Células competentes.</i>	52
6.5.2. <i>Reacción de ligación del fragmento viral en el plásmido.</i>	52
6.5.3. <i>Transformación de bacterias JM109.</i>	52
6.5.4. <i>Crecimiento en Medio LB.</i>	53
6.5.5. <i>Purificación de DNA plasmídico.</i>	53
6.5.6. <i>Digestión de DNA plasmídico usando <u>EcoRI (PROMEGA)</u></i>	53
6.6. Análisis de las secuencias nucleotídicas.	54
6.6.1. <i>Revisión de los Electroferogramas y Conversión de Formatos de los fragmentos virales secuenciados.</i>	54
6.6.2. <i>Correspondencia del fragmento secuenciado con HBV.</i>	55
6.6.3. <i>Determinación de genotipos de HBV.</i>	55
6.6.4. <i>Comparación entre secuencias de HBV e identificación de mutaciones.</i>	56
6.6.5. <i>Obtención de secuencias consenso.</i>	56
6.7. Análisis estadísticos.	56
7. RESULTADOS	57
7.1. Pacientes con HBV.	57
7.2. Amplificación y Secuenciación.	59
7.3. Clonación.	62
7.4. Genotipificación	62

7.5. Alineamiento múltiple e identificación de mutaciones.	65
7.6. Mutaciones en el promotor del <i>core</i>.	68
7.7. Mutaciones y Pacientes.	72
7.7. 1. <i>Agrupación de los pacientes.</i>	72
7.7.2. <i>Asociación de mutaciones con parámetros clínicos.</i>	74
7.7.3. <i>Asociación de las mutaciones más frecuentes con parámetros clínicos.</i>	76
7.7.4. <i>Asociación de mutaciones con los pacientes que han recibido tratamiento antiviral para HBV.</i>	77
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	78
8.1. Discusión	78
8.2. Conclusiones	86
Literatura Citada	87
Sitios <i>web</i> utilizados	90
APÉNDICE I. Resultados de los 42 pacientes con HBV.	i
<ul style="list-style-type: none"> • i. Carta de consentimiento informado • ii. <i>Procedencia, edad y sexo de cada paciente.</i> • iii. Resultados de Carga Viral obtenidos en cada paciente con HVB. • iv. Resultados Serología • v. Resultados Pruebas de Funcionamiento Hepático. 	
APÉNDICE II	ix
<ul style="list-style-type: none"> • Determinación de Carga Viral por COBAS Amplicor MONITOR TM ROCHE 	
APÉNDICE III. Pacientes y Mutaciones	x
<ul style="list-style-type: none"> • i. Pacientes, tratamiento y número de mutaciones halladas. • ii. Datos de los pacientes considerados para la clasificación en los 3 grupos de pacientes 	

Índice de Abreviaturas.

HBV	Virus de la Hepatitis B
CP	Promotor del del gen core
HBsAg	Antígeno de Superficie de Hepatitis B
Anti HBcAg	Anticuerpo anti-antígeno <i>e</i>
Anti HBs	Anticuerpo anti antígeno de superficie <i>s</i>
HBcAg	Antígeno <i>e</i> de Hepatitis B
ALT	Enzima alaninoaminotransferasa
AST	Enzima aspartato aminotransferasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
CV	Carga viral
URS	Secuencias reguladoras río arriba
BCP	Promotor del core básico
CURS	Secuencia reguladora del core en dirección 5'
TA (1-4)	Región rica en timina-adenina, tipo caja TATA
HCC	Carcinoma Hepatocelular
aa	aminoácidos
HBcAg	Antígeno Core de Hepatitis B
ORF	Marcos de Lectura Abierta
PreC	Precore Core
C	Core
EnhI ó II	Incrementador o enhancer I y II
RC-DNA	DNA circular y relajado
pgRNA	RNA pregenómico
ccc-DNA	DNA circular cerrado covalentemente
SC-DNA	DNA superenrollado
NRE	Elemento regulador negativo
TBP	Proteína de unión a caja TATA
HNF	Factor nuclear hepático
RXRα	Receptor x a retinoides α
PPARα	Receptor activado proliferativo de peroxisoma α
COUP-TF1	Factor de transcripción del promotor de la ovoalbumina río arriba 1
TR2	Receptor testicular humano
Sp1	Proteína 1 del promotor de SV40
IFN	Interferón
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzima
log₁₀	Log en base 10
TA	Temperatura ambiente
BE	Bromuro de Etidio
LB	Medio Luria Bertoni
Kb	Kilobases
ng	Nanogramos
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosida
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- isopropiltio- β -D-galactosida
BSA	Albúmina Sérica Bovina
EcoRI	Enzima de restricción obtenida en <i>Escherichia coli</i>
U	Unidades
DS	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
\bar{X}	Promedio o media

Análisis de mutaciones en el promotor del gen *core* viral aislado en pacientes mexicanos infectados con el virus de la Hepatitis B (HBV).

RESUMEN

El virus de la Hepatitis B (HBV) es un agente etiológico de morbilidad y mortalidad importante. Es la décima causa de muerte a nivel mundial y la quinta como enfermedad infecciosa. Se estima 400 millones de individuos cursan con hepatitis crónica; ésta puede ocasionar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular.

La replicación de HBV se lleva a cabo por medio de un intermediario de RNA el cual es reverso transcrito, en cuyo proceso se introducen errores de apareamiento nucleotídico, lo que deriva en una tasa mutacional alta con dos consecuencias: la **existencia de 8 genotipos virales** y la **fijación de mutaciones** en genes virales así como en sus elementos reguladores con efecto en el curso clínico del paciente.

En este trabajo se estudió el promotor del gen *core* (CP) cuya actividad regula la transcripción para la síntesis del antígeno e ; interviene en la replicación viral y determina el hepatotropismo de este virus. Se ha observado una relación significativa entre la presencia de mutaciones en este promotor con la replicación viral incrementada y la reducción en la expresión del antígeno e . En México no existen estudios sobre este elemento del genoma de HBV. Adicionalmente, son escasos los trabajos con el genotipo H que es predominante en México. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue buscar y analizar las mutaciones presentes en el CP así como su asociación con las características clínicas de los pacientes. Fue un estudio transversal, retrospectivo que incluyó 42 pacientes derechohabientes del IMSS infectados con hepatitis B: se determinó para cada paciente la serología (HBsAg, HBeAg, Anti HBeAg y IgG Anti- HBs) y se realizaron pruebas de funcionamiento hepático: ALT, AST, Bilirrubina Directa e Indirecta. Se extrajo el DNA total de cada muestra, se amplificó por PCR y se secuenció el fragmento de 339 pares de bases correspondiente al CP. Se determinó el genotipo viral mediante un BLAST (Genotyping, NCBI). A partir de este genotipo, se hizo una comparación entre las secuencias obtenidas y las secuencias prototipo de HBV (GenBank) para identificar mutaciones.

Todos los pacientes fueron HBsAg positivos; el 69% fueron HBeAg positivos; el 60% tuvieron niveles anormales de ALT y AST; los valores de \log_{10} de la carga viral (CV) fueron 2.3-7.8. Se logró secuenciar el fragmento de 339 pb en 35/42 muestras. Los *Genotipos* identificados fueron: **H** 94.3% y **F** 5.7%. Se encontró que 31 de las 35 muestras presentaron mutaciones (88.6%); las más frecuentes fueron la G1615 (57%) y G1684A (46%), todas se ubicaron en la Región Reguladora Río Arriba (URS) la cual contiene los elementos funcionales que participan en la regulación del Promotor del Core Básico (BCP) en el CP.

Se encontró una media significativamente diferente ($p < 0.05$) entre muestras sin mutaciones con respecto a las que presentan 2 mutaciones o más. La mutación G1615 se relacionó significativamente con la CV alta ($o > \log_{10} 5$; $p < 0.05$). No se encontró asociación de los niveles enzimáticos de ALT, AST y la negatividad o positividad del antígeno e con las mutaciones identificadas. El 65.7% (23/35) de los pacientes recibió tratamiento antiviral, de los cuales el 87% (20/23) presentaron mutaciones.

En conclusión, se identificaron mutaciones en el BCP del CP en pacientes mexicanos, no reportadas previamente en la literatura; algunas de ellas con relación a la carga viral del paciente así como con la respuesta al tratamiento antiviral. Se requiere evidencia experimental que permita corroborar los efectos mutacionales propuestos en este estudio. Finalmente, este trabajo permitió identificar cambios en este elemento viral de Genotipo H y representa evidencia preliminar sobre la relación entre mutaciones y los parámetros clínicos del paciente mexicano con HBV.

1. INTRODUCCIÓN

*Nothing in biology makes sense except
in the light of evolution.*

Th. Dobzhansky, 1973.

La hepatitis se refiere a la inflamación del hígado, ya sea por una sustancia tóxica tal como el alcohol ingerido o por una infección viral (figura 1). La hepatitis viral puede ser ocasionada por siete virus diferentes entre sí, designados como A, B, C, D, E, F y G (Horn, L. 2005). Particularmente, el virus de la hepatitis tipo B (HBV) será de interés para este trabajo de tesis.

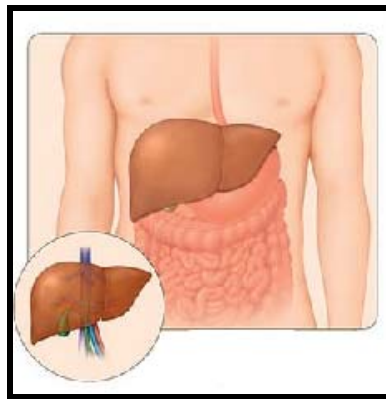


Figura 1. Hepatitis: Inflamación del hígado. Tomado de www.cdc.gov

La infección por el virus de la hepatitis B es un problema de salud notable ya que ocasiona hepatitis aguda y crónica así como cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (HCC). La infección por HBV ocupa la décima causa de muerte en el mundo y la mortalidad por cáncer de hígado ocasionado por HBV probablemente excede un millón de pacientes por año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 2 billones de personas están infectadas con HBV, mientras que 400 millones de personas en el mundo son portadoras del virus y más de 250 millones residen en Asia (Seeger, C. & Mason, W. 2000; Horn, L. 2005; Cosme, A. *et al.*, 2006).

La infección aguda por HBV es una enfermedad seria y aproximadamente 0.5 % de los pacientes en esta etapa, derivan en hepatitis fatal o fulminante. La infección crónica pueden tener consecuencias importantes: cerca del 25% terminan con cáncer de hígado. Así mismo, la alta incidencia de pacientes asintomáticos o portadores favorece el contagio entre personas, la falta de tratamiento médico y el tamizaje inadecuado en los bancos de sangre (Horn, L. 2005). Por otra parte, existe una vacuna disponible para HBV y existe un esfuerzo para la una vacunación universal en países desarrollados incluyendo aquellas regiones en donde la infección es endémica, como es el caso de China con 120 millones de portadores. Sin embargo, la vacunación no es un tratamiento para infecciones establecidas. Más aún, el alto costo de los programas de vacunación, así como servicios de salud deficientes han impedido su introducción en países pobres en donde la infección por HBV afecta del 5 al 20% de la población (Seeger, C. & Mason, W. 2000).

En México, a pesar de que la infección por HBV es un problema de salud, no se le ha dado la importancia que tiene a pesar de que la cirrosis es la cuarta causa de mortalidad en general y la segunda en edad productiva de acuerdo a la Secretaría de Salud

(2002). En 2005, México se catalogó como país de baja endemia; sin embargo, la seroprevalencia actual para HBsAg (Antígeno de superficie *s* de la Hepatitis B) es de 0.21% y 3.3% del anti-HBc (Anticuerpo anti proteína Core de la Hepatitis B) lo que podría catalogarlo ahora como un país de endemia intermedia, indicando un aumento en el número de personas infectadas. Desafortunadamente en nuestro país no existen cifras concretas sobre el número de personas con HBV crónica (Valdespino, J. *et al.*, 2007).

A pesar de que el material genético del virus de la hepatitis B es de DNA, su replicación se lleva a cabo por medio de un intermediario de RNA el cual es reverso transcrito y en cuyo proceso se introducen errores de apareamiento nucleotídico, además carece de mecanismos de reparación para corregir tales errores. Ello deriva en tasa mutacional alta (Karayiannis, P. *et al.*, 2005). Por extensión, esta tasa de mutación en HBV tiene dos consecuencias importantes: por una lado, la existencia de 8 genotipos virales identificados hasta ahora (de acuerdo al criterio de al menos 8% de diferencias en la secuencia de nucleótidos completa en el genoma viral) con distribución geográfica restringida y 24 subgenotipos. Por el otro lado, la fijación de mutaciones en regiones particulares (genes y sus elementos reguladores) del genoma viral, muchas de ellas con asociación genuina en la patogénesis y curso clínico de la infección por HBV (Karayiannis, P. *et al.*, 2005; Abbas, Z. *et al.*, 2006; Schaefer, S. 2007).

En este contexto, es fundamental conocer las mutaciones presentes en la región reguladora de gen *core*: el promotor cuya actividad no sólo tiene impacto en la transcripción de su gen, para la síntesis del antígeno *e* (de relevancia en la patogénesis de la infección) sino también de otros genes virales, además de participar en la replicación y determinar en parte, el hepatotropismo de este virus de la hepatitis B. Es notable la existencia de evidencia sólida sobre la asociación de mutaciones en este elemento regulador con la patogénesis de la infección en pacientes con HBV (Chen, C. *et al.*, 2005; Baumert, T. *et al.*, 2007). El objetivo principal de este estudio fue buscar mutaciones en aislados virales de pacientes mexicanos.

1.1. Generalidades del agente etiológico de la Hepatitis B.

El virus de la hepatitis B es el miembro prototipo de una familia de virus denominada *Hepadnavirus* cuyo nombre deriva de su hepatotropismo y su genoma de DNA, se puede encontrar tanto en mamíferos como en aves (Abbas, Z. *et al.*, 2006; Schaefer, S. 2007). Fue el primer virus de hepatitis humana del cual se identificaron sus proteínas así como su genoma completo (Kann, M. & Gerlich, W. 2005).

Estructuralmente, el virus es esférico con un diámetro de 42-45nm y está formado por una doble cubierta (figura 1.1.1); la proteína de la región exterior de ésta se denomina envoltura. La envoltura está compuesta de 3 antígenos de superficie principalmente y tienen un papel central en el diagnóstico de la infección activa pues son los primeros en aparecer en circulación y persisten durante la etapa crónica, por tal razón se les puede denominar Antígeno de Superficie de Hepatitis B (HBsAg). El suero de pacientes portadores altamente virémicos contiene grandes cantidades de este antígeno de superficie (Kann, M. & Gerlich, W. 2005). La cubierta interna es llamada partícula Core o nucleocápside y está compuesta por las proteínas Core o bien denominadas Antígeno Core de Hepatitis B (HBcAg). En conjunto, esta nucleocápside contiene la polimerasa transcriptasa reversa y DNA viral así como proteínas celulares (Baumert, T. *et al.*, 2007).

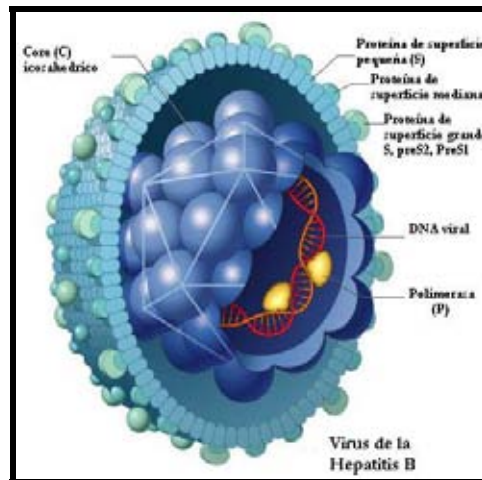


Figura 1.1.1. Estructura del virus de la hepatitis B. Se muestran los componentes principales de la envoltura viral (HBs) así como de la nucleocápside (HBc). Modificado de <http://www.labcorp.com/datasets/labcorp/html/img/hepbcore.jpg>

1.2. El Genoma de HBV.

El genoma del virus de la hepatitis B, es una molécula de DNA circular, parcialmente bicatenario: una cadena completa de polaridad negativa y una cadena incompleta de polaridad positiva (figura 1.2.1). La longitud de este genoma es de 3200 pares de bases (3.2 Kilobases o Kb). Los extremos 5' de la hebra *positiva* y *negativa* se sobrelapan en 240 nucleótidos e incluyen repeticiones cortas denominadas DR1 y DR2, lo que genera terminaciones cohesivas que aparean bases para mantener el cromosoma vírico con una configuración circular relajada. Existe también una proteína terminal unida covalentemente al extremo 5' de la hebra negativa, mientras que un oligo-ribonucleótido se halla unido al extremo 5' de la hebra positiva (White, D. & Frenner, F. 1994).

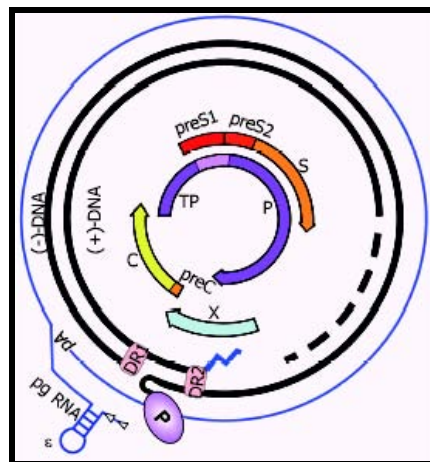


Figura 1.2.1. Organización del genoma del virus de la Hepatitis B. La hebra parcialmente doble, el DNA circular se indica por las líneas negras con la proteína P unida covalentemente al extremo 5' de la hebra negativa de DNA, y el primer de RNA (línea zigzag) en el extremo 5' de la hebra positiva de DNA. Las líneas discontinuas simbolizan las longitudes heterogéneas de la hebra positiva. DR1 y DR2 son las repeticiones directas. Tomado de Beck, J. *et al.*, 2007.

El genoma de este virus ha evolucionado hacia su compactación por medio de Marcos de Lectura Abierta (ORF). Así, el genoma de HBV se compone por 4 ORFs: el ORF P o gen *p* que codifica para la polimerasa viral; el ORF S que está completamente localizado dentro del ORF P; el ORF C y el ORF X que se sobrepone sólo parcialmente con el ORF P (figura

1.2.2). Este virus puede codificar más de un producto proteico a partir de un ORF utilizando codones ATG internos como sitios de inicio; por tanto es posible sintetizar conjuntos anidados de proteínas con diferentes amino-terminales y extremos carboxilo en común. El ORF S o gen *s* codifica las tres proteínas HBs; el ORF C o gen *c* codifica la proteína HBe y HBc mientras que el ORF X o gen *x*, codifica una proteína con actividad transreguladora. Por tanto, a partir de éstos marcos de lectura se obtienen 7 productos virales (Gerlich, W. 1993; Baumert, T. *et al.*, 2007; White, D. & Frenner, F. 1994).

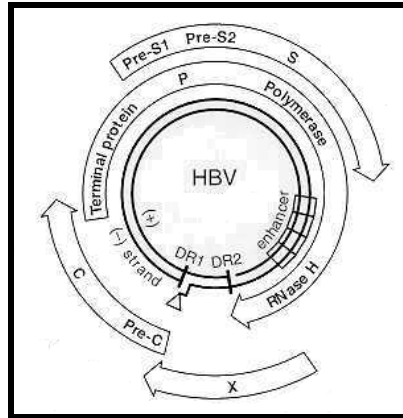


Figura 1.2.2. Marcos de Lectura Abiertos (ORFs) en el Genoma de HBV. Se observan las posiciones de los 4 ORFs: ORF C (PreC/Core), ORF X, ORF P y ORF S (PreS1/PreS2/S). Modificado de <http://www.scripps.edu/cb/mclachlan/fig1.jpg>.

1.2.1. Gen *s* (ORF S)

El ORF o gen *s* codifica la proteína de la envoltura S la cual puede expresarse de tres formas diferentes: una proteína grande (L) traducida a partir de los primeros codones de inicio, y es un sólo polipéptido codificado por las regiones Pre-S1 y Pre-S2, más las regiones S del genoma y aparecen en la envoltura de los viriones infecciosos; una proteína mediana (M) que comprende el producto pre-S2 al que se añade S; y finalmente, el producto más abundante es la proteína S, el constituyente básico de las partículas HBsAg no infecciosas, éstas comprenden sólo el producto del ORF S (figura 1.2.3). Las tres formas están glicosiladas (Baumert, T. *et al.*, 2007; White, D. & Frenner, F. 1994).



Figura 1.2.3. Mapa lineal de los productos del gen *s*. Se observan las tres proteínas, L, M y S, en cada una se señala que región del ORF codifica para la construcción de la proteína completa. cada segmento. Los círculos negros indican un dominio glicosilado mientras que los blancos indican dominios parcialmente glicosilados. *myr*: proteína miriostilada. Tomado de Bruss, V. 2007.

1.2.2. Gen *c* (ORF C).

EL ORF C o gen *c* codifica para dos productos proteicos al tener dos sitios de inicio que lo divide en dos regiones: Precore C (PreC) y Core (C) produciendo así la proteína *e* de 29 aminoácidos (aa), también denominada Antígeno *e* de Hepatitis B (HBeAg) y la proteína Core (HBcAg) de 183 aa, respectivamente. La proteína codificada por la región PreC sufre modificaciones post-traduccionales que generan el HBeAg el cual es un seromarcador de alta replicación viral. La región C codifica para el antígeno Core que es la proteína más importante de la nucleocápside (Baumert, T. *et al.*, 2007; White, D. & Frenner, F. 1994).

1.2.3. Gen *p* (ORF P).

El gen *p* codifica para la proteína P o Polimerasa viral de 831 aa. Es una proteína con tres funciones enzimáticas distintas: polimerasa de DNA, reverso transcriptasa y RNasa H. La polimerasa transcripasa-reversa de DNA vírico es de central importancia en la replicación viral. Este ORF comprende el 80 % de todo el genoma (White, D. & Frenner, F. 1994; Baumert, T. *et al.*, 2007).

1.2.4. Gen *x* (ORF X).

El gen u ORF X que incluye los extremos cohesivos del genoma, codifica para el antígeno *x* (HBxAg), aunque es mejor conocido como la Proteína X de 154 aa. Es un potente *trans* activador que regula la transcripción de todos los promotores virales y algunos celulares aunque sus funciones precisas en el ciclo de vida viral y el curso natural de la infección HBV permanecen por ser dilucidados (White, D. & Frenner, F. 1994; Baumert, T. *et al.*, 2007). Para muchos virus, los primeros productos génicos que deben expresarse son factores de transcripción que activen promotores y otros genes virales en un modo ordenado en tiempo y espacio. Tales productos se denominan *genes tempranos*; en este sentido se sabe que la proteína X es la primera en ser expresada al ser necesaria para activar muchos otros elementos reguladores virales y celulares (Kann, M. & Gerlich, 2005).

1.2.5. Otros elementos en el genoma de HBV.

En adición a los ORF's virales, se han identificado varios elementos funcionales en el genoma de HBV que están involucrados en el control preciso y ordenado de la expresión génica, transporte del RNA y la replicación viral (Baumert, T. *et al.*, 2007).

Promotores.

En el genoma de HBV se han identificado 4 promotores encargados de regular la transcripción de los ORFs virales (figura 1.2.4). En consecuencia, la síntesis de cada uno de los RNA mensajeros esta dirigida por su propio promotor. Se considera al promotor como la región que es necesaria para lograr el inicio de la transcripción, aunque esta región puede no ser suficiente para determinar la regulación completa del gen (Costa, J. 2002).

Incrementadores.

Un incrementador o *enhancer* es una secuencia de nucleótidos que tiene la capacidad de potenciar la transcripción independientemente de la orientación y posición en el genoma. En HBV se han descrito dos incrementadores (figura 1.2.4): el I ó EnhI dentro del gen *p* y en zonas donde no hay superposición de los genes. El elemento estimulador mayor en HBV es el EnhI, que incrementa la iniciación de la transcripción por un factor de 10-50 veces en células de hígado. Numeroso factores de transcripción pueden unirse a este enhancer y aunque muchos de ellos son ubicuos (NF-1, AP-1), otros (C/EBP, HNF-4) son específicos del hígado, restringiendo el efecto estimulador de los promotores virales principalmente a los hepatocitos. Sin embargo, la especificidad hepática está determinada por el enhancer II que se sobrelapa con el promotor del gen *core* (Kann, M. & Gerlich, 2005).

El incrementador II ó EnhII se encuentra dentro del promotor del *gen core*. El EnhI parece ser importante a dos niveles, en primer lugar a nivel nucleotídico, debido a que la unión de proteínas del virus o del hospedero a este motivo incrementa la expresión de los genes virales; en segundo lugar también a nivel proteico, al codificar aminoácidos muy específicos para la polimerasa vira (Costa, J. 2002).

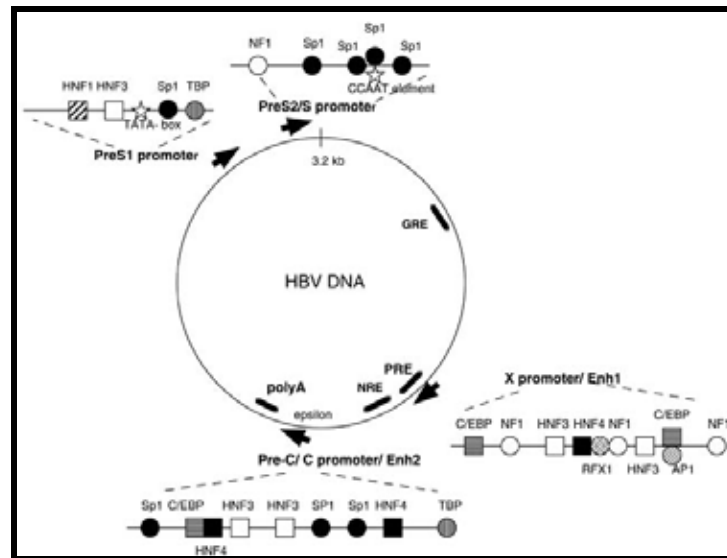


Figura 1.2.4. Elementos reguladores en el genoma de HBV. Se señalan los 4 promotores de cada uno de los ORFs virales, los incrementadores EnhI y EnhII, los elementos de regulación negativa y positiva NRE y PRE, respectivamente así como el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) y las señales polyA y epsilon. Además en cada uno de los promotores se indican los sitios de unión a factores de transcripción ubicuos (círculos) y hepato-específicos (cuadrados). Tomado de Gerlich, W. 1993.

Elemento regulador negativo (NRE)

El elemento regulado negativo o NRE que se encuentra en dirección 5' respecto al Enh II (figura 1.2.5) tiene la capacidad de actuar negativamente sobre el EnhII como en el promotor del *core* (Costa, J. 2002).

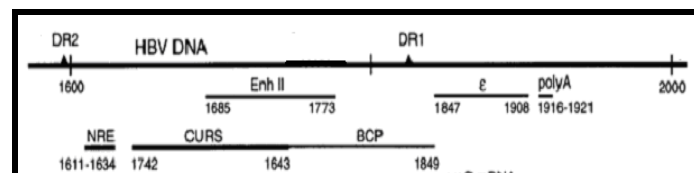


Figura 1.2.5. Elementos en el genoma de HBV. Se muestran el Elemento Regulador Negativo (NER), así como al incrementador II (EnhII) con sus respectivas posiciones dentro del genoma viral. ϵ : señal de encapsulación; poliA: señal de poliadenilación; CURS: Secuencias reguladoras río arriba; BCP: Promotor básico del *core*; DR: repeticiones directas. Modificado de Moriyama, K. 1997.

Región que Responde a Glucocorticoides (GRE).

La región que responde a los glucocorticoides (GRE) es una secuencia situada dentro del gen *s* (figura 1.2.4). Su función consiste en intensificar hasta 5 veces la expresión génica en presencia de glucocorticoides. Este efecto se ha demostrado tanto en células en cultivo como en pacientes infectados ya que al exponerlos glucocorticoides expresaron niveles muy altos de HBeAg y HBsAg (Costa, J. 2002; Kann, M. & Gerlich, 2005).

Señal de encapsulación en el RNA pregenómico (ϵ).

La señal de encapsulación del RNA pregenómico llamada también *epsilon* (ϵ) es dependiente de los genes *c* y *p*, y de la señal ϵ que se encuentra entre las posiciones 1847 y 1907 en dicho RNA pregenómico (figura 1.2.6). Esta señal presenta una estructura secundaria formada por dos regiones con apareamiento intracatenario, una región formada por 6 bases desapareadas llamado tallo y en su extremo otra región también desapareada de 6 bases llamada rizo o asa (Costa, J. 2002).

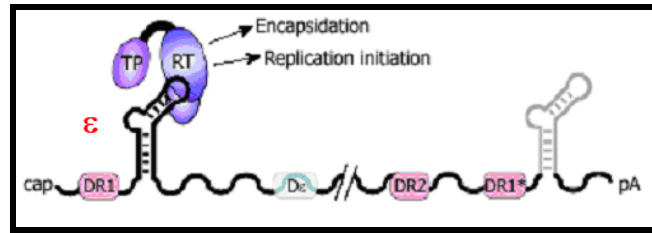


Figura 1.2.6. Señal de encapsidación ϵ . Durante la replicación viral, la señal ϵ se forma en el RNA pregenómico, participa la transcriptasa reversa RT, la proteína terminal TP y se transloca DR1. Modificado de Bruss, V. 2007.

Repeticiones directas cortas (DR).

Las repeticiones directas cortas o DRs son secuencias pequeñas de 11 pares de bases llamadas DR1 y DR2 separadas por 225 bases que intervienen en la replicación viral (figura 1.2.7). El extremo 5' de la cadena negativa se halla dentro de DR1 y el de la positiva en el extremo 3' del DR2 (Costa, J. 2002).

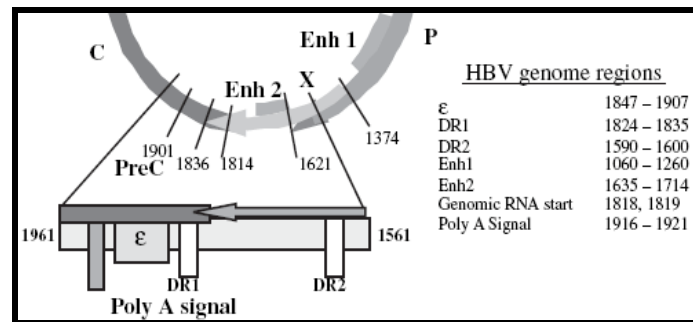


Figura 1.2.7. Elementos funcionales en el genoma de HBV. Se muestran las repeticiones directas DR1 y DR2, la señal de poliadenilación Poly A, la señal de encapsidación ϵ así como la ubicación de los dos incrementadores virales. Sólo se observa la mitad del genoma de HBV. Modificado de www.medscape.com.

1.2.6. Transcripción génica en HBV y su regulación.

El genoma de HBV no sólo contiene las regiones génicas que serán traducidas a productos proteicos virales sino además contiene elementos reguladores de la transcripción génica tal y como se ha descrito anteriormente (figura 1.2.8). Estas secuencias de DNA contienen sitios de unión a proteínas virales y celulares que actúan como factores de transcripción positivos y negativos (Gerlich, W.1993).

El control de la expresión génica en el virus hepatitis B ha sido estudiada utilizando sistemas de replicación *in vitro*. En el genoma de HBV (como en la célula hospedera) existen dos tipos de secuencias de DNA que contribuyen a la unión de factores de transcripción: los *promotores* que son necesarios para la unión de estos factores de transcripción y sitúan a la RNA polimerasa en la posición definida en donde comenzará a transcribirse solo una hebra de DNA. Los *incrementadores* o *enhancers* son segmentos de DNA que potencian el inicio de la transcripción en un promotor dado pero no necesitan situarse en una posición definida junto al promotor y la orientación de su secuencia puede estar invertida sin afectar su función (Baumert, T. *et al.*, 2007).

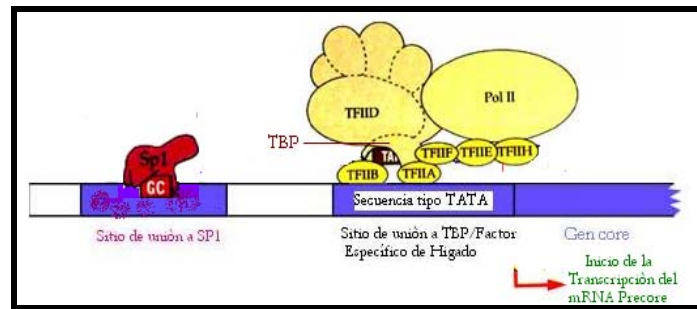


Figura 1.2.8. *Transcripción de un gen viral.* Se muestra un segmento del promotor del *core*, en donde resalta el sitio de unión a TBP, con su unión al DNA viral, se reclutará el Complejo de Iniciación de la Transcripción del mRNA (RNA mensajero) Precore que posteriormente se traducirá como el antígeno *e*. Se requiere la interacción de motivos en el genoma viral con factores de transcripción hepáticos, entre otras moléculas celulares para regular la síntesis y expresión de productos virales.

La tasa de la síntesis de RNA está controlada por la cantidad, tipo y actividad de los factores de transcripción celulares y por la accesibilidad a incrementadotes y promotores. En este contexto, se sabe que cada gen de HBV tiene un promotor que regula su actividad y que esos promotores a su vez están regulados por uno o más de los elementos potenciadores (p.ej., EnhI y EnhII) que se localizan río arriba del promotor. Por tanto, la transcripción y la traducción están finamente regulados a través de 4 promotores separados entre sí y dos potenciadores además de un elemento de respuesta a glucocorticoides (Seeger, C. & Mason, W. 2000).

1.3. Ciclo biológico de HBV y Replicación Viral.

El ciclo biológico del virus de la hepatitis B se caracteriza por la síntesis de DNA circular y relajado (RC-DNA) parcialmente doble por medio de reverso transcripción de un intermediario de RNA, el pregenoma o pgRNA (figura 1.3.1). Los mecanismos de síntesis de DNA están bien caracterizados tanto por estudios genéticos como bioquímicos. En contraste, los eventos tempranos del ciclo viral, incluyendo la entrada, desnudamiento o pérdida de la envoltura viral y la llegada del genoma viral hacia el núcleo no están bien entendidos. Esto se debe en parte, a la ausencia de líneas celulares susceptibles a la infección por este virus (Seeger, C. & Mason, W. 2000).

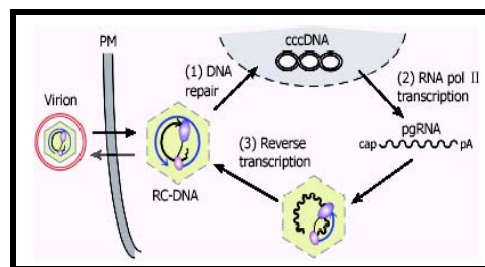


Figura 1.3.1. *Ciclo de replicación del virus de la Hepatitis B.* Los viriones infectan la célula liberando su RC-DNA al citoplasma. El RC-DNA se transporta al núcleo y se repara como cccDNA (1). La transcripción de cccDNA por la RNA polimerasa II (2) produce, entre otros transcritos (no mostrados) pgRNA el cual se encapsula junto con la proteína P y se reverse transcribe dentro de la nucleocápside (3). La síntesis de partir del templado con polaridad negativa genera nuevo RC-DNA. Luego de empaquetarse en la nucleocápside, adquirirá una envoltura y se liberará como virión. PM, membrana plasmática. Tomado de Beck, J. *et al.*, 2007.

Los hepatocitos son el sitio primario de replicación de DNA viral. Se ha propuesto que su especificidad tisular está controlada principalmente por un receptor hepático específico. Sin embargo, el hepato-tropismo también se manifiesta a nivel de expresión génica viral como se mencionó en la sección anterior. Además, una variedad de estudios han indicado una selectividad del virus por la infección productiva sólo en algunos tipos celulares. Algunos reportes indican que los linfocitos son

blancos de infección para el virus de la hepatitis B y podrían representar un reservorio para la persistencia viral (Seeger, C. & Mason, W. 2000).

1.3.1. Replicación Viral

La replicación del genoma de doble hebra ocurre por un mecanismo único en este virus de DNA que involucra la transcripción reversa de DNA a un intermediario de RNA; por ello los hepadnavirus a veces se han catalogado como retrovirus por su similitud en la estrategia de replicación con los virus de RNA. Así, el virión se une al hepatocito por medio de la proteína pre-S1 y entra por endocitosis mediada por receptor (figura 1.3.2). Después de la remoción de la envoltura, la nucleocápside se transloca hacia el núcleo y el genoma viral es liberado. La hebra corta positiva se completa generando una molécula DNA circular y relajada (RC-DNA). En su momento, esta molécula será convertida a una forma circular cerrada covalentemente (ccc-DNA) mediante la eliminación de la proteína terminal de la hebra negativa y del oligo-ribonucleótido de la hebra positiva, así como la ligación de los extremos terminales del DNA. Esta forma circular se tensará de modo tal que adquirirá una forma super-enrollada (SC-DNA), este DNA funcionará como templado para la transcripción por la RNA polimerasa II celular (White, D. & Frenner, F. 1994).

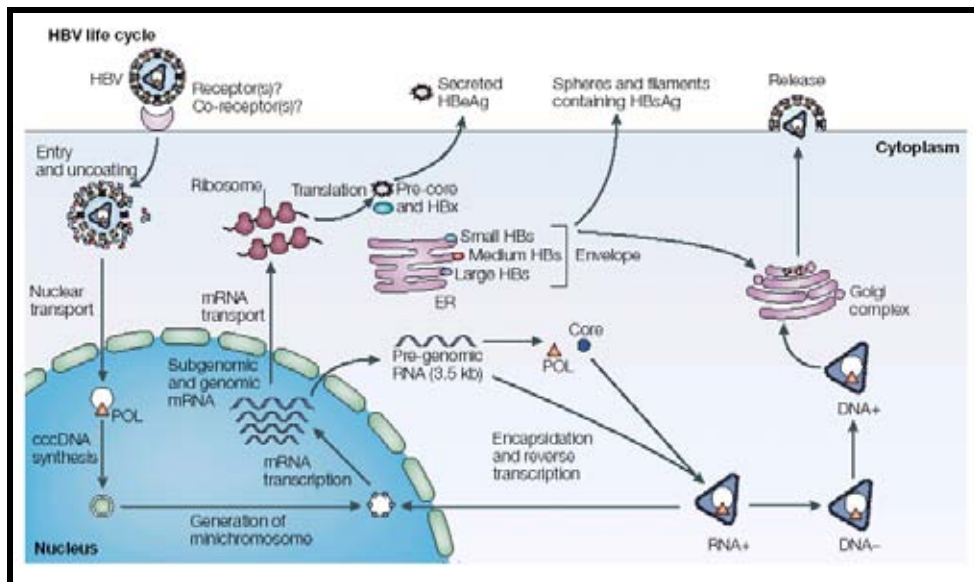


Figura 1.34.2. Ciclo de vida de HBV. Después de la entrada a la célula, las nucleocápsides virales transportan su contenido genómico hacia el núcleo, en donde el DNA circular relajado se convierte a DNA circular cerrado. El cccDNA funciona como templado para la transcripción de 4 mRNAs virales los cuales se exportan hacia el citoplasma para la traducción de proteínas virales. El RNA más grande también funciona como templado para la replicación, la cual ocurre dentro de las nucleocápsides en el citoplasma. Las nucleocápsides adquieren una envoltura lipídica durante su paso a través del retículo endoplásmico (ER) o en el complejo Golgi y los viriones son secretados por la célula. Tomado de Rehmann, R. & Nascimbeni, M. 2005. La hebra negativa sólo se transcribirá para producir los RNA mensajeros: XmRNA, SmRNA y LmRNA de 0.7, 2.1 y 2.4 Kb, respectivamente; además de un transcrito de RNA de 3.4 Kb conocido como *Pregenoma* o pgRNA. Después del transporte hacia el citoplasma, las especies de 3.4 Kb se traducirán produciendo los antígenos Core y la Polimerasa, mientras que el transcrito XmRNA se traducirá a la proteína X. Los SmRNA y LmRNA se traducirán desde diferentes codones de inicio que producirán las tres formas de los antígenos S (White, D. & Frenner, F. 1994; Seeger, C. & Mason, W. 2000).

En la replicación del genoma viral, el pgRNA se asocia con la polimerasa y las proteínas Core para formar una nucleocápside inmadura en el citoplasma. Dentro de esta estructura, la reverso transcriptasa en conjunto con la proteína terminal codificada por el virus, transcribe una hebra complementaria negativa de DNA. Mientras tanto, la RNasa degrada el templado de RNA desde el extremo 3' dejando un oligorribonucleótido corto en el extremo 5' el cual después de la transposición al apareamiento de bases

con sitios complementarios en la hebra recién sintetizada, servirá como iniciador o *primer* para la DNA polimerasa que transcribirá una hebra de DNA positivo (figura 1.3.2). Algunas de las partículas de la nucleocápside, que contienen DNA viral recién sintetizado serán recicladas hacia el núcleo para aumentar la cantidad de genomas HBV disponibles para la transcripción. Los restantes serán ensamblados como viriones antes de que la hebra positiva sea completada. Los viriones se liberarán de una manera *tipo gemación* a través de aquellas áreas del retículo endoplásmico en las cuáles los antígenos L, M y S han sido insertados y con ello la adquisición de una envoltura lipídica con HBsAgs. Así, los viriones serán transportados por medio de vesículas hacia el exterior sin lisis celular (Rehermann, R. & Nascimbeni, M. 2005).

1.4. Patogénesis de la infección por HBV.

A pesar de que la respuesta inmunes específicas hacia algunos virus es protectora, esta misma respuesta puede ser también mediadora de la patología tisular. Frecuentemente, en el hospedero se montan reacciones inflamatorias no específicas aumentando con ello el potencial de daño celular. Consecuentemente, ambos mecanismos específicos y no específicos al virus llevan invariablemente al daño en los sitios de replicación viral, en este caso en el hígado. La magnitud de tal daño depende del vigor y carácter de la respuesta inflamatoria (Rehermann, R. & Nascimbeni, M. 2005). En la actualidad, existe un gran consenso acerca de que el daño hepático ocasionado por el virus de la hepatitis B, se atribuye a la respuesta inmunitaria del hospedero (particularmente, la respuesta de las células T específica al virus) que provoca la inflamación del hígado. El virus infecta los hepatocitos pero no es citopático. El virus estimula el desarrollo de células citotóxicas específicas que destruyen a los hepatocitos infectados. El hígado de pacientes con hepatitis aguda y crónica contiene grandes cantidades de linfocitos T CD8⁺ y en muestras de biopsias hepáticas es posible aislar células citotóxicas restringidas por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I (MHC-I) específicas al virus (Abbas, A. *et al.*, 2004). En contraste a la respuesta fuerte y multi-específica de las células T a HBV durante la fase aguda, los pacientes con hepatitis crónica tienden a tener respuestas inmunes débiles y poco eficientes. Los efectos immuno-modulatorios del HBeAg pueden jugar un papel importante en la tolerancia de las células T al virus. Un mecanismo para favorecer la persistencia viral en adultos es el desarrollo de mutaciones virales de escape (figura 1.4.1); así como también las disfunción celular T. La carga viral alta puede ser un factor que contribuye a la falla de las células T, incluyendo también la falta de células T CD4⁺ específicas, así como las células T reguladoras que participan en esta supresión (Baumert, T. *et al.*, 2007).

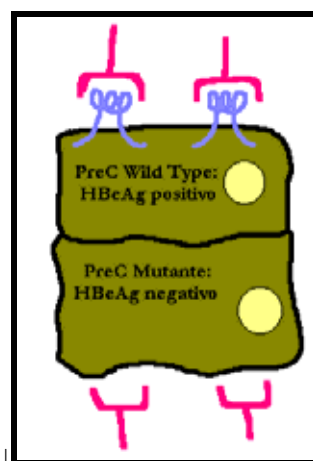


Figura 1.4.1. Evasión del sistema inmune. Si el antígeno *e* (HBeAg) no es expresado en una célula en donde existen mutaciones virales en la región PreC, entonces la célula nunca es eliminada por parte de mecanismos inmunitarios mediados por anticuerpos específicos a este antígeno viral. Modificado de Carman, W. *et al.*, 1993.

1.5. Características clínicas de la Hepatitis B.

En general, la hepatitis B tiene una etapa aguda que puede o no tener síntomas. Después la infección evoluciona a una etapa crónica que puede presentar síntomas y signos clínicos o bien puede ser asintomática; en estos casos los pacientes se denominan *portadores*. La mayoría de las infecciones por HBV son subclínicas, particularmente durante la niñez, sin embargo un tercio de las infecciones en adultos son ictericas (Horn, L. 2005).

1.5.1. Hepatitis Aguda

El curso de la hepatitis viral aguda se divide en tres fases (White, D. & Frenner, F. 1994; Horn, L. 2005):

1. **Pre-ictérica.** Después de un largo período de incubación de 6-26 semanas (también denominada *prodromal*) el paciente presenta malestar, letargo, anorexia y comúnmente náuseas, vómito y dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen. Una minoría de los pacientes desarrollan también fiebre, salpullido urticante y poliartritis.
2. **Ictérica.** Después de 2 días a 2 semanas de que comenzó la fase prodromal, comienza esta fase icterica que se caracteriza por la bilirrubinuria (oscurecimiento de la orina y heces de color pálido) e ictericia (cambios en el color de la piel) y esclerótica (región blanca del ojo) debido a la alta concentración de bilirrubina en sangre y orina (figura 1.5.1). En esta fase aumentan los niveles de la enzima ALT (alanina aminotransferasa) en circulación, dicho aumento y su detección pueden utilizarse como diagnóstico de la enfermedad.
3. **Convaleciente.** Esta puede tener una duración de hasta 6 meses con malestar y fatiga. El paciente puede estar en una condición “aparentemente” normal.



Figura 1.5.1. Síntomas clínicos de mayor relevancia durante la etapa aguda en la infección por HBV. En el lado izquierdo se muestra la piel icterica característica que se atribuye que se elevan los niveles de bilirrubina en circulación. En el lado derecho se muestra la esclerótica ocular (región blanca del ojo) icterica. Tomado de www.adam.com.

Las consecuencias de la etapa aguda son diversas (cuadro 1.5.2): como la *Hepatitis fulminante* que es muy rara y se presenta en 1% de los casos HBV. El paciente muestra disminución en el tamaño del hígado, necrosis y un aumento de sustancias tóxicas en circulación. En algunos pacientes se puede regenerar completamente el hígado dentro de 2-3 meses pero otros progresan hacia una infección crónica (White, D. & Frenner, F. 1994; Horn, L. 2005). La *Encefalopatía Hepática* puede presentarse después de que el daño al hígado ha sido considerable y con ello el daño a otros órganos como el riñón lo cual resulta fatal para el organismo; el paciente puede caer en coma y las sustancias tóxicas acumuladas en sangre entran al cerebro dañándolo por muerte celular y falta de oxígeno (Horn, L. 2005).

Cuadro 1.5.2 Consecuencias clínicas de la infección por el virus de la Hepatitis B.*

Infección Aguda			Infección Crónica		
90-99 % en adultos y niños (8-15 años)			1-10 % en adultos y niños (8-15 años)		
5-20 % en neonatos e infantes			80-95 % en neonatos e infantes		
Asintomática	Hepatitis Ictérica	Hepatitis Fulminante	Asintomática	Hepatitis Crónica Persistente	Hepatitis Crónica Activa
Encefalopatía					Cirrosis
					Carcinoma Hepatocelular

* White, D. & Frenner, F. 1994.

1.5.2. Hepatitis Crónica.

La etapa crónica se define como la presencia persistente de HBsAg en el suero de un individuo por 6 meses o más tiempo (Seeger, C. & Mason, W. 2000). Después de la infección aguda, el riesgo de presentar hepatitis crónica varía inversamente con la edad, por ejemplo, hasta un 90% de los niños infectados desde el nacimiento o durante el primer año de vida llegarán a presentar hepatitis viral crónica. El riesgo de cronicidad disminuye de 25-50% en los niños de 1 a 5 años y del 5 al 10% en niños mayores y adultos infectados ya que éstos tienden a resolver espontáneamente la enfermedad (Roman, S. *et al.*, 2005).

En esta etapa, el paciente puede estar libre de síntomas con evidencia bioquímica de actividad continua de las transaminasas hepáticas como AST y ALT y puede presentar fatiga en general. El diagnóstico se confirma cuando el paciente resulta ser HBsAg positivo y las transaminasas séricas se incrementan modestamente. La mayoría de las veces la hepatitis crónica es silenciosa. En alrededor de la mitad de los pacientes, la presentación es una enfermedad del hígado crónica con ictericia, hipertensión, etc. (Gerlich, W. 1993).

El curso típico de un portador de hepatitis B puede clasificarse en dos fases: una de replicación alta y otra baja. En la *fase replicativa alta* (o fase productiva) una tasa alta de replicación viral ocurre en el hígado; así como también títulos altos de DNA y antígenos virales en su compartimiento periférico. El virus se replica en células de hígado y puede continuar así por varios años, lo que puede ocasionar un incremento notable de la viremia y una alta probabilidad de contagio por parte del paciente hacia otras personas (White, D. & Frenner, F. 1994). En contraste, *la fase replicativa baja* (o fase restrictiva) está caracterizada por baja viremia, antígenos virales en cantidades extremadamente pequeñas y la ausencia del HBeAg pero si hay presencia de anti-HBe. Cuando el paciente deja de ser positivo para HBeAg y positivo para anticuerpos anti-HBe, se dice que el paciente ha *seroconvertido* lo que representa una mejoría notable en el curso clínico de la enfermedad (White, D. & Frenner, F. 1994).

Entre las complicaciones de esta etapa crónica que pueden presentarse 10 años o más después de la infección, se encuentran la **Cirrosis Hepática** (condición amarilla) que se presenta en un 30 % de los pacientes con hepatitis crónica y esta se puede agravar con la ingesta prolongada de alcohol (figura 1.5.3). Otra complicación es el **Carcinoma Hepatocelular** que se presenta después de 10 años. El hecho de padecer cirrosis incrementa el riesgo de cáncer y se presenta en 20 % de las personas con HBV crónica que están entre los 35 y 65 años de edad (Horn, L. 2005).



Figura 1.5.3. *Cirrosis hepática.* Corte transversal de un hígado que muestra la condición amarilla o cirrosis en un paciente *post-mortem* con hepatitis B crónica. Tomado de <http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig47>

1.6. Rutas de Transmisión de HBV.

El principal hospedero de la hepatitis B es el humano. Las rutas de transmisión del virus de la hepatitis B entre individuos se han clasificado en cuatro grupos principalmente (figura 1.6.1): *parental* a través de contacto con sangre o hemoderivados infecciosos, *sexual*, *perinatal* o vertical (maternofetal) y *horizontal* que se refiere a otro tipo de contacto con una persona infectada (Rehermann, R. & Nascimbeni, M. 2005; Roman, S *et al.*, 2005).

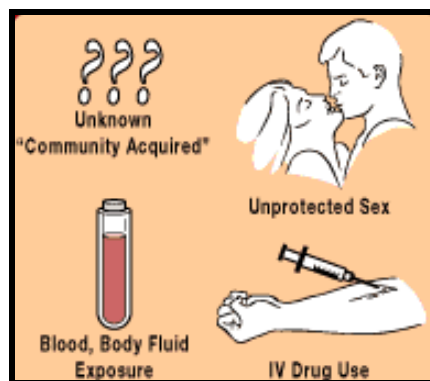


Figura 1.6.1. *Rutas de transmisión de la hepatitis B.* Se muestran algunos ejemplos de infección, como son el contacto con fluidos infecciosos, material punzo cortante (jeringas), contacto sexual sin protección y la adquisición en una comunidad de personas infectadas y no que aún permanece por dilucidarse (también denominada *intrafamiliar*). Tomado de [www. cdc.com](http://www.cdc.com)

La entrada del virus de la hepatitis B a su hospedero es a través del contacto con cualquier fluido como la sangre o secreción corporal como el semen. Una vez dentro, el virus llega a la circulación sanguínea y luego hacia el hígado en donde dado su tropismo, infecta sus células blanco como sitio de replicación: predominantemente los hepatocitos. Los hepatocitos infectados secretan partículas virales completas también llamadas *viriones* lo que lleva a concentraciones de 10^8 - 10^{10} partículas por mililitro de suero (viremia). La gran mayoría de los viriones no se une a algún tipo celular aunque su replicación se ha reportado en ciertas subpoblaciones de leucocitos y en células epiteliales del ducto biliar primario. El significado de la viremia persistente parece ser obvia; si este virus es incapaz de replicarse en células de la mucosa, requiere de la circulación sanguínea del hospedero para abandonar el sitio de replicación así como para alcanzarlo en un nuevo individuo infectado. Así, la viremia representa un mecanismo esencial de existencia y dispersión entre las poblaciones de su hospedero (Kann, M. & Gerlich, W. 2005).

Este virus se ha identificado en prácticamente todas las secreciones corporales. El HBV no puede atravesar piel y mucosas intactas, sin embargo, cualquier lesión mínima e insignificante permite su transmisión ya que existe mayor concentración del virus en la sangre y en fluidos corporales como semen y saliva (Román, M. *et al.*, 2005).

La vía de transmisión principal de la infección en una determinada región es distinta de acuerdo a la categoría endémica de la zona geográfica en cuestión; por ejemplo, en los países del sureste de Asia, África y China en donde la prevalencia es alta, la vía de transmisión principal es vertical, de madres portadoras a sus hijos u horizontal de un niño a otro. En cambio, en los países occidentales donde la prevalencia es baja, el mecanismo de transmisión es a través de la vía perenteral o percutánea con sangre y hemoderivados infecciosos, o sexual con portadores del virus. Bajo este contexto, los grupos de alto riesgo son los hemofílicos, pacientes con hemodiálisis, profesionales de la salud, usuarios de drogas intravenosas, heterosexuales y homosexuales promiscuos y trabajadoras sexuales (Román, M. *et al.*, 2005). En un sentido general, las rutas comunes de contagio son las transfusiones sanguíneas, trasplantes, intercambio de jeringas entre adictos, relaciones sexuales sin protección, contacto accidental con fluidos corporales de personas infectadas, cortadas con material punzo cortante infectado, perforaciones, acupuntura, tatuajes, rastrillos, etcétera (Horn, L. 2005).

Así mismo este virus puede entrar a otros fluidos corporales como saliva, semen, lágrimas, sudor y fluidos vaginales, así como de la madre al feto. Se ha considerado que el HBV es más infeccioso que el virus del inmunodeficiencia humana (HIV) debido a su capacidad resistir condiciones ambientales más extremas que HIV (Horn, L. 2005).

1.7. Diagnóstico.

Cuando un paciente se presenta con síntomas clínicos que son característicos de una infección aguda con daño del hígado se hacen los análisis sanguíneos correspondientes. Si los resultados revelan que el paciente tiene niveles elevados de ALT, bilirrubina y la presencia de HBsAg, existe una fuerte probabilidad de que se trate de hepatitis B. Sin embargo, el diagnóstico de otros pacientes puede no ser tan directo. Mientras que la presencia en suero de HBsAg en la enfermedad aguda es común, en pocos pacientes existen niveles indetectables en el momento en que el análisis clínico se realice. En algunos casos de hepatitis aguda o sub-aguda permanecen sin diagnóstico y lo consiguiente pasa desapercibido. Todavía otros pacientes pueden desarrollar un estado de portador asintomático, es decir crónico no reconocido. La presencia de HBsAg en suero continua siendo el diagnóstico de elección y el marcador de tamizaje para la hepatitis B (Decker, R. 1993).

1.7.1. Serología.

La serología representa la base para el diagnóstico de la hepatitis B y para la diferenciación entre una y otra de las formas clínicas de esta enfermedad. En el diagnóstico de la hepatitis B, existen 6 marcadores (los antígenos virales HBsAg, HBeAg así como DNA viral; y los anticuerpos anti-HBs, anti-HBe y anti-HBc) que pueden ser detectados en suero y que pueden dar una idea general del curso clínico del paciente (cuadro 1.7.1); ya sea si éste se encuentra en la etapa aguda o crónica de la infección (White, D. & Frenner, F. 1994).

Cuadro 1.7.1. Patrones de los principales marcadores para diferenciar entre las etapas aguda y crónica de Hepatitis B.*

Marcador	Aguda	Crónica
HBsAg	Positivo, desaparece	Positivo, persiste
Anti-HBc IgM	Positivo, alto	Bajo o negativo
Anti-HBc total	Positivo	Positivo
HBeAg/anti-HBe	Ag positivo con seroconversión a Ab	HBeAg o anti-HBe
DNA HBV	Positivo, desaparece	Alto o bajo, persistente
Anti-HBs	Aparece después de la recuperación	Usualmente negativo

*

Decker, R. 1993.

La infección aguda con HBV se caracteriza por la presencia del HBsAg en la sangre un mes o dos después de la infección, alcanzando un pico breve antes de que los síntomas se desarrollen y que después desaparecerá gradualmente coincidiendo con la caída en los niveles de transaminasas (figura 1.7.2). El DNA viral y el HBeAg aparecerán casi al mismo tiempo que el HBsAg pero desaparecerá abruptamente cuando los síntomas y los niveles enzimáticos alcancen un pico. El primer anticuerpo detectado es anti-HBc el cual aparece frecuentemente antes de la presencia de síntomas. Los anticuerpos anti-HBs por otra parte, no son detectables sino hasta que el HBsAg ha sido eliminado y la recuperación es completa (usualmente dentro de un año), además hay casos en donde hay una período en donde ni HBsAg ni el anti-HBs son detectables siendo el anti-HBc el único marcador positivo de infección (Rehermann, R. & Nascimbeni, M. 2005).

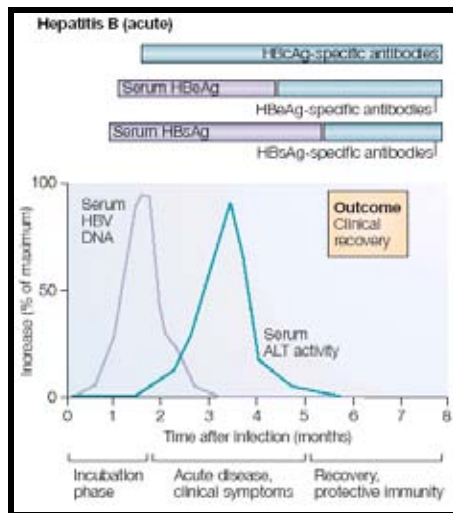


Figura 1.7.2. Curso clínico y virológico de la etapa aguda de la infección con HBV. Se observa la aparición de anticuerpos específicos al antígeno de superficie HBV y las células T específicas confieren inmunidad protectora a largo plazo. Tomado de Rehermann, R. & Nascimbeni, M. 2005.

La infección crónica se distingue del estado de portador asintomático por la progresión del daño hepático que se indica por la elevación continua de los niveles séricos de transaminasas y evidencia patológica en biopsias de hígado. La persistencia de HBV DNA, polimerasa viral y HBeAg implican una multiplicación viral activa, alta infectividad y daño hepático progresivo, características de una fase replicativa alta. En contraste, el anti-HBe el cual se desarrolla solo después de que el HBeAg

desaparece y los niveles enzimáticos han declinado, indica un estadio largo y latente de portador, características de una fase replicativa baja (Decker, R. 1993).

Finalmente, el cuadro 1.7.3 resume los patrones de marcadores de serológicos que caracterizan las condiciones clínicas de la infección por HBV. Nótese que los marcadores claves son HBsAg, anti-HBs, Anti-HBc y DNA viral; el patrón de estos puede distinguir situaciones importantes en el curso clínico del paciente. El único y más confiable marcador de la infección ya sea en el pasado o presente de la infección es el anti-HBc. La persistencia de DNA viral en la hepatitis crónica activa pronostica una desfavorable consecuencia clínica a largo plazo y el anti-HBs, aparece sólo después de que el HBsAg ha desaparecido, siendo así un indicador confiable de recuperación e inmunidad a la re-infección (White, D. & Frenner, F. 1994).

Cuadro 1.7.3. Marcadores Serológicos de la infección por el virus de la Hepatitis B

Condición clínica	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc total	Anti-HBc IgM	HBeAg	Anti-HBe	DNA viral
Hepatitis aguda	+	-	+	++	+/-	+/-	> ó < 10 ⁵ copias/mL
Hepatitis crónica activa	+	-	+	+	+	-	>10 ⁵ copias/mL
Portador asintomático	+ (a)	-	+	- (b)	-	+	<10 ⁵ copias/m (c)

(a) Persistente por más de 6 meses

(b) Bajos títulos

(c) Muy bajos títulos

*White, D. & Frenner, F. 1994.

1.7.2. Pruebas de Funcionamiento Hepático.

El término *pruebas de función hepática* es aplicado a una variedad de pruebas de sangre para averiguar el estado general del hígado y del sistema biliar. En principio, existen dos categorías generales de enzimas hepáticas. El primer grupo incluye las enzimas transaminasas: alaninoaminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST). Estas son enzimas indicadoras del daño a la célula hepática. El segundo grupo incluye ciertas enzimas hepáticas, como la fosfatasa alcalina (alk. phos.) y la gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) las cuales indican obstrucción del sistema biliar, ya sea en el hígado o en los canales mayores de la bilis que se encuentran fuera de este órgano. Por ello, las pruebas bioquímicas rutinarias de función hepática distinguen hepatitis virales de muchas no virales (American Liver Foundation, 1997).

Las ALT y AST son enzimas en las células hepáticas que permean hacia la circulación sanguínea cuando existe daño en la célula hepática. Se cree que la ALT es un indicador más específico de la inflamación hepática, mientras que la AST puede aparecer elevada en enfermedades de otros órganos, como el corazón o el músculo. En caso de daño severo en el hígado, como en la hepatitis viral aguda, la ALT y la AST pueden estar elevadas desde niveles de centenas hasta más de 1,000 U/L. En la hepatitis viral aguda o en la cirrosis, el aumento de estas enzimas puede ser mínimo (menos de 2-3 veces de lo normal) o moderado. Aumentos leves o moderados de la ALT o la AST son no-específicos y pueden estar causados por una extensa gama de enfermedades hepáticas. La ALT y la AST son a menudo marcadores para valorar el avance de la hepatitis crónica, y la respuesta al tratamiento con interferón (American Liver Foundation, 1997).

La bilirrubina se produce cuando se degrada una sustancia en eritrocitos llamada *heme*. Se obtiene de la sangre que es procesada a través del hígado y luego es segregada por el hígado a la bilis. Las personas normales tienen una cantidad pequeña de bilirrubina circulando en la sangre. Algunos trastornos, como la enfermedad hepática o la destrucción de los glóbulos rojos, ocasionan un incremento de la bilirrubina en la sangre. La bilirrubina puede elevarse en muchos tipos de enfermedad hepática o del tracto biliar, y también por razones no-específicas. Sin embargo, la bilirrubina en sangre es considerada generalmente como un valor real de la función hepática porque refleja la habilidad del hígado de recoger, procesar y segregar la bilirrubina a la bilis (American Liver Foundation, 1997).

En la Hepatitis B, la ALT y la AST se elevan posteriormente al periodo de incubación viral; se puede detectar un pico justo en el momento en que aparece el malestar general en el paciente; posteriormente esos valores disminuirán hasta ser normales en los siguientes dos meses. La bilirrubina sérica puede elevarse 25 veces más sobre el nivel normal dependiendo de la severidad del caso (White, D. & Frenner, F. 1994).

1.8. Tratamiento.

El tratamiento antiviral es una de las estrategias para reducir la morbilidad y mortalidad durante la etapa crónica de la hepatitis B. El objetivo de este tratamiento es controlar la replicación viral manteniendo en la medida de lo posible, una carga viral baja en el paciente y permitir la recuperación del hígado, evitando con ello la progresión de la hepatitis crónica y las complicaciones de la cirrosis hepática (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006).

1.8.1. Quimioterapia.

Las drogas antivirales actuales para el tratamiento de la hepatitis crónica incluyen el interferón alfa (IFN- α), Lamivudina (3TC) y Adefovir dipivoxil, entre otros (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006). Los interferones han sido de gran utilidad en el tratamiento de la Hepatitis B crónica aunque en general su eficacia es poco notable, además de que se asocia a efectos secundarios no deseables (Seeger, C. & Mason, W. 2000). El IFN- α actúa directamente suprimiendo la replicación viral dentro de los hepatocitos, por medio de la degradación de los mRNAs del virus y estimulando indirectamente al sistema inmune. Cuando el interferón está contraindicado o es inefectivo, lo recomendable es continuar el tratamiento con Lamivudina o Adefovir (Seeger, C. & Mason, W. 2000; Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006).

En el caso de la Lamivudina y el Adefovir, éstas son moléculas análogas a nucleótidos (figura 1.8.1), que teóricamente actúan inhibiendo la función enzimática de la RNA polimerasa de HBV y como consecuencia la eliminación de la réplica viral (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006).

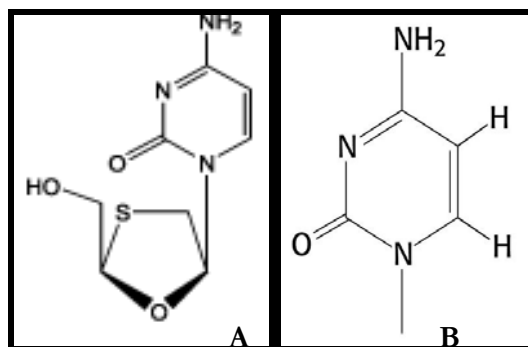


Figura 1.8.1. Estructura química de un fármaco antiviral análogo a nucleótidos. A). Lamivudina (3TC) y B). Citosina (nucleótido). Modificado de www.aidsmap.com

La Lamivudina es efectiva y bien tolerada pero requiere una terapia por largo tiempo y se asocia con resistencia a fármaco. El Adefovir dipivoxil han proveído eficacia y una muy baja frecuencia de resistencia a fármacos antivirales pero se ha asociado con un pequeño riesgo de reversión a nefrotoxicidad. Una terapia combinada puede ser mas efectiva que la monoterapia (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006).

En teoría, la supresión de la replicación viral por un tiempo suficientemente largo debería permitir la eliminación total tanto de los hepatocitos infectados como de los linfocitos y otros reservorios. En la práctica, las variantes resistentes a Lamivudina pueden reemplazar a los viriones silvestres o WT después de un año de tratamiento (Seeger, C. & Mason, W. 2000). La resistencia a Lamivudina se ha asociado a mutaciones en el gen de la polimerasa de HBV (ORF P). En la actualidad, la Lamivudina no se utiliza en países desarrollados y se sabe poco sobre la resistencia primaria a este fármaco. En México, se ha estudiado escasamente este proceso de fármaco-resistencia en pacientes con HBV; no obstante, ya hay reportes sobre resistencia a Lamivudina en el genotipo H (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006).

Interferón pegilado.

El primer tratamiento que se autorizó para el tratamiento de la hepatitis B fue el interferón- α , aunque el interferón pegilado (Peg-IFN) demostró mejores resultados con respecto al interferón α . Actualmente es uno de los antivirales más utilizados en el tratamiento de la hepatitis crónica (Seeger, C. & Mason, W. 2000).

El interferón pegilado (interferón-PEG) es una presentación farmacológica del interferón que se obtiene mediante la unión fisicoquímica de una molécula de interferón alfa recombinante a una molécula de polietilenglicol (PEG). La conjugación de proteínas con polietilenglicol es para retrasar su eliminación del organismo, prolongar y mantener su actividad y, en consecuencia el compuesto resultante es muy estable y tras su administración se produce una liberación rápida del interferón (Seeger, C. & Mason, W. 2000).

Este antiviral es superior a la Lamivudina en el tratamiento de primera línea en pacientes con hepatitis crónica y que son antígeno *e* positivos. Sin embargo, el tratamiento con peg-IFN se ha asociado con un índice mucho mayor de acontecimientos adversos (sobre todo fiebre, cansancio, dolor de cabeza) en comparación con Lamivudina (Seeger, C. & Mason, W. 2000).

1.8.2. *Vacunas.*

Paradójicamente, una vacuna efectiva en contra de Hepatitis B se produjo y licenció en 1981 a pesar de que este virus no había sido cultivado totalmente *in vitro*. Debido a que es posible encontrar altas concentraciones de HBsAg en suero de portadores HBV, se desarrolló el prototipo de una vacuna purificando las partículas HBsAg directamente de su fuente. Esta vacuna derivada de plasma se sigue produciendo y ampliamente utilizada, particularmente en ciudades desarrolladas, sin embargo eventualmente ha sido sustituida por la primera vacuna de ingeniería genética (White, D. & Frenner, F. 1994).

A mediados de la década de los 80, el gen HBsAg se clonó en un plásmido, que luego se utilizó para transfectar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la forma no glicosilada de la partícula HBsAg producida se extrajo y purificó para su uso. Esta vacuna recombinante se adsorbe con hidróxido de aluminio como adyuvante y se administra por inyección intramuscular en un esquema de 3 dosis. No genera efectos secundarios en las personas vacunadas a reserva de una fiebre leve (5-20%) y los niveles protectores de anticuerpos neutralizantes es de un 90 % y hasta 95% en neonatos. De los que no responden, solo la mitad *seroconvierte* seguido de un segundo esquema de inmunización. Un refuerzo de vacuna se recomienda después de 10 años (White,

D. & Frenner, F. 1994). Las vacunas recombinantes HBsAg están siendo continuamente redefinidas. Primero, la inclusión de una secuencia de nucleótidos que codifiquen para las regiones pre-S1 y pre-S2 en los *constructos* génicos incrementan la inmunogenicidad de las partículas proteicas resultantes. Segundo, los HBsAg producidos en líneas celulares de ovario de hámster (CHO), se glicosilan normalmente adquiriendo un parecido mas natural al producto humano. Tercero, la encapsulación del HBsAg en un poliglicano o en otra matriz puede incrementar la inmunogenicidad al crear un depósito desde el cual el antígeno se libera lentamente o a pulsos. Finalmente, el gen HBsAg se ha incorporado en el virus Vaccinia o Adenovirus recombinantes demostrando alto protección en el hospedero (Seeger, C. & Mason, W. 2000).

1.9. Variantes Moleculares de HBV

Es posible encontrar variantes múltiples en un solo hospedero. La diversidad genética dentro de una aislado se refiere como variación *quasi-especies* (Karayiannis, P. *et al.*, 2005). Esto es particularmente evidente en el caso de los retrovirus y virus de RNA (figura 1.9.1). Tal heterogeneidad poblacional se debe a la alta tasa de incorporación incorrecta de nucleótidos durante la replicación del RNA o la reverso transcripción acoplado con la inhabilidad de corregir esos errores (la enzimas carecen de capacidad correctora o *proof-reading*). Así, existen varios mecanismos que llevan a las mutaciones en genoma de HBV. La proteína P viral probablemente carece de funciones correctoras y junto con la RNA polimerasa II, representan la fuerza de mayor peso en la emergencia de mutaciones puntuales en HBV. Las deleciones e inserciones podrían crearse por cambio de templado durante la retro-transcripción, edición o *splicing* del RNA, ligación/segmentación por la Topoisomerasa I y recombinación no homóloga de moléculas de DNA viral (Burda, M. *et al.*, 2001). El promedio de mutación es de 1 en 100 000 a 1 en 1000 reemplazamientos puntuales, deleciones o inserciones por nucleótido y ciclo de replicación (Carman, W. *et al.*, 1993; Brunetto, M. *et al.*, 1999).

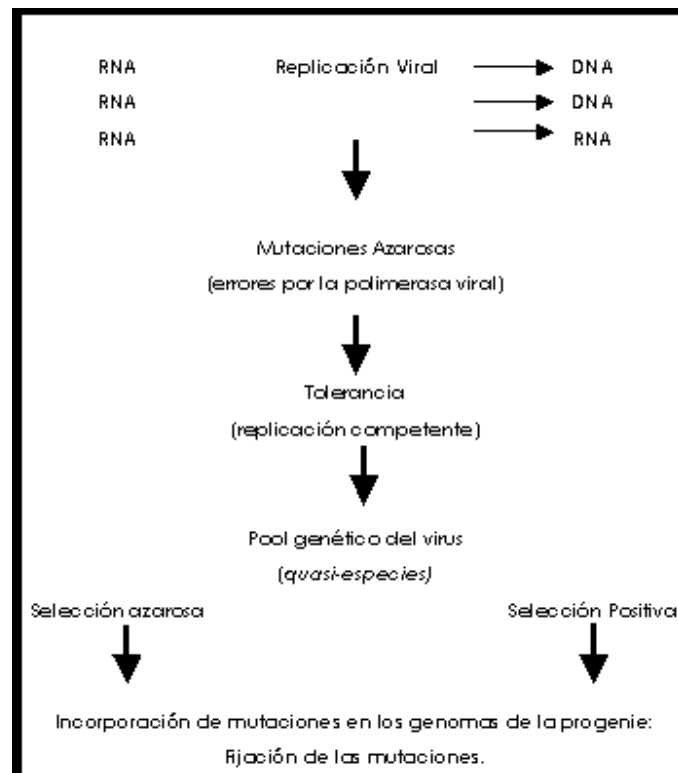


Figura 1.9.1. Evolución viral de un genotipo dentro del hospedero. Las mutaciones azarosas ocurren durante la replicación de los virus de DNA, RNA y retrovirus debido al error de transcripción. Para esos virus mutantes que persisten al pool viral, la mutación debe dejar competente la replicación del virus. Desde este pool de *quasi-especies*, varias presiones de selección se aplican alterando la proporción de esas *quasi-especies*, es decir, la fijación de mutaciones. Tomado de .Carman, W. *et al.*, 1993.

La tasa de replicación es un factor importante en la evolución genética de una población viral. Los virus que ocasionan infecciones agudas en numerosos miembros de una población grande o infecciones crónicas exhiben cambio genético rápido (Carman, W. *et al.*, 1993).

Después de un proceso de mutación, ocurre la selección por parte del hospedero para los genotipos más aptos o *adecuados* (figura 1.9.2). Esta *adecuación* puede ser definida a nivel celular (predominarán los virus que se repliquen más eficientemente en un tipo celular) o a nivel extra celular (llegarán a ser dominantes los virus que eviten la eliminación por parte del sistema inmune). El proceso de selección inmune probablemente está determinado por los genes de respuesta inmune del hospedero. Las mutaciones azarosas pueden ser letales o deletéreas para el virus y por lo tanto deberán ser seleccionadas negativamente. Sin embargo, las mutaciones puntuales frecuentemente no tienen un efecto fenotípico, ya sea por la redundancia del código genético de modo que algún cambio nucleotídico puede no resultar en el cambio de aminoácido o por que el cambio no afecta la estructura secundaria del RNA o de la proteína. No obstante, la fuerza mayor de cambio evolutivo dentro de una población viral es la selección positiva por parte del hospedero (Carman, W. *et al.*, 1993).

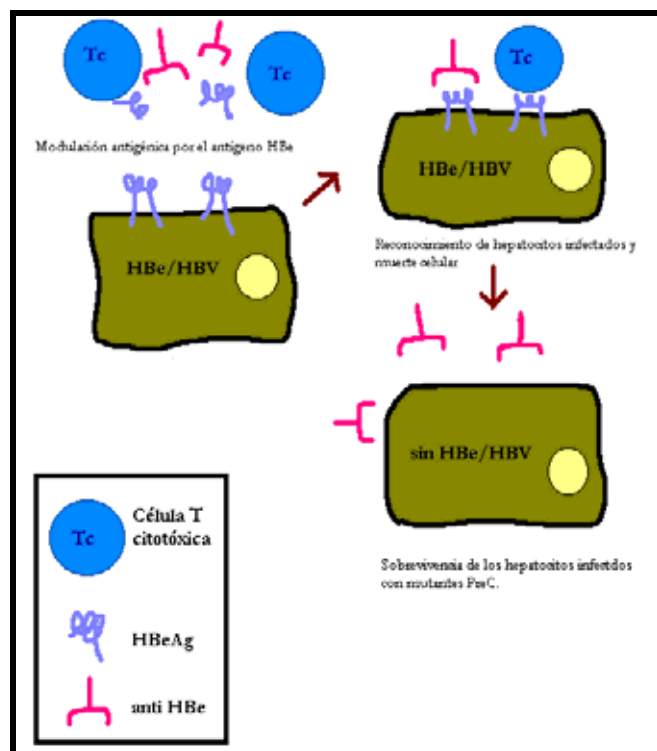


Figura 1.9.2. Selección de mutantes virales. Inicialmente, el genotipo HBV predominante es un virus HBe positivo. El HBeAg es secretado, modula el sistema inmune así que no se eliminan los hepatocitos infectados. Con el tiempo, esta modulación disminuye y el HBeAg se reconoce como extraño: se activa una respuesta humoral específica a HBe. HBV genera mutantes azarosamente, algunos de ellos son genotipos que no sintetizan el HBeAg; éstos sobrevivirán a la actividad citotóxica por parte del sistema inmune y la población viral en circulación sanguínea expresará este fenotipo nuevo. Tomado de Carman, W. *et al.*, 1993.

En este sentido, a pesar de que el virus de la Hepatitis B es un virus de DNA, su replicación es través de un intermediario (RNA pregenómico) el cual es reverso transcrito generando una alta tasa de mutación. Como consecuencia, este virus exhibe una gran tasa mutacional más que cualquier otro virus de DNA, registrando 2×10^{-4} sustituciones de bases al año (Karayiannis, P. *et al.*, 2005).

Sin embargo, el potencial para la variación se constriñe por la organización genómica compactada en ORFs y la existencia de elementos de transcripción, replicación y encapsidación dentro de esos ORFs. Por ejemplo, el ORF de superficie S está enteramente sobrelapado con el ORF P de la polimerasa. Algún cambio nucleotídico que lleva a la pérdida de función o alguna proteína será letal o deletéreo para el virus y por lo tanto su pérdida (Karayiannis, P. *et al.*, 2005).

En algunos estudios *in vitro* se ha demostrado que la tasa de inserción nucleotídica errónea por parte de la reverso transcriptasa de HBV es similar a la que presenta HIV lo que colocan la tasa de sustitución en HBV en un nivel intermedio entre los virus de RNA y DNA (Devesa, M. & Pujol, F. 2007).

1.9.1. *Diversidad genética en HBV a nivel poblacional.*

En referencia al apartado anterior, se comprende la dinámica genética que exhibe este virus, favoreciendo como se ha explicado, la fijación de mutaciones en su genoma y como se detallará mas adelante, cómo aquellas pueden influir en la patogénesis de la infección. No obstante, es de interés para este apartado, versar sobre cómo esta variación genética en HBV ha permitido establecer su clasificación actual así como la identificación de 8 genotipos virales, entendiéndolo su impacto en el ámbito poblacional de su hospedero.

1.9.2. *Clasificación del virus de la Hepatitis B.*

Este virus se agrupa en la familia de los hepadnavirus (virus asociados a cirrosis y neoplasias hepáticas) que se refiere a un grupo de virus hepatotróficos de DNA. Es el único virus de hepatitis que tiene DNA como ácido nucleico (Horn, L. 2005; White, D. & Frenner, F. 1994). Después de la clonación y secuenciación del genoma de HBV, se descubrieron varios virus en mamíferos como las marmotas (*Marmota monax*) y ardillas (*Spermophilus beecheyi*) así como en el pato de Pekín (*Anas domestica*) relacionados a HBV. De manera subsiguiente, numerosos virus que son similares a HBV se han encontrado en otros mamíferos y aves. Todos estos virus se han clasificado en la familia de los hepadnavirus, incluyendo a los ortohepadnavirus (Schaefer, S. 2007).

En los chimpancés, gorilas, orangutanes y gibones se han secuenciado nuevos miembros de los hepadnavirus. Por lo tanto, se han diferenciado tres genotipos HBV en aislados de monos (figura 1.9.3). Los aislados de gorila y chimpancé de África se agrupan como un genotipo HBVcpz, mientras que aislados de monos gibones y orangutanes provenientes del sureste de Asia se han clasificado como los genotipos HBVgbn y HBVoru, respectivamente (Schaefer, S. 2007).

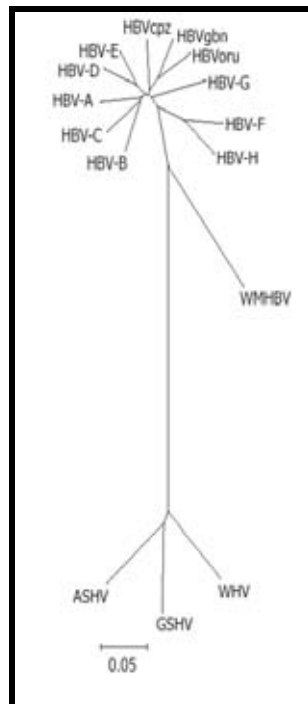


Figura 1.9.3. *Árbol filogenético de los Ortohepadnavirus.* Se alinearon genomas completos de genotipos HBV: A (X02763), B (D00330), C (M12906), D (V01460), E (X75657), F (X69798), G (AF160501) y H (AY090454); HBVcpz (D00220), HBVoru (NC 002168), and HBVgbn (U46935); utilizando como grupo externo los genomas de otros hepadnavirus: mono lanudo WMHBV (AF046996), marmota WHV (J02442), ardilla GSHV (K02715) y el miembro tentativo de la ardilla ártica ASHV (nc_001719). El alineamiento se probó con el método del Vecino más cercano (neighbour-joining). Tomado de Schaefer, S. 2007.

Los avihepadnavirus son los parientes más distantes de HBV con una homología de ácidos nucleicos de sólo el 40%. El de marmota WHB y ardilla GSHV como hepadnavirus de mamíferos están más cercanamente relacionados a HBV y difieren solo por el 17%. (Schaefer, S. 2007).

1.9.3. *Genotipos y subgenotipos de HBV.*

En adición a la diversidad que ocurre durante el curso de la infección natural, otro grado de variabilidad genotípica se evidencia en las cepas de HBV que circulan en el mundo a nivel poblacional (Devesa, M. & Pujol, F. 2007).

Históricamente, utilizando anticuerpos específicos en contra del antígeno HBs, las cepas de HBV se identificaron por diferentes determinantes antigénicos de HBs. Esto llevó a la definición de 4 subtipos serológicos: adw, adr, ayw, ayr, con d/y dependiendo de si había lisina o arginina en la posición 126, y w/r si había lisina o arginina en la posición 160. Cuando w se divide en w1, w2, w3 y w4 y el antígeno q se adiciona, estos subtipos a veces pueden cambiarse por mutaciones puntuales en el antígeno HBs (Burda, M. *et al.*, 2001; Yokosuka, O. & Arai, M. 2006).

Recientemente, el virus de la Hepatitis B se ha agrupado en 8 genotipos basados en una diferencia de más del 8% en su secuencia de nucleótidos completa (Burda, M. *et al.*, 2001 & Schaefer, S. 2007). Los análisis filogenéticos utilizando alineamientos de genomas enteros de los 8 genotipos denominados A, B, C, D, E, F, G y H, han demostrado características distinguibles entre sí (cuadro 1.9.4). Un genoma prototipo de HBV puede tener una longitud de 3215 nucleótidos como se ha detallado en los genotipos B, C, F y H. Debido a las deleciones e inserciones, los otros genotipos difieren escasamente en cuanto a la longitud del genoma. Así, el genotipo G con 3248 nucleótidos, es 66 pares de bases más largo que el genotipo D que tiene 3182 nucleótidos (Schaefer, S. 2007).

Cuadro 1.9.4. Propiedades fundamentales de los genomas y diferencias entre genotipos de HBV

Genotipo	Longitud del genoma (pares de bases)	Diferencias en los Marcos de Lectura Abiertos (ORFs)
A	3221	Inserción de aa en la posición 153 y 154 en la proteína Core
B	3215	
C	3215	
D	3182	Deleción de los aa 1-11 en la proteína PreS-1
E	3212	Deleción de 11 aa en la proteína PreS-1.
F	3215	
G	3248	Inserción de aa en la posición 12 de la proteína Core. Deleción del aa 11 en la proteína PreS-1
H	3215	

*Schaefer, S. 2007.

aa. aminoácido

Cabe mencionar, que éstos 8 genotipos virales tienen una distribución geográfica particular (figura 1.9.5). Los genotipos A y D son predominantes en el Viejo Mundo aunque también se distribuyen en todos los continentes. El genotipo D es característico de la región Mediterránea. El genotipo A es predominante en el norte y centro de Europa así como en Norte América y África sub-sahariana así como en Brasil mientras que los genotipos B y C se encuentran en el sureste de Asia, principalmente. El genotipo E circula en África sub-sahariana; el hecho de este genotipo E sea común en el oeste de África pero ausente en las Américas de origen africano en Venezuela y Brasil, podría indicar su génesis reciente: la baja variación intra-genotípica exhibida por estas cepas y el hecho de que no fue introducido a las Américas durante la trata de esclavos sugiere un origen posterior. El genotipo E predomina en el este de África. El genotipo F muestra la más alta divergencia entre los genotipos y es endémico en poblaciones aborígenes de América. El genotipo G de recién descripción se ha reportado en EUA, México y Francia, pero su distribución aún no esta completamente entendida. Finalmente, el genotipo H también conocido como un genotipo Amerindio se encontró en Nicaragua, México y California (Ruiz-Tachiquín, M. *et al.*, 2007; Devesa, M. & Pujol, F. 2007; Arauz-Ruiz, P. *et al.*, 2002



Figura 1.9.5. Distribución geográfica de Genotipos y Subgenotipos de HBV. Modificado de Schaefer, S. 2007.

Por otra parte, análisis filogenéticos extensivos han demostrado que todos los genotipos de HBV, excepto los genotipos E y G, se pueden subdividir en 24 subgenotipos, los cuales difieren por al menos 4%. La ausencia de subgenotipos en el E se atribuye a la génesis reciente de este genotipo y el caso del genotipo G aparece menos claro (Schaefer, S. 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología de la Hepatitis B en México.

La organización mundial de la salud (OMS) considera a la Hepatitis B como un problema mundial de salud. De acuerdo a la OMS y en base a la seroprevalencia de HBV en la población, existen tres zonas de endemia de la infección crónica de HBV alrededor del mundo (figura 2.1): *alta*, cuando el porcentaje de seroprevalencia del HBsAg es mayor al 8% en una población determinada, *intermedia* del 2-7.9 % y *baja* cuando es menor al 2% (Román, S. *et al.*, 2005).

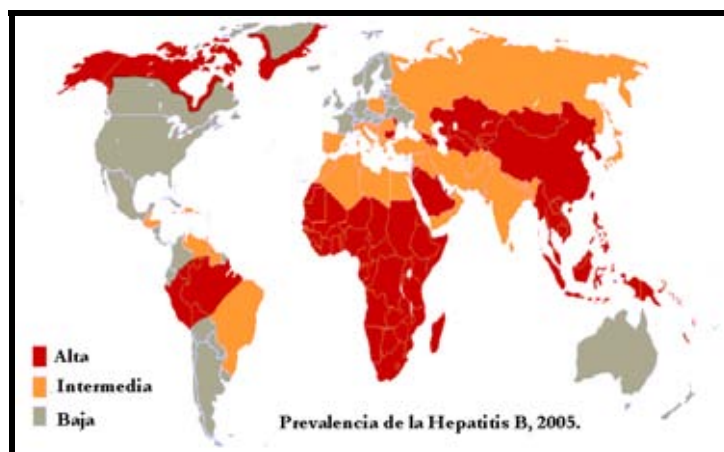


Figura 2.1. Prevalencia de la Hepatitis B en el mundo. Se muestran las tres regiones de endemia en base a la seropositividad del HBsAg de la población. Modificado de Román, S. *et al.*, 2005

Así, aunque México se considera un país de baja endemia tal y como corresponde a los países de América del Norte; la seroprevalencia estimada en la última Encuesta Nacional de Salud 2005, reporta 0.21% para el HBsAg y 3.3% para el anti-HBc (el dato anterior reportaba 0.1 % para el HBsAg y 1.4 % para el antiHBc; Román, S. *et al.*, 2005). Más aún, en estudios realizados en los bancos de sangre en donde la población es predominantemente adulta, la cifra podría ser hasta cinco veces mayor aunque no se tiene la suficiente información sobre esta seroprevalencia. Entonces, se podría estimar que 1.7 millones de personas han presentado infección por HBV. Desafortunadamente en nuestro país no existen cifras concretas sobre el número de personas con HBV crónica (Rivera-López, M. 2004; Román, S. *et al.*, 2005; Valdespino, J. *et al.*, 2007).

Existen otras estimaciones que indican que la incidencia en México puede ser incluso igual a la de países de Centro y Sudamérica. El NHANES III (The National Health and Nutrition Examination Survey) en Estados Unidos, realizó un estudio de 1988 a 1994 mostrando una prevalencia alta de la infección por hepatitis B en mexicanos residentes en ese país, principalmente en aquellos con una edad mayor a 50 años. La prevalencia en la gente de más edad parece ser dos veces mayor en los mexicanos residentes en Estados Unidos y la incidencia global fue de 20% mayor en esa población de estudio (Cisneros-Castolo, M. *et al.*, 2001).

En estudios realizados en poblaciones nativas de algunas ciudades de Sudamérica, se demostraron altos índices de infección por HBV. Cabe mencionar que se han asociado las condiciones socioeconómicas con la exposición a factores con riesgo de

contagio. Una prevalencia extrema de la infección (91%) se reportó en la frontera sur entre comunidades de México y Guatemala (Álvarez-Muñoz, T. *et al.*, 1989). Otros estudios seroepidemiológicos han ofrecido un escenario más comprensivo de la distribución de esta enfermedad e interesantemente, las poblaciones rurales de México presentan una prevalencia importante de la infección por HBV aunque son datos aún cuestionables. En un estudio realizado en la comunidad rural de San Juanito, Chihuahua (2001) no se encontró una prevalencia mayor a la reportada para esa región (Cisneros-Castolo, M. *et al.*, 2001).

2.2. Genotipos de HBV en México.

En México se sabe poco sobre la epidemiología de genotipos prevalecientes. Algunos estudios habían demostrado que el genotipo F era el predominante en el país (Sánchez, L. *et al.*, 2002). Sin embargo, recientemente se descubrió que el genotipo F es divergente a tal punto que este genotipo se ha dividido en el genotipo H (figura 2.2.1). Los análisis filogenéticos del gen HBsAg de diferentes cepas del genotipo F de HBV con un origen geográfico variable, reveló tres clados distintos dentro de este genotipo, en donde dos cepas de Nicaragua formaron el grupo más divergente junto con una cepa de Estados Unidos (Arauz-Ruiz, P. *et al.*, 2002).



Figura 2.2.1. *Distribución de genotipos en América Latina.* La distribución de genotipos fue evaluada en varias ciudades de América Latina analizando las secuencias disponibles en el GenBank (genoma completo o región S). Para cada país, el fenotipo más frecuente se muestra como la primera letra. Este genotipo se resalta cuando existieron más de 10 secuencias disponibles y en tal caso, el número de secuencias analizadas se muestra entre paréntesis. Tomado de Devesa, M. & Pujol, F. 2007.

Actualmente se sabe que el virus de la Hepatitis B circula en al menos 4 diferentes genotipos en México (figura 2.2); el genotipo H es altamente predominante seguido por el genotipo G, A y D (Sánchez, L. *et al.*, 2002; Ruiz-Tachiúin, M. *et al.*, 2007). En la figura 2.2.2 se muestran los resultados arrojados en un trabajo de genotipificación, en una muestra de 49 aislados mexicanos (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006).

Group of subjects	n	Genotypes, n (%)			
		A	D	G	H
Hepatitis patients	15	1 (6.7)	2 (13.3)	0	12 (80)
Men seeking HIV testing	20	3 (15)	1 (5)	1 (5)	15 (75)
AIDS Patients	8	0	0	4 (50)	4 (50)
Hemodialysis patients	6	0	0	0	6 (100)
Total	49	4 (8.2)	3 (6.1)	5 (10.2)	37 (75.5)

Figura 2.2.2. Distribución de los genotipos de HBV en la población mexicana estudiada. Tomado de Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006

2.3. Biología del gen precore/core: ORF C.

El promotor del ORF C, cuyo estudio fue el objetivo de este trabajo, se encarga de regular la síntesis de las proteínas Core y Antígeno *e*. Estas dos proteínas se sintetizan desde diferentes mensajeros conocidos como mRNA del precore y RNA pregenómico, respectivamente (figura 2.3.1). Una vez sintetizados, la proteína Precore se envía al retículo endoplásmico (ER) mediante un péptido señal de 19 aminoácidos en su amino terminal. La segmentación de este péptido libera la proteína restante dentro del lumen del ER en donde su procesamiento posterior en el carboxilo terminal resulta en la remoción de 34 aminoácidos. Lo que resta es el HBeAg el cual es liberado de la célula (Karayiannis, P. *et al.*, 2005).

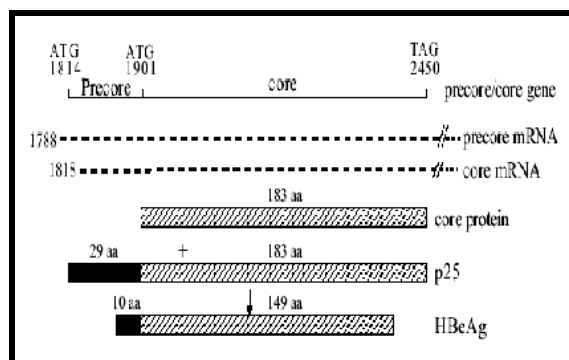


Figura 2.3.1. Expresión de la proteína Core y el HBeAg. La proteína Core se traduce desde el mRNA pregenómico utilizando el codón ATG (metionina) en la posición 1901 como sitio de inicio. El HBeAg se traduce desde el mRNA del Precore, utilizando ATG en la posición 1814. El producto de la traducción primaria es segmentado en la terminación N por una señal peptidasa y en el extremo C por endopeptidasas básicas antes de secretarse a la circulación sanguínea. Tomado de Tong, S. *et al.*, 2005.

2.3.1. Importancia del antígeno *e*.

El antígeno *e* está conservado dentro de todos los miembros de la familia de los Hepadnavirus. Se secreta desde la célula infectada pero no forma parte de la estructura del virión. Su papel biológico en el ciclo de vida de HBV permanece aún por dilucidarse con claridad (Karayiannis, P. *et al.*, 2005).

Como se ha detallado en la Introducción de este trabajo, existen observaciones experimentales y clínicas que sugieren que la secreción de HBeAg puede tener un papel trascendental en la estrategia de persistencia de HBV induciendo tolerancia inmunogénica en el hospedero (Kann, M. & Gerlich, 2005). Se han descrito algunas mutaciones en el Precore que pueden suprimir la expresión de este antígeno lo que representa un mecanismo de evasión inmune por parte del virus (Brunetto, M. *et al.*, 1999).

En la etapa crónica de la infección, la ausencia de este antígeno podría estar favoreciendo la réplica viral sin activar la respuesta efectora del sistema inmune lo que en términos clínicos puede llevar a la severidad del daño hepático como la cirrosis y al desarrollo de hepatocarcinoma en el paciente, dada la persistencia de replica viral. Por lo anterior, las mutaciones que afecten la síntesis de esta proteína viral, repercutirán en la patogénesis de la infección por HBV (Baumert, T. *et al.*, 2007).

Finalmente, debido a que la secreción de HBeAg es dependiente de la expresión de una señal peptídica codificada por la región Precore del gen *core*; esta expresión se modula a dos niveles: *transcripcional* y *traduccional* (cuadro 2.3.2). Para este trabajo de tesis, es de interés el primer nivel de modulación. A nivel transcripcional, las mutaciones en el promotor pueden afectar su síntesis.

Cuadro 2.3.2. Niveles de modulación en la expresión del antígeno *e* en la infección con HBV y las mutaciones que podrían afectarla.

Modulación de la secreción de HBeAg	
Nivel:	
Transcripcional	Mutaciones en el promotor del gen <i>core</i>
Traduccional	Mutaciones en la región precore del gen <i>core</i>

Modificado de Brunetto, M. *et al.*, 1999)

2.4. El promotor del gen *core* (CP).

Una vez que se ha revisado cuáles son los productos proteicos del ORF C, ahora se deberá hacer hincapié en su elemento regulador: el promotor del gen *core* (CP) del genoma de HBV, que es el responsable no sólo de regular la síntesis del transcrito de mRNA para la síntesis proteica del antígeno *e*, sino que además tiene un papel crucial en la replicación y morfogénesis del virus. Dirige la iniciación de la transcripción para la síntesis tanto del mRNA del Precore y RNA pregenómico (Karayiannis, P. *et al.*, 2005).

Estructuralmente, el CP incluye al menos 232 nucleótidos y en él se reconocen dos regiones importantes: el promotor del core básico (BCP) y secuencias reguladoras río arriba (URS) las cuales contienen elementos de regulación tanto negativos como positivos que modulan su actividad promotora (figura 2.4.1). El BCP es suficiente para el inicio preciso de la transcripción del mRNA del precore y el RNA pregenómico (Costa, J. 2002; Moolla, N. *et al.*, 2002; Karayiannis, P. *et al.*, 2005).

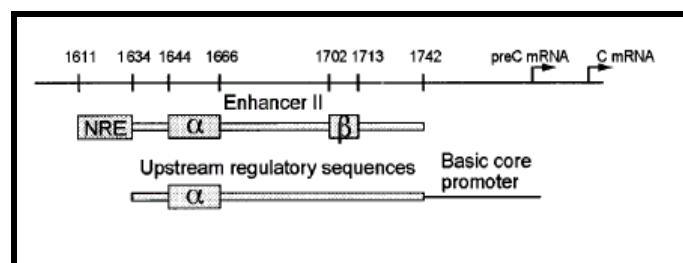


Figura 2.4.1 Elementos básicos en el promotor del gen *core* viral. Se muestran las dos regiones básicas de este promotor: URS y BCP. Nótese que sobreponen con este promotor, otras dos secuencias reguladoras de HBV: NRE (elemento de respuesta negativa) y el Enhacer II (incrementador, con sus dominios alfa y beta). Se denotan con flechas los sitios de inicio del mRNA del precore y del core. Tomado de Günther, S. *et al.*, 1996.

Este promotor contiene al incrementador o Enh II que regula la actividad del CP y se sobrelapa parcialmente con secuencias reguladoras dirección 3' así como parte del ORF X (figura 2.4.2), y que tiene actividad *trans*-activadora, atribuida a su dominio Kunitz (Erhardt, A. *et al.*, 2000).

2.4.1. *El promotor básico del core (BCP).*

El promotor básico del core es un fragmento del genoma de HBV que se localiza entre los nucleótidos 1742-1849 (figura 2.4.1 y 2.4.2) y contiene los sitios de inicio de la transcripción del mRNA core y mRNA precore. Experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el BCP contiene elementos *cis*-activadores que dirigen la transcripción independiente de ambos mRNAs. El extremo 5' del mRNA del precore se localiza en los nucleótidos 1785-1786 y en los nucleótidos 1791-1797. El extremo 5' del mRNA del Core se localiza en la región 1815±5 (figura 2.4.2). La razón para esta multiplicidad de lugares de inicio para el mRNA precore se cree que es por la falta de una caja TATA (TATAAA) como tal dentro del BCP. El BCP presenta 3 regiones tipo caja-TATA (regiones ricas en AT) semejantes a las que se encuentran en el genoma celular, que controlan la transcripción del RNA pregenómico. Éstas regiones se localizan a 20-35 pb en dirección 5' con respecto a los sitios de inicio del RNA del precore: 5'-ÁGATA-3' posicionado en los nucleótidos TA1: 1750-1755; TA2: 5'-TTAAA-3' en los nucleótidos 1758-1762 y TA3: 5'-TATTA-3' en 1771-1775 (figura 2.4.1). Las tres son sitios de reconocimiento para la proteína de unión a la caja TATA celular o TBP (Costa, J. 2002; Moolla, N. *et al.*, 2002).

Adicionalmente, existe una cuarta región rica en AT (TA4) que se ubica entre los nts. 1788-1796 y tiene una función doble: contiene el elemento tipo TATA para el RNA pregenómico, que presenta un sitio de unión a la TBP (Proteína de unión a caja TATA) para iniciar la transcripción 25-30 pb en dirección 5' en el sitio de inicio del RNA pregenómico; y también funciona como región de inicio para algunos de los mRNA del precore (Costa, J. 2002).

2.4.2. *Secuencia reguladora río arriba (URS).*

La región reguladora en 5' respecto del BCP ó URS, es un fragmento situado entre los nucleótidos 1613-1742 (figura 2.4.1). Contiene elementos *cis*-activadores positivos y negativos. La totalidad de la región estimula la transcripción del mRNA del precore y del RNA pregenómico en células de hepatoma. Las secuencias localizadas directamente en dirección 5' respecto al BCP, pueden regular positivamente este promotor con especificidad hepática mediante activadores próximos situados en una región conocida como secuencia reguladora del core en dirección 5' (CURS), que se ubica entre los nucleótidos 1636 - 1742; secuencia que además se sobrelapa con el Enh II (Costa, J. 2002).

También en esta URS se encuentran secuencias localizadas todavía mas alejadas en dirección 5', que mediante el elemento regulador negativo o NRE puede regular negativamente la expresión del gen *core* en un modo independiente de la orientación. Este NRE está constituido por tres sub-regiones funcionales: NRE- α , NRE- β y NRE- γ , que independientemente, producen una acción supresora débil pero juntos actúan sinérgicamente generando un efecto inhibitorio de 11 veces más en la regulación transcripcional del CP (Costa, J. 2002; Moolla, N. *et al.*, 2002).

2.4.3. *Secuencia reguladora del core en dirección 5' (CURS).*

La secuencia reguladora del *core* en dirección 5' (CURS) se localiza entre los nucleótidos 1636-1742 (figura 2.4.2) y actúa como región reguladora pero no como promotor. Se sabe que puede activar al BCP de 200-2000 veces más (Moolla, N. *et al.*, 2002). La

CURS se puede dividir en dos dominios: el A ó CURS-A (1636-1703) y el B ó CURS-B (1704-1743). El primero de ellos puede por sí solo, realizar un efecto regulador positivo en el BCP, aunque de menor intensidad que el CURS entero. Así también esta CURS puede subdividirse en motivos de secuencia unitaria (figura 2.4.2): alfa (α) ubicado en los nts. 1646-1668; gamma (γ) en los nts. 1671-1686 y delta (δ) en los nts. 1687-1703; así como el beta (β) ubicado en los nts. 1707-1714. Los motivos de secuencia alfa, gamma y delta regulan positivamente la actividad del PBC mientras que el beta lo hace negativamente. El motivo de secuencia alfa representa un sitio de reconocimiento a factores de transcripción (Costa, J. 2002 Moolla, N. *et al.*, 2002).

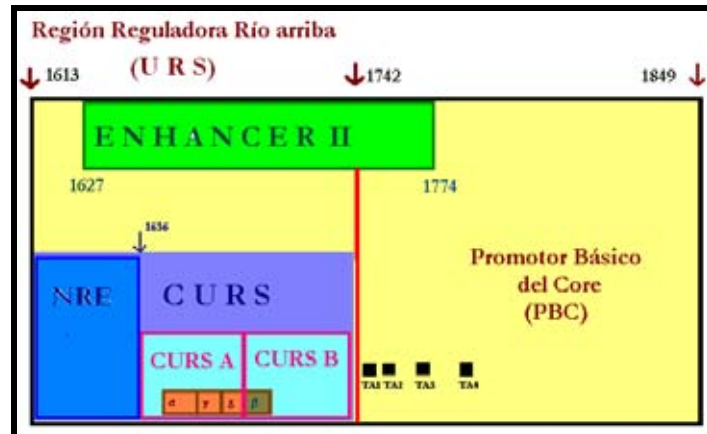


Figura 2.4.2. Elementos de la Región Reguladora Río Arriba. Se muestran los dominios de CURS, el NRE y el EnhII así como las cuatro cajas tipo TATA (TA) en el PBC.

2.4.4. Incrementador II (EnhII)

Este potenciador de la transcripción se compone de dos motivos de secuencia nucleotídica, cuya interacción se requiere para su función: una caja alfa (α) de 23 pares de bases (1646-1669) y una caja beta (β) de la misma longitud que la alfa (1704-1725). Estas dos cajas presentan una especificidad hepática bien diferenciada (figura 2.4.3). Más aún, este EnhII presenta *in vivo* dos funciones: por un lado estimula los promotores de los genes virales S y X y, por otro lado, también puede actuar como CURS activando al CP de manera dependiente de la orientación y la posición (Costa, J. 2002).

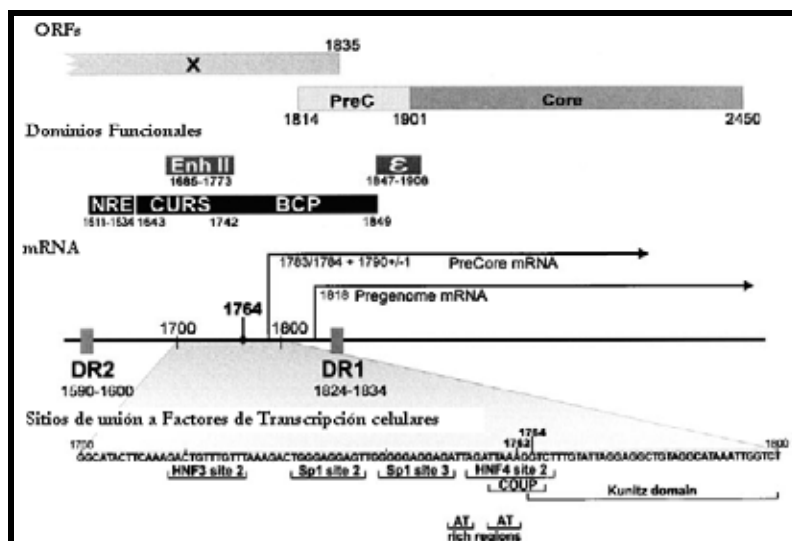


Figura 2.4.3. Regiones identificadas en el promotor del gen core de HBV. Se ubican las posiciones nucleotídicas en el genoma de 5' (izquierda) a 3' (derecha). Tomado de Erhardt, A. *et al.*, 2000.

2.5. Factores de Transcripción Hepáticos y Funcionamiento del promotor del gen *core*: Tropismo viral.

La transcripción en HBV ocurre predominantemente en el hígado. Una de las propuestas hasta ahora aceptada para la determinación del tropismo celular del virus del hepatitis B por los hepatocitos, es la acción combinada del promotor del *core* y los enhancers I y II, los cuales presentan en su secuencia génica, sitios de unión a factores de transcripción únicos de los hepatocitos. La síntesis de mRNAs a partir de promotor del *core* podría representar el mayor determinante del hepato-tropismo de este virus (Kann, M. & Gerlich, W. 2005).

Varios motivos en la secuencia de este promotor que se localizan en el BCP y en el URS del promotor del *core* han demostrado interactuar con factores de transcripción ubicuos y específicos (figura 2.5.1). Se ha reportado la existencia de varios miembros de la superfamilia de receptores nucleares de transcripción, tales como el factor nuclear hepático 3 y 4 (HNF-3, HNF-4), receptor x a retinoides α (RXR α), receptor activado proliferativo de peroxisoma α (PPAR α), el factor de transcripción del promotor de la ovoalbumina río arriba 1 (COUP-TF1) y Sp1 (proteína 1 del promotor de SV40) que se unen al BCP y regulan de forma diferencial la síntesis del mRNA del precore y core. El HNF-4 inhibe la síntesis del mRNA del precore, el PPAR α estimula la síntesis del mRNA del core y COUP-TF1 inhibe la síntesis de los RNAs (Costa, X. 2002).

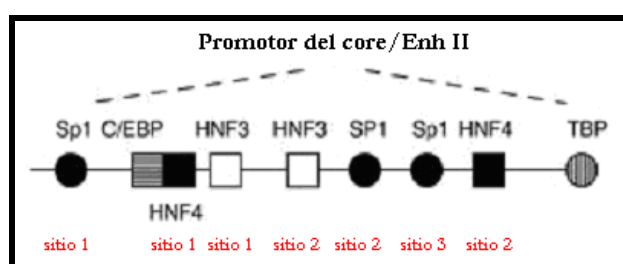


Figura 2.5.1. Sitios de unión a factores de transcripción en el promotor del gen *core*/Enhancer II. C/EBP, HNF3, Sp1, TBP. Los cuadrados representan factores de transcripción específicos del hígado; los círculos representan factores ubicuos. Para diferenciar dos sitios de unión para un mismo factor, se han asignados números. Modificado de Kann, M. & Gerlich, 2005.

Se piensa que los dos sitios (1 y 2) de unión a HNF-4 en la secuencia del promotor tienen una función importante en este mecanismo de transcripción tan versátil (cuadro 2.5.2). El factor de transcripción primario para el sitio de unión 1 es el HNF-4. El sitio de unión 2 a HNF-4 abarca la región tipo caja TATA en el promotor y en adición a HNF-4, interactúan otros factores de transcripción que incluyen COUP-TF1, PPAR α , RXR α y receptor testicular humano (TR2). Mientras que la unión de HNF-4 y TR2 al sitio de unión 2 resulta en la represión de la síntesis del mRNA del precore, la unión de los heterodímeros PPAR γ /RXR α activa la síntesis del mRNA pregenómico. La unión de algunos factores suprime coordinadamente la síntesis de los transcritos del precore y pregenómico. Esta modulación se ve facilitada por la proximidad del sitio de unión 2 de HNF-4 con los dos sitios de inicio de los mRNAs. Se ha postulado que la ocupación del sitio por un factor (por ejemplo, los heterodímeros PPAR γ -RXR α) inhibe el reconocimiento del sitio de inicio del precore por el complejo de iniciación de la transcripción en el sitio de inicio del mRNA pregenómico. Por otra parte, la unión de COUP-TF1 puede bloquear el reconocimiento de ambos sitios de inicio y reprimir coordinadamente la síntesis tanto del mRNA del precore como del pregenómico (Moolla, N. *et al.*, 2002). Mientras que HNF-4 y RXR α y PPAR α sostienen la replicación de HBV mediante la transcripción del RNA pregenómico, HNF-3 inhibe esta síntesis comparado con el mRNA del precore (Kann, M. & Gerlich, 2005).

Cuadro 2.5.2. Posición de los motivos de unión a Factores de Transcripción Celulares en el promotor del *core**.

	Sitio de Unión a Factores de Transcripción	Ubicación en el promotor del <i>core</i> 5'-3'
a.	Sp1/NRE (secuencia esencial)	1613-1622
b.	C/EBP-HNF4 sitio1	1646-1676
c.	HNF3 sitio 2	1716-1727
d.	Sp1 sitio 2	1733-1743
e.	Sp1 sitio 3	1746-1755
f.	HNF4 sitio 2	1759-1770
g.	TBP	1790-1798
h.	Dominio Kunitz (ORF X)	1767-1800

*Determinados a partir de las publicaciones de Günther, S. *et al.*, 1996, Erhardt, A. *et al.*, 2000 & Chien-Tzang, S. *et al.*, 2001.

2.6. Mutaciones en el promotor del gen *core*.

Muchas de las mutaciones en el promotor afectan los sitios de unión del BCP y con ello, la transcripción de esos mRNAs que puede regular negativa o positivamente la síntesis del HBeAg (Burda, M. *et al.*, 2001). Cabe mencionar que otros factores pueden influir en la tasa de transcripción de éstos mensajeros actuando directamente en el BCP como ocurre con las citocinas TNF- α e INF- γ y α , que tienen actividad inhibitoria. Todos estos mecanismos actúan a nivel transcripcional y contribuyen a la síntesis deficiente de este antígeno *in vivo* (Brunetto, M. *et al.*, 1999).

La alta tasa de mutación en HBV ha dado como resultado la existencia de mutaciones en prácticamente todas las regiones del genoma de este virus (cuadro 2.6.1) y cuya caracterización ha permitido entender en parte, la patogénesis viral y curso clínico de los pacientes con HBV.

Cuadro 2.6.1. Mutaciones en el genoma de HBV y su impacto potencial en la patogénesis de la enfermedad.

Región HBV	Mutación	Fenotipo Molecular	Relevancia clínica
Pre-S/S	Pre-S1/Pre-S2/S-promotor S S	Mal ensamblaje Alteración de epitopes de células B y T	Fibrosis colestática Escape a vacuna Evasión Sistema Inmune, Evasión del diagnóstico
Pre-C	Codón de paro	Pérdida del HBeAg	Hepatitis severa, deficiencia HBeAg
Core	Core	Alteración de epitopes de células T	Persistencia viral y hepatitis severa
RT/Pol	Pol	Deficiencia en la replicación. Resistencia a los antivirales	Latencia viral y persistencia viral. Escape a la terapia antiviral
Elementos reguladores	*Promotor del <i>core</i>	Replicación incrementada y expresión del Core. Disminución en la síntesis del HBeAg Disminución de la replicación	Hepatitis severa. Modulación de la resistencia a drogas. Seronegatividad HBeAg Hepatitis crónica
	Enhancer I		

*Se resalta el promotor del *core* (letras en rojo) por ser de interés para este trabajo. Tomado de Baumert, T. *et al.*, 2007.

Los pacientes en fase crónica HBeAg negativos (figura 2.6.2) que padecen una enfermedad hepática activa; presentan niveles altos de ALT y DNA viral detectable en suero; frecuentemente se asocian con mutantes en el Precore y en el promotor del *core* (Chen, C. *et al.*, 2005).

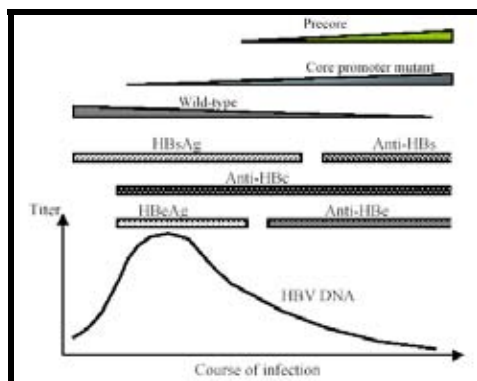


Figura 2.6.2. La desaparición del HBeAg y el aumento de anti-HBe se asocia con una declinación en la viremia y el reemplazo de HBV silvestres (wild-type) por mutantes en el promotor del *core* y/o mutantes en el Precore. No obstante, los mutantes en el promotor del *core* llegan a ser prevalentes aún antes de alcanzar títulos de anti-HBe. Nótese que las mutaciones comienzan a aparecer durante la etapa tardía de la infección. Tomado de Tong, S. *et al.*, 2005.

Una explicación a nivel molecular de la fase negativa HBeAg durante la viremia en Hepatitis B, fue descrita por primera vez en pacientes del Mediterráneo que se evidenció cuando una variante de HBV con mutaciones en la región Precore fue descrita por Carman *et al.*, en 1989. Esta variante tenía una sustitución de G por A en la posición 1896 (G1896A) la cual convierte el codón TGG para triptófano (codón 28) a TAG, un codón de paro o *stop* traduccional. Esta es la sustitución más común encontrada en los pacientes anti-HBe positivos. No obstante, se sabe en la actualidad que esta fase negativa de antígeno *e* puede no sólo atribuirse a mutaciones en el gen viral sino que la mutación puede ocurrir en la secuencia reguladora de ese gen (Chen, C. *et al.*, 2005).

En los últimos años, se han definido mutaciones en regiones reguladoras de elementos génicos (cuadro 2.6.1) en el genoma de HBV como son los promotores e incrementadores. Antes únicamente se conocían aquellas mutaciones en los marcos de lectura abierta o genes (Baumert, T. *et al.*, 2007). Existen varios estudios independientes que han identificado y caracterizado funcionalmente distintas mutaciones ubicadas en el Enh II del promotor *core* de HBV. Estas mutaciones se han hallado predominantemente en pacientes con un curso clínico más agresivo de la enfermedad, como es el caso de la hepatitis fulminante o hepatitis crónica (Baumert, T. *et al.*, 2007).

En el caso del promotor *core*, una característica de las mutaciones en esta región, es el fenotipo biológico de replicación y encapsidación viral incrementada en líneas celulares de hepatoma y en hepatocitos primarios. La mutación que más prevalece es una doble mutación (A a T en el nucleótido 1762 y de G a A en el nt 1764). Algunas de estas mutaciones han demostrado generar sitios de unión adicionales a factores de transcripción (HFN-1, HFN-3, HFN-4 ó C/EBP). La magnitud de este incremento en la replicación viral por mutantes parece ser dependiente del genotipo/subgenotipo de HBV (Okamoto, H. *et al.*, 1994; Yokosuka, O. & Arai, M. 2006; Baumert, T. *et al.*, 2007).

Por otra parte, las mutaciones A1762T y G1764A, se relacionaron con una disminución en la transcripción del mRNA precore y probablemente son la consecuencia de un cambio en el sitio 2 de unión a HNF-4 y la secuencia tipo caja-TATA en el promotor del *core*. Existe evidencia indicando que la doble mutación genera la introducción de un sitio de unión a HNF-1

adicional en el promotor y reprime específicamente la síntesis del mRNA del precore (figura 2.6.3). Más aún, la doble mutación también cambia 2 codones de HBx (proteína X de HBV) y este mutante parece tener propiedades superiores a la *trans*-activación por HNF-1 (Okamoto, H. *et al.*, 1994; Moriyama, K. 1997; Li, J. *et al.*, 1999; Moolla, N. *et al.*, 2002).

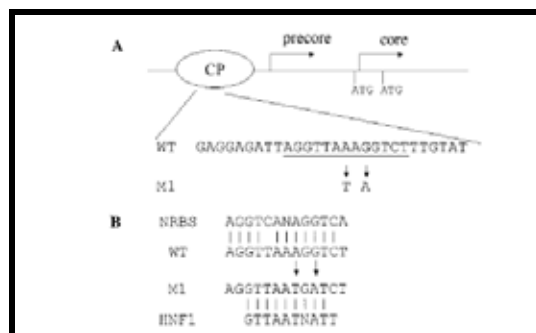


Figura 2.6.3. Doble mutación 1762/1764 en el promotor del core. A). Se muestran los sitios de inicio de la transcripción del los RNA del core y precore marcados con flechas hacia la derecha, así como los sitios de inicio para la traducción (ATG). El sitio de unión al receptor nuclear está subrayado y la doble mutación A1762T y G1764A se denota con M1 B). Secuencias homólogas entre un WT (silvestre) de HBV y el consenso del sitio de unión a HNF-1. Las flechas indican las mutaciones mientras que las líneas verticales denotan los nucleótidos idénticos. CP: Promotor del *core*. Tomado de Li, J. *et al.*, 1999.

Así también, se han reportado que estos cambios TA en la región del promotor del *core*, alteran la estructura secundaria de la terminación 3' del RNA pregenómico facilitando con ello la translocación de la hebra negativa de DNA a DR1, aunque estos efectos no se han probado (Chan, H. *et al.*, 1999).

Interesantemente, la doble mutación A1762T/G1764A, se eligió para su caracterización por medio de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida y transfección. Este estudio *in vitro*, reveló que las mutaciones en el promotor incrementan la replicación del genoma viral y reducen la expresión del HBeAg de una manera acumulativa (figura 2.6.4). No obstante, la presencia de un gran número de mutaciones puede afectar la viabilidad y secreción de los viriones (Tong, S. *et al.*, 2005).

Core promoter mutations	Genome replication (fold)	HBeAg expression (level)
None	1	100%
1762/1764	2	80%
1753/1762/1764	4	70%
1762/1764/1766	8	25%
1753/1762/1764/1766	8	20%

Figura 2.6.4. Efecto acumulativo de las mutaciones en el promotor del core de HBV. Aumenta la capacidad de replicación viral y se reduce la expresión del antígeno *e*. Tomado de Tong, S. *et al.*, 2005.

En este sentido, varios estudios de transfección muestran que las mutaciones en los nts 1762 y 1764 disminuyen el nivel de mRNA precore en un 50 a 70% por ciento y esto lleva a una síntesis de reducida de HBeAg. No obstante, el significado de mutaciones adicionales en el promotor del *core* con respecto a la síntesis del antígeno *e* continua sin conocerse bien (Chen, C. *et al.*, 2005; Tong, S. *et al.*, 2005).

2.6.1. Mutaciones en los nts. 1753 - 1757.

Estas posiciones se encuentran en el sitio TA1 (figura 2.4.2). Se ha propuesto que podría existir una estructura secundaria del RNA pregenómico que abarcaría desde la posición 1742 a la posición 1847 y las mutaciones de las posiciones 1762 y 1764 provocarían cambios en esta estructura que representaría posibles cambios en su funcionalidad. Se sugirió que la doble mutación

1762/1764 se acompaña por cambios puntuales en los nucleótidos 1751-1757, incrementado la réplica viral (Kidd-Ljunggren, K. *et al.*, 1997).

2.6.2. Mutación A1765T-G1767A.

La doble mutación que convierte el nucleótido 1765 de a A a T y el nt 1767 de G a A es muy frecuente en pacientes con síntomas de hepatitis crónica (en alrededor del 80% de los pacientes HBeAg positivos). Esta doble mutación también reside en el ORF X de HBV, la cual convierte el codón 130 de Lys a Met y el codón 131 de Val a Ile. Estudios previos indican que esta doble mutación remueve un sitio de unión a receptores nucleares en el promotor del *core* y suprime específicamente la transcripción del RNA del precore e incrementa la replicación viral; además crea un sitio de unión al factor de transcripción HNF-1 (de modo similar a la doble mutación A1762T/G1764A (Li, J. *et al.*, 1999).

2.6.3. Mutaciones en los nts. 1809-1812.

Las mutaciones en estas posiciones se han descrito en muy pocos pacientes infectados por HBV, excepto en un estudio realizado en Sudáfrica donde se encontraron cambios en estas posiciones en el 80% de las secuencias analizadas. Sobre este resultado, los autores se inclinan a pensar que las mutaciones en esta región representan la variante normal en la población de estudio (Baptista, M. *et al.*, 1999).

2.6.4. Otras mutaciones.

En la secuencia del BCP se han descrito al menos 20 deleciones distintas que afectan a las regiones TA1, TA2 o ambas, y que se solapan con lugares de unión para factores de transcripción. También se han descrito inserciones en el BCP. En un paciente con exacerbación fulminante de hepatitis crónica, una inserción de 11 pares de bases se asoció a la aparición de un nuevo sitio de unión para HNF-1 y alta replicación viral. Devesa, M. & Pujol, F., reportaron alteraciones en la región 1643-1672 aunque con escasa frecuencia.

Otras dos mutaciones en el promotor del *core* en el nt 1766 (C1766T) y en el nt 1768 (T1768A) se reportaron en pacientes con hepatitis fulminante, mientras que la mutación C1753 ha sido asociada con la progresión del daño hepático (Chen, C. *et al.*, 2005). Finalmente, las mutaciones en este promotor también se han correlacionado con la respuesta a la terapia con interferón α en pacientes con hepatitis crónica activa como se explicará más adelante (Kann, M. & Gerlich, 2005).

Es de notar que la mayoría de las mutaciones antes descritas, se ubican en el BCP del promotor del *core*; lo cual deja abierta la cuestión de cuáles son las mutaciones que ocurren en la URS del promotor así como su efecto fenotípico viral. El reporte de estas últimas es escaso. Quizás no se ha estudiado por el hecho de que las mutaciones en el BCP inciden directamente en la síntesis o no del antígeno *e* (sitios de inicio de la transcripción de los mRNAs) atrayendo la atención al estudio de esta región, mayoritariamente y/o por la falta de un sistema de estudio *in vitro* adecuado. A diferencia del BCP, la URS incide particularmente en la tasa de expresión de los productos del ORF C; quizás hasta ahora no se conoce bien cómo interaccionan los motivos funcionales con moléculas celulares, es decir, cómo se regula esa tasa transcripcional.

2.7. Significado clínico de las mutaciones.

Es notable la falta de un consenso en los trabajos publicados sobre HBV y mutantes del CP en cuanto al significado real de las mutaciones y el curso clínico de la infección. Algunos trabajos sostienen una correlación positiva entre el promotor mutante y la

enfermedad por HBV (Chen, C. *et al.*, 2005) mientras que otros consideran que no hay relación significativa (Chun, Y. *et al.*, 2000). Lo que si es claro, y en donde la mayoría de los trabajos parecen coincidir es que las mutaciones en el promotor del *core*, representan un factor importante dentro del conjunto de factores de riesgo y severidad para el daño hepático. Debe considerarse entonces no sólo la presencia o no de mutaciones en este elemento regulador, sino además la existencia de mutaciones en otras regiones del genoma de HBV, el genotipo viral, el estado inmunológico del paciente, infecciones *ab initio* con mutantes HBV (Chan, H. *et al.*, 1999), la zona de endemia para HBV, la edad y tiempo de infección, tratamiento, etc. Por ende, la integración todos estos datos permitirían entender de un modo más *holístico* y con un enfoque multifactorial, el curso y posible desenlace del paciente con hepatitis B.

La mayor parte de los trabajos en pacientes infectados con HBV sobre mutaciones en el BCP, proceden de Japón y China, por lo que se dispone de poca información sobre la prevalencia de estas mutaciones en otras partes del mundo. Además, y debido a la distribución geográfica diferencial de los genotipos de HBV, tampoco se tienen datos suficientes para establecer una posible relación entre la aparición de mutaciones en el promotor del *core* con el genotipo viral así como con su significado clínico (Okamoto, H. *et al.*, 1994; Chan, H. *et al.*, 1999).

A pesar de ello, se puede hacer un intento por comprender cómo es que las variantes en el promotor del *core* podrían estar incidiendo en la tendencia de la enfermedad. En principio, es útil señalar que en un paciente con un fenotipo que exhibe replicación viral incrementada, podría ser ésta la razón por la que los mutantes del CP sean seleccionados en pacientes inmunosuprimidos o en pacientes con hepatitis crónica. Adicionalmente, este fenotipo de alta replicación en poblaciones virales con mutaciones en el promotor, pueden estar jugando un papel importante en la patogénesis de una enfermedad más agresiva o severa. Interesantemente, en un estudio se demostró que la presencia de mutaciones en este elemento regulador (particularmente 1762/1764) se asoció con el desarrollo de carcinoma hepato-celular (Chen, C. *et al.*, 2005; Baumert, T. *et al.*, 2007). No obstante, estas mutaciones también se han hallado en pacientes con enfermedad hepática poco avanzada o severa y aún en pacientes asintomáticos (Chan, H. *et al.*, 1999; Chen, C. *et al.*, 2005).

Por hacer referencia a un ejemplo con resultados diversos; en estudios realizados por diferentes grupos en Japón y China, se encontró que pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivos en un 49 y 100 % de casos presentaron mutaciones respectivamente; pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativos, entre un 55 y 80%; portadores asintomáticos HBeAg positivos entre 0 y 26%; portadores asintomáticos HBeAg negativos, entre un 24 y 70%. Finalmente, donde todos parecen coincidir, es que en pacientes con hepatitis crónica o HCC, la prevalencia siempre supera el 80% (Okamoto, H. *et al.*, 1994; Costa, J. 2002).

Así también, se demostró que la frecuencia de mutaciones en los nts 1752, 1753, 1766 ó 1768, 1799, 1858 y 1896 (estas dos últimas del Precore), se incrementan o decrecientan con la progresión del enfermedad crónica de hígado y que éstas representan factores de riesgo con diferencias entre pacientes HBeAg positivos o negativos (Chen, C. *et al.*, 2005).

Por otro lado, en un estudio en Japón, se encontró que 23 de 43 pacientes con hepatitis fulminante aguda tuvieron mutaciones en el BCP. Sin embargo, dos estudios en Estados Unidos encontraron este mismo tipo de mutaciones en 4 de 37 pacientes con hepatitis fulminante. En otro estudio de Taiwán, se encontró que 3 de 18 tuvieron estas mutaciones. No obstante,

en el estudio realizado por Tsai, W. *et al*, después del análisis correspondiente, se encontró que no había una asociación significativa entre mutaciones en el BCP el daño hepático (Tsai, W. *et al*, 2008).

Chun, Y. *et al*, examinaron si la actividad de la replicación *in vitro* de los mutantes en el promotor del *core* de HBV, correlacionaba con los niveles de carga viral de los pacientes, encontrando que la presencia de mutaciones en el CP no tienen correlación con la carga viral ni con la severidad del daño hepático o con el estado del HBeAg (Chun, Y. *et al*, 2000). Abbas, Z. *et al*, sostienen que las mutaciones en el promotor del *core*, que se asociaban únicamente a un fenotipo HBeAg negativo, ahora se han encontrado también en pacientes HBeAg positivos, especialmente en la etapa crónica de la infección; señalando que las mutaciones en este promotor, no necesariamente son patogénicas. Estos autores demostraron que los niveles de ALT y la prevalencia de cirrosis clínica no difiere significativamente en los pacientes con o sin mutaciones tanto HBeAg positivos como negativos.

En la etapa crónica de la hepatitis B (figura 2.7.1), muchos de los eventos virológicamente importantes y muchas de las exacerbaciones hepáticas, se asocian con la detección de poblaciones virales heterogéneas WT/HBeAg negativos. Por el contrario, las poblaciones de HBV WT ó HBeAg negativos circulan homogéneamente en la sangre de pacientes con condiciones clínicas estables (Brunetto, M. *et al*, 1999).

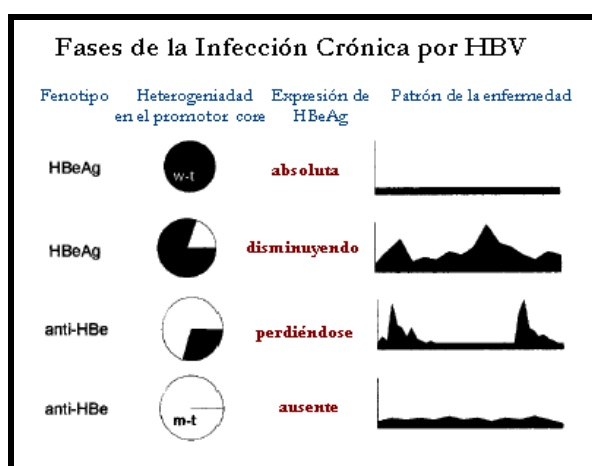


Figura 2.7.1. Representación esquemática de las relaciones serológicas, clínicas y la heterogeneidad del promotor del *core* en pacientes con HBV crónica. La detección de poblaciones virales heterogéneas se asocia con un patrón clínico caracterizado por exacerbaciones de la enfermedad. Por el contrario, en poblaciones virales homogéneas prevalecen en portadores con enfermedad hepática leve o ausente. Modificado de Brunetto, M. *et al*, 1999.

En la figura 2.7.1 se pueden resumir las relaciones entre los perfiles serológicos, clínicos y la heterogeneidad del promotor del *core*. Se identifican dos condiciones importantes en la fase HBeAg positiva: la primera, caracterizada por una viremia exclusivamente WT, lo cual determina altos niveles de HBeAg y se asocia con la ausencia de exacerbaciones de la enfermedad; la segunda, en donde las poblaciones virales que no expresan el HBeAg llegan a ser detectables y la expresión de este antígeno comienza a disminuir, lo cual se traduce en fluctuaciones clínicas frecuentes. Un perfil similar de la enfermedad se observa en pacientes con anti-HBe positivos, en donde la población viral es una mezcla genotípica y la expresión de HBeAg se está perdiendo. En esos pacientes, las exacerbaciones hepáticas se interrumpen frecuentemente por períodos de remisión completa de la enfermedad. Por último, en los pacientes anti-HBe positivos con una viremia homogénea HBeAg negativo (mutantes CP), la expresión de este antígeno desaparece completamente y los niveles séricos de transaminasas se elevan persistentemente con la ausencia de exacerbaciones de la enfermedad importantes (Brunetto, M. *et al*, 1999).

2.8. Mutaciones en el promotor del *core* asociados a Genotipos de HBV

Los reportes indican que los genotipos de HBV están relacionados con la severidad del daño al hígado. El genotipo C se ha asociado con el desarrollo de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Las mutaciones en el Precore y promotor del *core* de HBV se han relacionado con estos genotipos; éstas se han observado en los genotipos D y B, así como en el A y C, respectivamente. (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006).

Estudios realizados en el continente asiático sugieren que la variante dual 1762/1746 es más común en pacientes con genotipo C que aquéllos con genotipo B. También se ha demostrado la existencia de considerable variabilidad entre los nucleótidos 1751-1755 en el promotor del genotipo D (Chen, C. *et al.*, 2005; Abbas, Z. *et al.*, 2006). En otros trabajos se observó que las mutaciones G1752 y G1799 aparecieron junto con el genotipo B y que la frecuencia disminuyó significativamente con el avance clínico de la enfermedad crónica. Por otro lado, se encontró que la edad, la infección con el genotipo C y la presencia de las mutaciones T1762 y A1764 son factores independientes para la cirrosis hepática (Chen, C. *et al.*, 2005).

La mutación C1753 es común en el genotipo C y está relacionada con la progresión del daño al hígado en pacientes HBeAg positivos aunque en otro trabajo, esta mutación C1753 fue menos común y se asoció con la progresión del daño al hígado sólo en el caso de los pacientes HBeAg negativos. Otras dos mutaciones G1752 y G1799 aparecieron juntas con el genotipo B y la frecuencia disminuyó con el avance de los estadios clínicos de la enfermedad hepática (Chen, C. *et al.*, 2005).

En las regiones donde los genotipos predominantes son el A y el D; en un 33% de pacientes con hepatitis crónica (HBeAg positivos) se encontraron con mutaciones en las posiciones 1762 y 1764, y en un 65 % de los pacientes HBeAg negativos. La proporción de casos con mutaciones en las posiciones antes indicadas es superior a la encontrada para los pacientes de genotipo D del mismo grupo (Costa, J. 2002)

El genotipo C tuvo más mutaciones en el BCP que el genotipo B (91 % *versus* 33%). Las mutaciones en el precore ocurren preferencialmente en el genotipo B que tienen T en la posición 1858 pues ello estabiliza la estructura del tallo de la señal de encapsidación por el apareamiento TA (timina-adenina). En Asia, C1858 se observa con frecuencia en pacientes con genotipo C, así que los pacientes con genotipo C tienen una baja probabilidad de portar mutaciones en el Precore pero alta para fijarse en el BCP (Tsai, W. *et al.*, 2008).

En cuanto al genotipo F, se le han asociado una alta frecuencia de mutaciones en el BCP. Más aún, el BCP se sobrelapa con la región del gen X de HBV, y las mutaciones en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 130 y 131 en esta región (K130M y V131I) se han propuesto como marcadores pronósticos para el desarrollo de cáncer de hígado. Estas mutaciones se han reportado en portadores crónicos infectados con el genotipo F en Costa Rica (Devesa, M. & Pujol, F. 2007).

En este contexto, se encontró que las mutaciones halladas en el promotor del *core* fueron significativamente mayor en pacientes infectados con genotipos que tuviesen citosina en la posición 1858 (C1858), lo cual precede el desarrollo de A1896 (Chan, H. *et al.*, 1999). Este fue el primer reporte que sugirió una selección preferencial de las mutaciones en el promotor del *core* en pacientes infectados con genotipos particulares (figura 2.8.1). ¿Cómo se explica esta selección?: La mutación más frecuente en el ORF C ha sido la G1896A dentro la estructura ϵ . Este cambio de G a A, incrementa la estabilidad de la estructura tallo-rizo de

la señal de encapsidación ϵ del pregenoma, en donde el nucleótido complementario es T en la posición 1858, pero este cambio anula el apareamiento cuando este nucleótido es C (C1858). Por consiguiente, la selección de esta mutación que genera un codón de paro y la eliminación del antígeno e , parece ser genotipo- dependiente, por lo que su fijación cepas con timina en esta posición 1896 (en vez de guanina) se ve favorecida en los genotipos B, D, E, G y en los subtipos C1 y Ce (Chan, H. *et al.*, 1999; Yokosuka, O. y Arai, M. 2006). Se puede esperar que este polimorfismo afecte indirectamente el desarrollo de mutaciones en el BCP del promotor *core*. Como se ve en la figura 2.8.1, al tener C1858 que es característico de los genotipos virales A, H, C2, y F3, la probabilidad de fijar mutaciones en el Precore es muy baja. Por tanto, en estas cepas se seleccionarán mutaciones en el promotor del *core*. Así en un estudio, las mutaciones en el promotor fueron mas frecuentes en muestras de genotipo F (10/103) de las cuales solo 30% presentaron T1858 (Devesa, M. & Pujol, F. 2007).

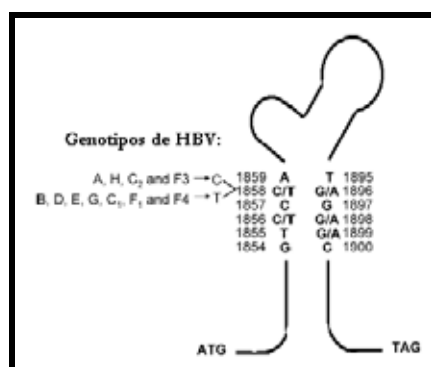


Figura 2.8.1. Polimorfismo dependiente de la estructura epsilon (ϵ) de HBV. Se observan los cambios de nucleótidos entre los genotipos y subgenotipos de HBV. Nótese la presencia de C1858 en el genotipo H. Modificado de Devesa, M. & Pujol, F. 2007

La base para esta selección no es clara pero los cambios en este promotor proveen un mecanismo alternativo para la eliminación del antígeno e . No obstante, se requieren estudios que confirmen si las mutaciones en este promotor son seleccionadas preferencialmente en genotipos de HBV que no pueden desarrollar codones de paro en el ORF C y particularmente en el Precore (Chan, H. *et al.*, 1999).

En lo que respecta a México, en un trabajo del 2006, se reportó que las mutaciones en el promotor del *core* parecen ser raras en pacientes mexicanos (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006). La variante dual clásica A1762T y G1764A, sólo se observó en un paciente de los 49 analizados (figura 2.8.2). La prevalencia de las mutaciones en este promotor y su distribución en genotipos de HBV en México, difiere de lo reportado para otros países (Estados Unidos o Hong Kong, por ejemplo). Aunque se han reportado mutaciones en los genotipos A, B, C y D principalmente; en tal reporte, las mutaciones en el promotor se hallaron principalmente en el genotipo H, seguidas del genotipo D (Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006). Sin embargo, los trabajos de este tipo realizados con pacientes mexicanos son escasos, por lo que no se puede concluir la baja incidencia de estas mutaciones.

Region and variant	n (%)	Genotypes			
		A (n = 4)	D (n = 3)	G (n = 5)	H (n = 37)
Precore (nt 1896)					
Wild type (G)	41 (83.7)	3	2		36
Wild type + variant (G + A)	6 (12.2)	1		5	
Indeterminate	2 (4.1)		1		1
Core promoter (nt 1762 and 1764)					
Wild type (AG)	44 (89.8)	4	2	5	33
Dual variant (TA)	1 (2)				1
Indeterminate	4 (8.2)		1		3

Figura 2.8.2. Prevalencia de variantes en el Precore y promotor del core así como su correlación con los genotipos hallados en aislados mexicanos. Tomado de Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006

2.9. Mutaciones y respuesta a tratamiento antiviral con INF.

En cuanto a la influencia del tratamiento en la selección o presencia de mutantes de HBV, existen varias investigaciones que especulan que las mutaciones que suprimen la expresión del antígeno *e*, son seleccionadas por la presión del sistema inmunitario y por extensión, por el tratamiento con interferón. La evidencia que soporta esta hipótesis es la siguiente: primero, la mutación G1896A se acumula en pacientes durante el tratamiento con interferón; segundo, durante la aplicación de interferón, se ha observado un número importante de mutaciones en los nucleótidos 1817-1819, 1874-1876, 1895-1897 que desaparecen al suspender este tratamiento; tercero, en una cepa de HBV en la cual la eliminación del antígeno *e* se atribuyó a la mutación en el nt. 1814, se encontró la fijación de otra mutación que generaba un codón de paro, ésta se seleccionó bajo la presión del tratamiento con interferón; y cuarto, los mutantes antígeno *e* negativos, aparecen mayoritariamente en pacientes con hepatitis crónica durante la seroconversión espontánea o inducida con interferón (Kreutz, C. 2002).

Así, si los mutantes que no expresan este antígeno son seleccionados por procesos inmunológicos. Se podría suponer que la aparición de mutantes en esta región de HBV, es un fenómeno de evasión de la respuesta inmunitaria. Los trabajos que han demostrado que los mutantes del Precore y promotor del *core* correlacionan con la falta de respuesta a la terapia con interferón o sólo con un efecto terapéutico transitorio, con un aumento en la viremia y con la reactivación de la hepatitis durante este tratamiento asociado a mutantes del Precore, podrían favorecer esta idea en donde la participación de la respuesta del hospedero frente al virus es importante (Kreutz, C. 2002).

No obstante, el significado de este antígeno en la respuesta al tratamiento continua en debate. Incluso, los factores genéticos virales han sido poco investigados en cuanto al efecto que pudieran representar para el tratamiento antiviral. Aunque la mutación G1896A en el ORF C se ha asociado con una mala prognosis, la relevancia de las mutaciones en el promotor del *core* continua sin definirse. En un estudio en pacientes con hepatitis crónica replicativa, Erhardt, A. *et al.*, encontraron una correlación positiva entre la falta de respuesta a IFN con los niveles de DNA viral, los niveles de HBsAg, las mutaciones en los nts. 1762/1764, el número de mutaciones dentro de la región 1753-1766 y las mutaciones dentro del BCP completo. En los pacientes HBeAg negativos, hubo una respuesta sostenida asociada a un promotor silvestre y un bajo número de mutaciones en la región 1753-1766 y en el BCP mientras que en los pacientes HBeAg positivos, sostuvieron una respuesta a tratamiento asociada a las

mutaciones 1762/1764 y un alto número de mutaciones en el BCP y el región 1753-1766. Esos efectos divergentes en el promotor pueden ser explicados por las funciones diversas del BCP como se ilustra en la figura 2.9.1 (Erhardt, A. *et al.*, 2000).

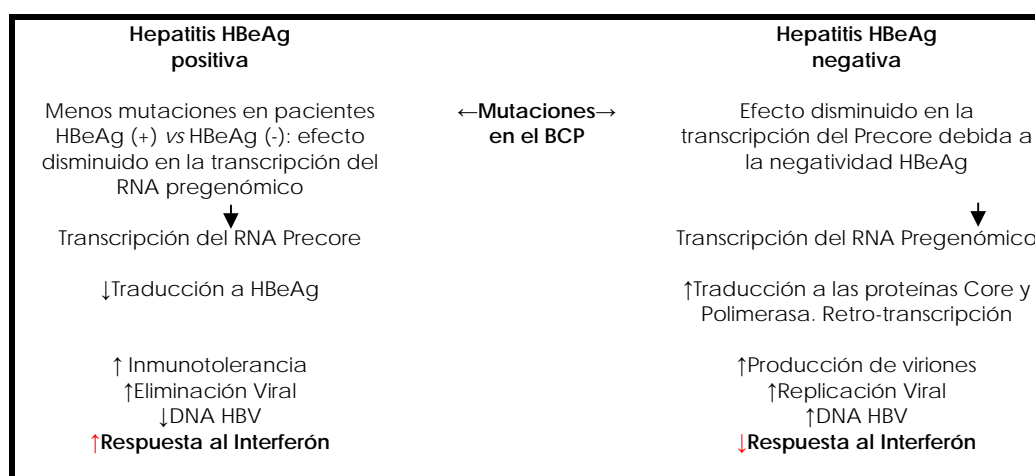


Figura 2.9.1 Efectos diversos de las mutaciones en el Promotor Básico del Core y su función en la hepatitis HBeAg positiva y negativa. Modificado de Erhardt, A. *et al.*, 2000.

Se observó una reducción notable de HBeAg en los pacientes con mutaciones en 1762/1764. En los pacientes HBeAg, el efecto dominante de las mutaciones en el BCP puede ser una reducción del HBeAg circulante lo que podría disminuir la tolerancia inmunológica y mejorar la eliminación viral con lo que se esperaría una mejor respuesta a IFN. Más aún, los pacientes con HBeAg positivos con mutaciones en los nts. 1762/1764 mostraron niveles más bajos de DNA viral que los pacientes WT en éstos nucleótidos. Estos pacientes exhibieron altos niveles de ALT y valores de inflamación hepática mayores (Erhardt, A. *et al.*, 2000).

El efecto dominante de las mutaciones en la región del promotor puede ser el incremento de la replicación viral o encapsidación, obstaculizando la eliminación viral inducida por IFN. Algunos reportes indican que pacientes con deleciones en el BCP tienden a tener una mejor respuesta a IFN que los pacientes con secuencias WT. Por tanto, las mutaciones 1762/1764 pueden incidir negativamente en la respuesta a tratamiento con IFN en pacientes HBeAg negativos (Erhardt, A. *et al.*, 2000).

Como se ha descrito anteriormente, este promotor viral contiene una serie de sitios de unión a factores de transcripción pero hasta ahora se desconoce cómo la acción de estos activadores génicos se modula durante el tratamiento con IFN (Erhardt, A. *et al.*, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad ocasionada por el virus de la Hepatitis B es importante en términos de salud y epidemiología mundial, tanto por la infección aguda como crónica que ocasiona en el hígado. Sin embargo, en México, el estudio de este virus no ha sido tan extenso, a pesar de la importancia clínica que tiene entre la población. Como consecuencia de los problemas en su tratamiento y prevención, aunado a las dificultades técnicas y económicas que existen para su diagnóstico, favorece un incremento en su incidencia/prevalencia. Hay pocos trabajos reportados sobre el virus de la Hepatitis B y su correlación con el cuadro clínico del paciente así como escasa información sobre las repercusiones clínicas que representa la genética molecular de este virus y que como ha sido demostrado en muchos trabajos, su conocimiento es sumamente valioso en el entendimiento de la patología, severidad, respuesta a tratamiento y curso clínico del paciente con HBV.

Por otro lado, la mayoría de los trabajos sobre pacientes infectados con HBV y mutaciones en el promotor del *core* proceden de Japón y China (en donde esta infección es de alta endemia), por lo que se dispone de poca información sobre la prevalencia de estas mutaciones en otras partes del mundo. Además, y debido a la distribución geográfica diferencial de los genotipos de HBV, tampoco se tienen datos suficientes para establecer una posible relación entre la aparición de mutaciones en este promotor con el genotipo viral así como con su significado clínico. En particular, son escasos los trabajos sobre el genotipo H de HBV y su relación con el paciente, probablemente por la reciente determinación de este genotipo. Mas aún, no existen trabajos sobre el promotor del gen *core* en pacientes mexicanos.

Es importante señalar que como se ha sugerido (Devesa, M. & Pujol, F. 2007; Chan, H. *et al.*, 1999), podría existir la susceptibilidad en este genotipo H para la fijación de mutaciones en el promotor del *core* al no fijarlas en el ORF C, proveyendo un mecanismo alternativo para la eliminación del antígeno *e*.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se propuso estudiar cuáles son las variaciones en el promotor del *core* de este virus con la intención primaria de comprender mejor las particularidades de la hepatitis B en pacientes mexicanos y preliminarmente, determinar si estas variaciones podrían predecir mejor el estado clínico del paciente con HBV en México, con los beneficios que ello representaría tanto para el médico como para el paciente. Luego, al ser el genotipo H predominante en México, es de notar la importancia de la contribución al conocimiento de la biología sobre este genotipo en pacientes mexicanos.

4. HIPÓTESIS

Con base a la alta tasa mutacional que presenta el virus de la Hepatitis B (HBV), entonces existe la posibilidad de hallar nuevas mutaciones en el promotor del gen *core*, en aislados de pacientes con hepatitis B crónica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General.

Analizar las mutaciones presentes en el promotor del gen *core* del genoma viral, aislado de pacientes mexicanos infectados con el virus de la Hepatitis B.

5.2. Objetivos Particulares.

1. Amplificar y secuenciar un fragmento de 339 pares de bases que corresponde al promotor del gen *core* a partir de DNA viral de muestras de plasma de pacientes mexicanos con HBV.
2. Determinar el genotipo viral de HBV de las muestras.
3. Buscar y analizar las mutaciones en las secuencias del promotor del *core*.
4. Determinar si existe relación entre los genotipos y las mutaciones encontradas con el curso clínico del paciente infectado con HBV.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Pacientes.

El estudio contó con la participación de 42 pacientes derechohabientes del IMSS, todos positivos por serología al antígeno de superficie de HBV (HBsAg). Cada paciente firmó una *carta de consentimiento informado* (ver formato de entrevista en Apéndice I) en donde además de mostrarse una breve descripción sobre las características del proyecto, se anotaron los datos personales del paciente así como aquéllos relacionados a la infección y finalmente su firma de conformidad junto con la de un testigo y el respectivo investigador que lo entrevistó. De este modo el paciente autorizó la toma y manejo de la muestra sanguínea a cambio de la información confidencial y oportuna de todos los resultados obtenidos en el laboratorio (carga viral, serología, pruebas de funcionamiento hepático, genotipos, mutaciones, etc.) durante el estudio. Parte de la información recopilada durante la entrevista con cada paciente (edad, sexo, tratamiento, etc.) se muestra en el Apéndice I.

6.1.1. *Obtención de plasma y suero.*

Se obtuvieron 15 mL de sangre de cada paciente a partir de una punción venosa del antebrazo (figura 6.1): se depositaron 8 mL en dos tubos con anticoagulantes EDTA y K2 para la obtención de plasma (BD Vacutainer™) y 7 mL en otro tubo sin anticoagulantes para la obtención de suero (BD Vacutainer Serum™). Posteriormente, se centrifugaron todos los tubos a $550 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . El plasma obtenido en los dos tubos se separó de la pastilla celular, transfiriéndolo a un criotubo de 1.7 mL e inmediatamente se conservó a -70°C hasta su uso. Del suero obtenido en el otro tubo se separaron 800 μL para determinación de antígenos por ELISA con los kits comerciales Enzygnost* Dade Behring Marburg GmbH, Alemania (HBsAg y HBeAg) y anticuerpos HBV (anti- HBe, anti-HBs y anti- Core IgG) con Enzygnost*, Behring Marburg GmbH, Alemania y IMX®AUSAB®Abbott; así como para las pruebas de funcionamiento hepático correspondientes (Alanino aminotransferasas, Aspartato amino transferasas y Bilirrubinas Directa e Indirecta), el resto se congeló inmediatamente en criotubos de 1.7 mL a -70°C . Los análisis clínicos de serología se llevaron a cabo en el Laboratorio de Virología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP), mientras que las pruebas de función hepática se realizaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos de Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional siglo XXI.



Figura 6.1. *Toma de sangre.* Se efectuó la punción venosa del antebrazo para la obtención de suero y plasma de cada paciente.

6.1.2. Determinación de la carga viral.

La carga viral ELISA de cada paciente se determinó con el equipo COBAS Amplicor MONITOR™ ROCHE, mediante la amplificación de fragmentos virales específicos y con la absorbancia resultante de los mismos, a partir de esto se cuantifica el número de copias virales por mL de plasma. A partir de este valor de CV se obtiene su logaritmo natural (\log_{10}). El rango de detección del equipo va desde 200 hasta 200,000 copias/mL. Las cargas virales por arriba de este rango fueron diluidas para determinar el valor exacto. El método para esta técnica se describe en el Apéndice I.

6.2. Obtención de DNA total.

La extracción de DNA se llevo a cabo utilizando 100 μ L de plasma (Columna QIAmp DNA micro™) o bien si la muestra era de $\log_{10} CV \leq 4.7$, se utilizaron 400 μ L de plasma (Columna QIAmp DNA ultrasens™). En caso de no contar con el material biológico suficiente (plasma), se optó por utilizar 100 μ L o 400 μ L de suero según se requiriera y de tratarse de muestras de baja carga viral también se utilizaron 400 μ L de suero. Por tanto, las muestras que requirieron 400 μ L de plasma para la extracción fueron la **HBV-86, 100, 119 y 121**; mientras que las que en vez de utilizar plasma para la extracción se dispuso de 400 μ L de suero, fueron la **HBV-62, 79 y 98**; éstas 7 muestras corresponden a una CV baja ($\log_{10} < 4.8$). El resto de las muestras se logró amplificar con DNA de extracciones a partir de 100 μ L de plasma.

Por tanto, para esta obtención de DNA total a partir de suero y plasma de cada paciente, se utilizaron kits comerciales siguiendo los protocolos de extracción según las especificaciones del proveedor con algunas modificaciones, tal y como se describe a continuación.

6.2.1. Extracción de DNA total por columna QIAmp DNA micro™(QIAGEN, EUA).

Para la obtención de DNA total de cada paciente, se transfirieron 100 μ L de plasma o suero a un tubo de micro centrifuga de 2.0 mL estéril, se le agregaron 10 μ L de proteinasa K, 100 μ L de buffer AL (Amortiguador de Lisis) con 1 μ L de *carrier RNA*; se mezcló con vórtex durante 15 segundos. Luego, se incubó a 56°C por 10 minutos con agitación de 700 rpm. Se centrifugó brevemente a máxima velocidad para bajar el líquido. Se agregaron 50 μ L de etanol, se mezcló con vórtex durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 3 minutos. Se centrifugó brevemente y se transfirió este lisado a la columna QIAmp mini Elute™ (figura 6.2.1). La columna se colocó en un tubo de recolección y se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto; se descarto el tubo con el lisado obtenido. La columna se transfirió a otro tubo de recolección limpio y se agregaron 500 μ L de buffer AW1 (Amortiguador de Elusión 1), se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto y se desechó el lisado. Se adicionaron 500 μ L de buffer AW2 (Amortiguador de Elusión 2) y se centrifugó nuevamente a 6000 x g durante 1 minuto.

Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad (16000 x g) por 3 minutos para secar completamente la membrana de la columna y luego se transfirió a tubo de micro centrifuga de 1.5 mL estéril, se adicionaron 30 μ L de agua inyectable a TA sobre la membrana eluyendo los ácidos nucleicos fijados en ella. Se incubó a TA durante 3 minutos y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto, el DNA quedó en el tubo y este se conservó a -20 °C.

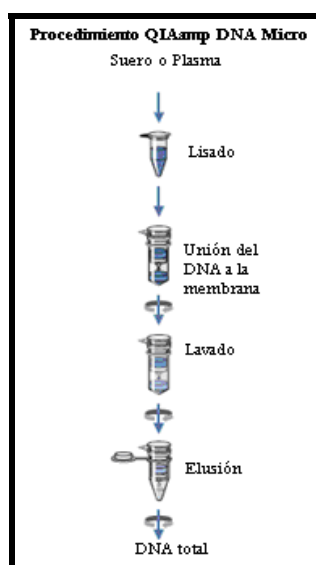


Figura 6.2.1. Extracción de DNA total por columna. Se muestra el esquema general del protocolo de extracción. Modificado de QIAamp DNA Micro Handbook 2003.

6.2.2. Extracción de DNA total por columna *QIAamp DNA ultrasens virus*TM (QIAGEN, EUA)

Para obtener DNA total de cada paciente a partir de mayor volumen de plasma o suero, se tomaron de 100 a 400 μL de muestra biológica. Se depositaron en un criotubo de 2 ml estéril, se agregó solución salina para completar 1 mL en total. Se añadieron 800 μL de buffer AC (Amortiguador de lisis) en la superficie de la muestra y 5.6 μL de solución *carrier RNA*. Se mezcló por inversión y después con vórtex por 10 segundos. La muestra se incubó a TA por 10 minutos y después de este tiempo se centrifugó a 1,200 x g por 3 minutos. Después de centrifugar, se desechó completamente el sobrenadante y se despegó la pastilla formada. Después se agregaron 300 μL de buffer AR calentando a 60°C con 20 μL de proteinasa K, se mezcló con vórtex hasta resuspender completamente. Se incubó por 10 minutos a 40°C con agitación constante a 1400 revoluciones por minuto. Posteriormente, se añadieron 300 μL de buffer AB (Amortiguador de Lisis), se agregaron 700 μL del lisado anterior a la columna y se centrifugó a 4,000 x g por 1 minuto. La columna se paso a un tubo nuevo de recolección y se agregaron 500 μL de buffer AW1 (Solución de Lavado) y se centrifugó a 6,000 x g durante 1 minuto. Se desechó el líquido resultante, se colocaron 500 μL de buffer AW2 (Solución de lavado) y se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos. Luego, la columna se transfirió a un tubo estéril de 1.5 mL. Para eluir los ácidos nucleicos de la membrana en la columna, se adicionaron 30 μL agua bidestilada estéril y se dejó reposar a TA durante 1 minuto. Finalmente se centrifugó a 6,000 x g durante 1 minuto. Se repitió la elusión adicionado 30 μL de agua y se dejó durante 1 minuto a TA y se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto.

6.3. Ensayo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa): Amplificación del fragmento de 339 pb: Promotor del gen *core* de HBV.

Se utilizó la técnica de PCR o de reacción en cadena de la polimerasa, para amplificar el fragmento viral de interés. Con cada muestra se realizó un ensayo preliminar en un volumen final de 12.5 μL con el objetivo de verificar la existencia del amplificado correspondiente al fragmento de 339 pares de bases, determinar el volumen necesario de DNA y de producto de PCR para

purificar y secuenciar. Posteriormente, para obtener una mayor cantidad de amplificado, se corrió un PCR en un volumen final de 50µL. Para ello, se utilizaron los siguientes reactivos: 1X PCR Buffer (Invitrogene), 2.5 mM de Cloruro de Magnesio -MgCl₂- (Invitrogene), 0.2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) y 0.2 µM de los siguientes oligonucleótidos diseñados en el laboratorio y sintetizados en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM: el iniciador sentido o *forward* **1603** (5'-acgtcgcattggagaccaccg-3' nt. 1603-1622) y el iniciador antisentido o *reverse* **1942** (5'-aggcaaaaatgagagtaactc-3' nt. 1942-1923) que en conjunto amplifican el fragmento de 339 pares de bases que corresponde al promotor del gen *core* de HBV (figura 6.3.1); así como 0.625 U de Amplificasa (Biogénica) y 14% del volumen de DNA total extraído de cada muestra de HBV por reacción.

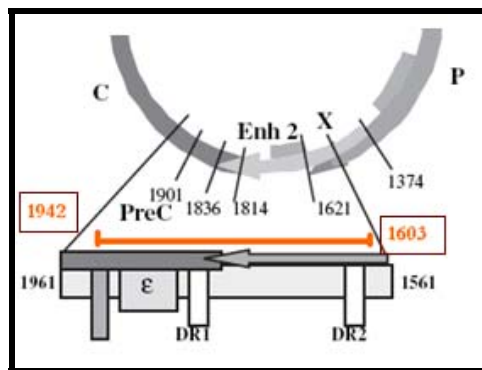


Figura 6.3.1. Posición de oligonucleótidos utilizados para amplificar la región del promotor *core* de HBV. Se muestra el juego de iniciadores utilizados para amplificar el fragmento que incluye al promotor del gen *core*. Modificado de www.medscape.com.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de DNA automatizado (Biometra) con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C y 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, con una extensión final de 72 °C durante 5 minutos.

Para evitar la contaminación y falsos positivos en los resultados de PCR, se aplicaron estrictas medidas de control. Cada amplificación de PCR incluyó un control positivo (muestra de alta carga viral que amplificó el fragmento esperado). Así mismo, el ensayo de PCR fue probado previamente para estandarizar y verificar que las condiciones fueran las adecuadas: se utilizó DNA obtenido a partir de un individuo sano (HBV negativo) y se observó que no amplificó el fragmento viral de 339 pares de bases, lo que evidenció la *especificidad* de los iniciadores utilizados en este trabajo, así como la realización adecuada del ensayo y libre de contaminación lo que descarta falsos positivos o la amplificación inespecífica.

Después de la amplificación del fragmento, se cargaron 3 µL del producto de PCR obtenido en un gel de agarosa al 1% con 0.5 µg/mL de Bromuro de Etidio (Sigma) con el objeto de verificar la presencia de los fragmentos con un peso molecular esperado de 339 pares de bases. El gel se visualizó en un transiluminador de luz UV (GeneSnap, Syngene).

6.3.1. PCR anidado.

Para algunas muestras en las que resultó difícil lograr la amplificación del fragmento viral esperado (**HBV 81, 96, 100 y 121**), se optó por amplificarlo por PCR anidado. Este se efectuó con el mismo método utilizado para el PCR directo descrito con anterioridad; aunque el material genético utilizado como templado de DNA para esta amplificación fue el producto de un PCR

convencional (2 μL) obtenido en un ensayo previo con la muestra problema (cuya amplificación en tal caso, fue relativamente baja o nula).

6.3.2. Purificación y cuantificación.

Posteriormente, se purificó el producto de PCR obtenido (DNA viral amplificado) utilizando el kit comercial Pure Link™ (Invitrogene, Brasil) con algunas modificaciones:

El producto de PCR se transfirió a un tubo de micro centrifuga de 2.0 mL estéril y se adicionaron 3 volúmenes de Buffer QG (QiaGen™) por volumen de producto de PCR más 1 volumen de isopropanol y se mezcló por inversión para luego pasarlo a la columna del kit de *Pure Link™ Invitrogene* (figura 6.3.2). Se centrifugó a 10 000 x g durante 1 minuto y el filtrado eluido se desechó. Se adicionaron 650 μL de Buffer PE (QiaGen™) y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente (TA). Se centrifugó a 10 000 x g durante 1 minuto y nuevamente el filtrado se desechó. Finalmente, se centrifugó durante 3 minutos a máxima velocidad (16 100 x g) y la columna se transfirió un tubo de micro centrifuga de 1.5 mL. Para eluir el DNA de la membrana, se agregaron 30 μL de agua inyectable y se dejó incubar durante 3 minutos a TA. Se centrifugó a velocidad máxima durante 2 minutos; para incrementar el volumen de eluido se adicionaron 30 μL de agua, (se incubó y centrifugo como se ha descrito) obteniendo un volumen final de 60 μL . El DNA purificado se cuantificó cargando 1 μL en un gel de agarosa al 1% y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Bromuro de Etidio. Luego del corrimiento se determinó la concentración (ng/ μL) utilizando el programa de cómputo *Gene tools*, Syngene.



Figura 6.3.2. Purificación de productos de PCR por columna. Se muestra el esquema general del protocolo de purificación de DNA viral obtenido por PCR. Modificado del Manual PureLink™ PCR Purification Kit, 2004.

6. 4. Reacción de Secuenciación con BigDye® Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing.

Para realizar la reacción de secuenciación para cada sentido del iniciador, se utilizaron un promedio 125 ng del DNA viral purificado y 600 ng de DNA plasmídico, 10 pmol/ μL de cada oligonucleótido y 4 μL de la reacción mix del kit utilizado (dNTP's, ddNTP's, MgCl_2 , Buffer PCR y la Taq polimerasa *proofreading*, Applied Biosystems, EUA). La reacción se efectuó un

termociclador de DNA automatizado (Biometra) con las siguientes condiciones: 25 ciclos de desnaturalización a 96°C por 10 segundos, alineamiento a 50°C por 5 segundos y extensión final a 60°C durante 4 minutos.

La reacción de secuenciación obtenida se purificó con el kit comercial DyeEx 2.0 (QIAGEN Removal Dye Terminator GMBH, Alemania): se mezcló cuidadosamente la columna del kit para resuspender la resina y eliminar las burbujas formadas en ella, se retiró la tapa de la base de la columna y se colocó en un tubo de colección de 2 mL para luego centrifugarla a 3000 rpm durante 2 minutos y se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio. Lentamente, se aplicó la reacción de secuenciación (20 µl) a la resina en el centro de la columna y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos (figura 6.4.1). La columna se desechó y el filtrado obtenido se liofilizó en una centrífuga de vacío (Eppendorf) a 30°C durante 25 minutos aproximadamente.



Figura 6.4.1. Purificación de productos de PCR por columna. Se muestra el esquema general del protocolo de purificación de DNA viral obtenido por PCR. Modificado del Manual PureLink™ PCR Purification Kit, 2004.

Finalmente, se procedió a la obtención de la secuencia nucleotídica de cada muestra, efectuando la separación del DNA viral por electroforesis de alta resolución en condiciones desnaturizantes en un analizador automatizado ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, EUA), servicio que presta el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

6.5. Clonación.

Para algunas muestras que al ser secuenciadas mostraron más de una variante viral (o genotipo) o secuencias con ruido y difíciles de leer en el electroferograma resultante, se decidió llevar a cabo la clonación. Se comenzó amplificando DNA viral por un PCR convencional. Este producto de PCR se procesó posteriormente para insertarlo en un plásmido de 3.015 Kb (pGEM) y luego reamplificarlo en el vector de clonación *Escherichia coli*, tal y como se describe a continuación.

6.5.1. *Preparación de Células competentes.*

Para la preparación de células permisivas o competentes para ser transformadas con el vector plasmídico, se picaron de 6 a 8 colonias de la última resiembra de la cepa de bacterias JM109 y se inocularon en 10 mL de medio Luria Bertoni (LB). Se incubaron a 37°C en agitación 18 horas. Se mezclaron 30 mL de medio LB con 5 mL de la suspensión del paso anterior y se incubaron a 37°C con agitación constante durante 2 horas. Nuevamente se realizó otra mezcla con 200 mL de medio LB con 5 mL de la suspensión del paso anterior y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 a 0.4, aproximadamente de 2 a 3 horas. Posteriormente, se transfirió el cultivo a tubos para centrifuga de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante cuidadosamente, se resuspendió el botón celular en 16 mL de buffer 1 (cloruro de rubidio RbCl₂, cloruro de manganeso MnCl₂, cloruro de calcio CaCl₂ y glicerol) y se incubó en hielo por 45 minutos. Se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C y las células se resuspendieron en 5 mL de buffer 2 (RbCl₂, MOOPS, CaCl₂ y glicerol) y se incubaron en hielo por 10 minutos. Finalmente se hicieron alícuotas de 200 µL en tubos de 1.5 mL y se conservaron -70°C hasta su uso.

6.5.2. *Reacción de ligación del fragmento viral en el plásmido.*

Cálculos para la determinación de nanogramos (ng) necesarios de fragmento viral obtenido por PCR para insertarse en el plásmido o vector.

Vector: 3015pb=3.015Kb

:25ng

Inserto: 339pb=0.339 Kb

Fórmula:

$$\text{ng}_{\text{inserto}} = \frac{\text{ng vector} \times \text{Kb inserto}}{\text{Kb vector}} \quad (\text{Relación molar inserto :vector})$$
$$\text{ng}_{\text{inserto}} = \frac{(25\text{ng vector}) (0.339 \text{ Kb})}{3.015\text{Kb}} (3/1) = 8.4328 \text{ ng}$$

Para realizar la clonación, se utilizó el kit de clonación pGEM®-T Easy Vector System (Promega, EUA). Se preparó la siguiente mezcla de la reacción de ligación por cada muestra a clonar: 2.5µL de 2X Rapid ligation Buffer, 0.5 µL de pGEM-T Easy vector -25ng- y 8.43 ng del inserto o fragmento de 339 pares de bases a ligar y 0.5 µL de T4 DNA Ligasa -3U/ul- y agua inyectable para obtener un volumen final de 5µl de reacción por muestra. Se mezcló por pipeteo suave y se dejó incubar a 40°C toda la noche.

6.5.3. *Transformación de bacterias JM109.*

Se tomó una alícuota previamente descongelada en hielo. Se les agregaron 2 µL de la reacción de ligación. Se incubaron en hielo por 20 minutos y luego, los tubos se pasaron a 42° C por 45 segundos y se regresaron inmediatamente a hielo por 2 minutos. Se les adicionaron 950 µl de medio SOC a TA. Se dejó incubar 1 hora 30 minutos a 37° C con agitación a 150rpm.

Las placas con medio LB y agar, preparadas previamente se suplementaron con 100 µL de IPTG (isopropiltio-β-D-galactosida) 0.1 M, 10 µL de sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- isopropiltio-β-D-galactosida) 50mg/ml y 10 µL de Ampicilina (50ug/ul). Se dispersó esta mezcla en toda la placa y se protegió de la luz hasta su uso a 37° C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el tubo con bacterias se mezcló suavemente y se sembraron 100 µl en una placa. Se centrifugó el resto de las bacterias, se tiró el medio dejando aproximadamente 100 µl que se sembraron en otra placa. Así se obtuvieron dos placas de siembra por muestra: una diluida y otra concentrada. Finalmente, se dejaron en incubación a 37° C toda la noche.

6.5.4. *Crecimiento en Medio LB.*

Se agregaron 5 mL de medio LB con ampicilina (100ug/ml) a tubos Falcon de 15 mL. Se seleccionaron 5 colonias positivas (*Escherichia coli* Amp^r y LacZ) conforme a criterios como: bordes regulares, aisladas, convexas, consistencia butírica y de color blanco. Se transfirieron cada una a un tubo Falcon y se incubaron a 37° C con agitación a 150 rpm toda la noche

6.5.5. *Purificación de DNA plasmídico.*

Después del crecimiento bacteriano toda la noche, se tomaron 850 µL de bacterias en medio LB, se transfirieron a un tubo estéril agregando 150 µL de glicerol para congelarlas a -70°C.

Para obtener el DNA plasmídico, se utilizó el kit QIApure® Spin Miniprep (QIAGEN) con el siguiente protocolo: el resto de bacterias crecidas se centrifugaron 5 minutos a 800 x g. Se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 250 µL de Buffer P1 (Amortiguador de suspensión) previamente preparado (para cada tubo de bacterias: 250 µL de Buffer P1 y 2.5 µL de RNasa A). Luego de homogenizar, se transfirió esta mezcla celular a un tubo de micro centrifuga de 1.5 mL estéril. Se le agregaron 250 µL de Buffer P2 (Amortiguador de Lisis) y se mezcló suavemente por inversión. Se adicionaron 350 µL de Buffer N3 (Amortiguador de Neutralización) e inmediatamente se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 10 minutos. El sobrenadante que resultó de esta centrifugación se transfirió a las columnas del kit y se centrifugaron 1 minuto a 15, 700 x g. Se desechó el filtrado y se adicionaron a la columna 500 µL de Buffer PB y se centrifugó durante 1 minuto.

Finalmente, se agregaron 750 µL de Buffer PE (Amortiguador de Lavado) y se centrifugó 1 minuto más. Se repitió esta última centrifugación para retirar completamente el etanol residual del Buffer PE. Luego, se pasó la columna a un tubo de 1.5 mL estéril y se le colocaron 50 µL de agua inyectable y se incubó a TA por 3 minutos. Así, para recuperar el DNA plasmídico eluído, se centrifugó 1 minuto a 15,700 x g. Se concluyó con la cuantificación por espectrofotometría.

6.5.6. *Digestión de DNA plasmídico usando EcoRI (PROMEGA)*

Se preparó la mezcla de digestión con 1 µL de RE, 0.1 µL de BSA (Albumina Sérica Bovina), 5 µL de DNA plasmídico, 0.25 µL de Enzima (EcoRI) y la cantidad de agua necesaria para obtener una mezcla de 10 µl por muestra. Se mezcló con pipeteo suave y se incubó a 37°C durante 3 horas. Luego a 65°C por 15 minutos e inmediatamente se pasó a hielo. Esta digestión se corrió en un gel de agarosa 1% con BE para verificar la presencia del fragmento de 339 pares de bases esperado.

Paralelamente, se hizo una reacción de PCR con este DNA plasmídico (utilizando 2 µL en una reacción con un volumen final de 12.5 µL) como una estrategia adicional que permitiese comprobar por esta técnica, la presencia del inserto o fragmento de 339 pares de bases clonado.

6.6. Análisis de las secuencias nucleotídicas.

A partir de los electroferogramas obtenidos de la secuenciación nucleotídica de cada muestra del fragmento de 339 pares de bases de DNA-HBV, éstos se analizaron del siguiente modo:

6.6.1. Revisión de los Electroferogramas y Conversión de Formatos de los fragmentos virales secuenciados.

Una vez que se tuvieron los electroferogramas, se inició con un reconocimiento manual de su secuencia (la secuencia arrojada de bases A, G, C y T; resultantes por cada pico o señal de fluorescencia) con el programa Chromas Lite Versión 2.01 (Technelysium, Australia <http://technelysium.com.au/>). Se prestó particular atención a: i). la falta de alguna letra en un pico de fluorescencia indicado en el electroferograma, ii). regiones poco confiables por la presencia de picos no bien definidos: inicios y finales irregulares en la secuencia, iii). la presencia de N's en la secuencia indicando dos o más bases distintas para una misma posición, es decir, dos picos de diferente color -dos bases distintas- pero de igual longitud y amplitud (posiblemente por la existencia de más de una secuencia viral amplificada, distintas entre sí o artefactos en la PCR) y iv). más de dos picos de señal para una base como se señaló en el inciso anterior pero sin el señalamiento de N's. Para poder resolver con mayor certeza los problemas presentados, fue necesario obtener ambos sentidos de cada fragmento (sentido y antisentido), así como la clonación de algunas muestras (ver RESULTADOS). Para la conversión de los archivos formato .ab1 de Chromas Lite Versión 2.01 (electroferograma de la secuencia) a formato FASTA (figura 6.6.1), se utilizó el programa *Sequence Conversion* disponible en Internet.

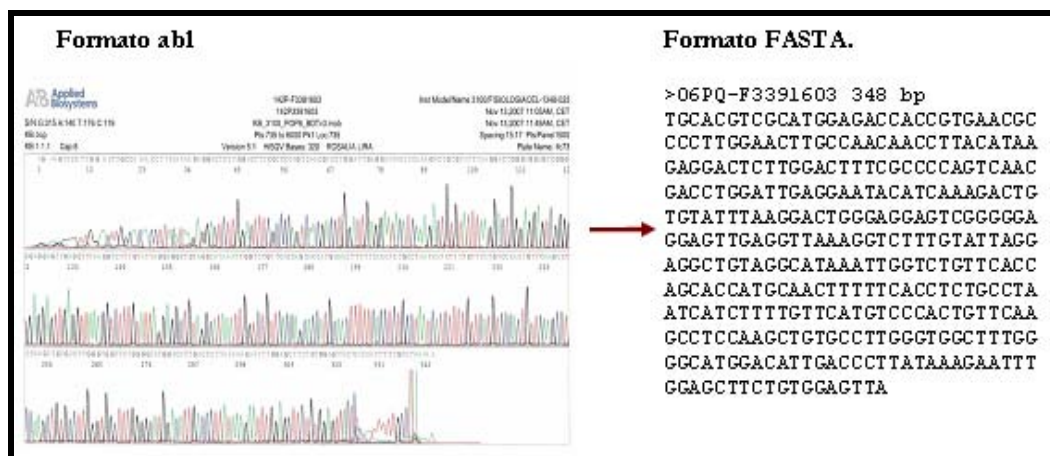


Figura 6.6.1. *Conversión de secuencias.* Se muestra el ejemplo de la secuencia nucleotídica en formato .ab1 a su conversión a formato FASTA para el análisis posterior de cada secuencia del promotor del gen *core* de HBV.

6.6.2. Correspondencia del fragmento secuenciado con HBV.

Con la intención de corroborar que el fragmento secuenciado en el laboratorio, correspondía efectivamente a la región del promotor del gen *core* de HBV, se hizo en primera instancia una búsqueda de secuencias con identidad viral a las obtenidas en el laboratorio, mediante un BLAST nucleotídico del National Center for Biotechnology Information NCBI (se introdujeron cada una de las secuencias -sentido y antisentido por muestra- obtenidas en formato FASTA).

6.6.3. Determinación de genotipos de HBV.

Para la determinación de los genotipos virales presentes en los pacientes estudiados, se accedió al *Genotyping tool* del NCBI disponible en Internet (Rozañov, M. *et al.*, 2004) para identificar con base a la secuencia en formato FASTA introducida al programa, el genotipo viral de HBV al que pertenecían las secuencias de interés. Adicionalmente, se construyó un dendograma con secuencias prototipo de genotipos de HBV con las secuencias de las muestras obtenidas en este estudio. El alineamiento de todas las secuencias de 339 pares de longitud (1613-1942 del ORF C) se hizo utilizando el software CLUSTALX y se corrigió manualmente por inspección visual. Los árboles se generaron con el método de Neighbor Joining con un bootstrap de 1000 replicados y con el modelo de Kimura 2 Parámetros en el programa MEGA4.

De esta manera, se verificó que el fragmento secuenciado correspondía al virus de la hepatitis B y a alguno de sus 8 genotipos en particular. Con las tres secuencias prototipos disponibles en el GenBank (Cuadro 6.6.3 y 6.6.4) de los genotipos H y F, se hizo la comparación siguiente de éstas con las secuencias obtenidas en el laboratorio. Ello permitió la identificación de mutaciones.

Cuadro 6.6.3. Secuencias Prototipo Genotipo H.

Sec. Prototipo No.	No. de Acceso al GenBank ²	Características	Referencia
1	AY090454	cepa 1853Nic, genoma completo. 3215 pb DNA	Araúz Ruiz, <i>et al.</i> , 2002. PUB MED 12124470
2	AY090457	cepa 2928Nic, genoma completo. 3215 pb DNA	Araúz Ruiz, <i>et al.</i> , 2002. PUB MED 12124470
3	AY090460	cepa LA32523, genoma completo. 3215 pb DNA	Araúz Ruiz, <i>et al.</i> , 2002. PUB MED 12124470

Cuadro 6.6.4. Secuencias Prototipo Genotipo F.

Sec. Prototipo No.	No. de Acceso al GenBank ²	Características	Referencia
1	X49798	subtipo adw4, 3215 pb, genoma completo	Naumann, H., <i>et al.</i> , 1993. PUBMED 8845865
2	AF034910	(genotipo F) 3215 pb, genoma completo	Nakano, T., <i>et al.</i> , 2001. PUBMED 11161274
3	AF228965	3215 pb cepa C-1858 aislado sa16, genoma completo	Aestig, E., <i>et al.</i> , No publicado

6.6.4. Comparación entre secuencias de HBV e identificación de mutaciones.

Finalmente, para la identificación de mutaciones en el fragmento del promotor amplificado del gen *core* de cada paciente, se hizo un alineamiento múltiple mediante el programa *Multalin* disponible en la red (figura 6.6.5).

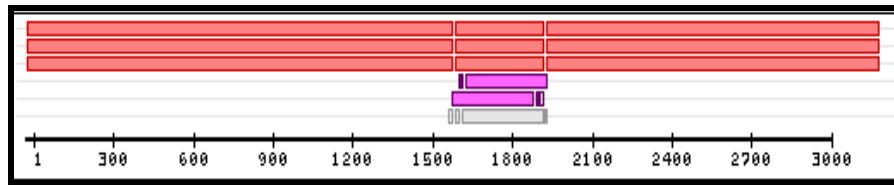


Figura 6.6.5. *Alineamiento múltiple con el programa MultAlin.* Alineación de las secuencias problema tanto sentido como anti-sentido (barras rosas) con las tres secuencias prototipo completas de 3000 nucleótidos de longitud aproximadamente (barras rojas). Estas 5 secuencias debieron pertenecer al mismo genotipo de HBV para poder ser comparables entre sí. La barra de color gris muestra la **secuencia consenso** resuelta para las dos sentidos de la muestra secuenciada. Nótese la posición en donde las secuencias problema por homología, se alinean a las prototipo y que corresponden al promotor del gen *core* de HBV: 1613-1849.

Así, se alinearon las tres secuencias prototipo de HBV (cuyo genotipo debió ser el mismo a aquél al que resultó pertenecer la secuencia a comparar) con cada una de las secuencias obtenidas (tanto el sentido como el anti-sentido) en el laboratorio. De este modo, se consideró como un cambio o mutación en la secuencia problema, aquella(s) base (s) que se diferenciara de la indicada en las tres secuencias prototipo para esa posición en específico. Por citar un ejemplo, si las tres secuencias prototipo indicaban adenina (A) en el nucleótido 1615 y en esta misma posición pero en la secuencia problema, se identificó guanina (G) en vez de A, esto determinó una mutación (reportada como A1615G). De la misma forma se evaluaron las deleciones e inserciones.

6.6.5. *Obtención de secuencias consenso.*

Al haber obtenido las secuencias sentido y anti-sentido de cada muestra y una vez hecho el alineamiento múltiple, fue necesario resolver entre éstas dos secuencias y obtener así la secuencia única o consenso por cada muestra trabajada (figura 6.6.5). Estas secuencias consenso fueron útiles para el alineamiento final y completo que incluyó todas y cada una de las muestras de los pacientes junto con las secuencias prototipo de HBV para visualizar mejor los cambios hallados en todo el conjunto de pacientes de este estudio; así como también fueron necesarias para la construcción de dendogramas.

6.7. **Análisis estadísticos.**

Para los datos de los pacientes, se obtuvieron las respectivas medias y desviaciones estándar (DS) así como las frecuencias por grupos de pacientes para el \log_{10} de la carga viral, niveles de AST y ALT así como la lectura de la densidad óptica (DO) en el lector de placas de ELISA para la detección de antígenos y anticuerpos de HBV. Se calcularon los intervalos de confianza de 95 % con la prueba estadística *t*-student y se evaluó la independencia entre las variables mediante X^2 y Tablas de Contingencia de 2x2 así como Análisis de Varianza ANOVA (Comparación múltiple con la prueba de Dunnett). Se consideró el valor de $p < 0.05$ como significativo. Para la elaboración de gráficos y de algunas pruebas estadísticas, se utilizó el software Prisma® versión 5.0.

7. RESULTADOS

7.1. Pacientes con HBV.

El estudio incluyó 42 pacientes mexicanos con diagnóstico de infección con el virus de la Hepatitis B (por serología, todos HBsAg positivos): 32 hombres y 10 mujeres, cuya edad promedio fue de 32.7 (rango 16-41) y 38.2 años (rango 16-64), respectivamente. Todos ellos derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), atendidos en el Centro Médico Nacional siglo XXI -Hospital de Especialidades, Banco de Sangre Central y del Centro Médico Nacional La Raza (cuadro 7.1.1).

Cuadro 7.1.1 Características generales de los pacientes con Hepatitis B que participaron en el estudio.

Procedencia n (%)	Sexo n (%)	Edad (X)
34 (80.9)		
Centro Médico Nacional		
La Raza	Hombres	Hombres
5 (11.9)	32 (76.2)	32.7 años
Banco de Sangre Central		
3 (7.14)		
Centro Médico Nacional	Mujeres	Mujeres
siglo XXI -Hospital de	10 (23.8)	38.2 años
Especialidades		
TOTAL: n = 42 pacientes		

A partir del suero obtenido en cada paciente se determinaron los títulos de antígenos y anticuerpos específicos a HBV (ver Apéndice I). Así, los resultados del cuadro 7.1.2 muestran que todos los pacientes resultaron positivos a HBsAg por más de seis meses (100%), lo que evidencia la infección por HBV y que el paciente se encuentra en la etapa crónica de la infección. En el caso de los pacientes provenientes del Banco de Sangre cuyo historial médico se desconoce y por tanto el tiempo de la positividad de HBsAg es incierto (HBV-48, 57, 62, 81 y 86), los valores de las billirrubinas estuvieron dentro del rango normal, lo que podría evidenciar que el curso clínico de estos pacientes es también hepatitis crónica pues el incremento en este marcador se da principalmente en la etapa aguda de la infección.

En el caso del anticuerpo anti HBeAg, el 31% de los pacientes resultaron ser positivos (cuadro 7.1.2) mientras que el otro 69% resultaron HBeAg positivos indicando que éstos pacientes al momento del estudio, presentaban una hepatitis crónica activa. Esto representa un valor elevado de pacientes con alta replicación viral. Por otro lado, ninguno de los pacientes presentó títulos para el anticuerpo anti-HBs (cuadro 7.1.2). Este anticuerpo es indicador de protección y recuperación (White, D. & Frenner, F. 1994).

Finalmente para el marcador anti-Core (IgG), se observó que el 93 % de los pacientes resultaron positivos a este anticuerpo (cuadro 7.1.2) indicando que éstos pacientes presentan hepatitis crónica, aunque este marcador también se presenta en la etapa aguda de la infección, por lo que no es útil en la distinción de una etapa u otra. En conjunto, estas pruebas de serología indican que los pacientes (42/42) están en la etapa crónica por HBV, la positividad de HBeAg en la mayoría de ellos (29/42) asimismo indica que están en la fase de hepatitis activa o de alta réplica viral que se confirma por la negatividad del anti-HBs.

Cuadro 7.1.2. Resultados serológicos determinados en pacientes con HBV.

Marcador serológico para HBV		Positivo n (%)	Negativo N (%)	Total
Anticuerpos anti- HBV	Anti-HbeAg	13 (31)	29 (69)	42 (100%)
	Anti-HBs (AUSAB)	-	42 (100)	
	Anti-Core (IgG)	39 (93)	3 (7.1)	
Antígenos HBV	HBeAg	29 (69)	13 (31)	
	HBsAg	42 (100)	-	

A partir del suero obtenido de cada paciente, se determinaron los niveles de enzimas hepáticas como marcadores biológicos de las condiciones patológicas en el hígado por la infección por HBV (cuadro 7.1.3). Como es de esperarse, al tener datos de serología indicativos de etapa crónica de la infección, los resultados de las pruebas de función hepática, reafirman este hecho: las bilirrubinas que generalmente se incrementan durante la etapa aguda, se encontraron en niveles normales (97.7 y 92.8 % para Bilirrubina directa y total, respectivamente) en casi todos los pacientes. No así en el caso de las enzimas de funcionamiento hepático, (cuadro 7.3) ya que alrededor de la mitad de los pacientes (45.2 y 50% para ALT y AST, respectivamente) presentaron niveles por arriba de rango normal lo que podría señalar su relación con la positividad para HBeAg en donde los pacientes con este antígeno presentan daño hepático. Cabe mencionar que este aumento en los niveles de enzimas hepáticas depende no sólo de la presencia del antígeno *e* sino también de otros factores como el estado inmunológico del paciente (Rehermann, R. & Nascimbeni, M. 2005); para este estudio hubieron pacientes HBeAg negativos pero con niveles de transaminasas elevados (datos no mostrados).

Cuadro 7.1.3. Resultados de las pruebas de funcionamiento hepático (PFH) de pacientes con HBV.

Marcador hepático	Valores límites Normales	Dentro del rango Normal n (%)	Por arriba del rango normal n (%)	Total n (%)
ALT	(30-65 U/L)	23 (54.8)	19 (45.2)	42 (100)
AST	(15-37 U/L)	21 (50)	21 (50)	
BD	(0-0.30 mg/dL)	41 (97.7)	1 (2.3)	
BT	(0-1.0 mg/dL)	39 (92.8)	3 (7.2)	

Los valores resultantes de la CV en los 42 pacientes fueron desde >200 hasta 68,000,000 copias/mL (Apéndice I). Se obtuvo el logaritmo natural base 10 de cada carga viral. En el cuadro 7.1.4 se muestran los intervalos de clase elaborados mediante la *regla de Sturges* (Daniel, W. 2006) con los logaritmos de la CV obtenida.

Cuadro 7.1.4. Intervalos de Clase del log 10 de la Carga viral (CV) y su frecuencia.

No.:	Intervalo log 10 CV:	Frecuencia
1	[0 - 1.2]	2
2	[1.3 - 2.5]	2
3	[2.6 - 3.8]	5
4	[3.9 - 5.1]	10
5	[5.2 - 6.4]	12
6	[6.5 - 7.8]	11
Total		42

*Celdas sombreadas indican muestras cuya log de la carga viral fue muy pequeño y por tanto, descartadas debido a la dificultad para extraer DNA viral.

Debido a la dificultad de extraer DNA viral de pacientes con bajas cargas virales, la mayoría de las muestras trabajadas fueron aquellas con logaritmos de CV mayor a 2.6 (la muestra amplificada y secuenciada con menor carga viral fue la HBV-62 con 4,400 copias/mL, log 3.6).

Así también, en términos clínicos y de diagnóstico (ver Introducción), se considera que pacientes con una carga viral mayor a 10^5 copias/mL ($\log_{10} 5$) representa alta carga viral (Servoss, J. *et al.*, 2005). En base al cuadro, una muestra del intervalo de clase 4 (HBV-151) y todas las de los intervalos 5 y 6 agruparon pacientes con alta carga viral (24/42) lo que constituye el 57% de los pacientes con replicación activa.

7.2. Amplificación y Secuenciación.

En el laboratorio, previamente se observó que aquellas muestras con CV <4000 copias/mL ($\log_{10} <2.6$) no amplificaban por PCR, por lo tanto, el criterio de exclusión para la extracción de DNA total fueron muestras con $\log_{10} < 2.6$. Se logró obtener suficiente material genético a partir de 35 de las 42 muestras; fueron descartadas 4 por tener una CV <200 copias/mL o log 2.3 (HBV-136, 139, 140 y 141) así como otras 3 por no contar con la cantidad suficiente de material biológico para la extracción de DNA.

En la figura 7.2.1 se muestran los resultados del ensayo de controles negativos y positivos para todos los PCR realizados en el que se evidencia la *especificidad* de los iniciadores utilizados en este trabajo (figura 7.2.1, carriles 1 y 2). En el carril 3 hay una muestra de paciente infectado con HBV y alta CV ($\log_{10} 7.8$) y que siempre amplificó el fragmento con el tamaño esperado de 339 pb (HBV), indicando el funcionamiento idóneo de la técnica, reafirmando verdaderos positivos.

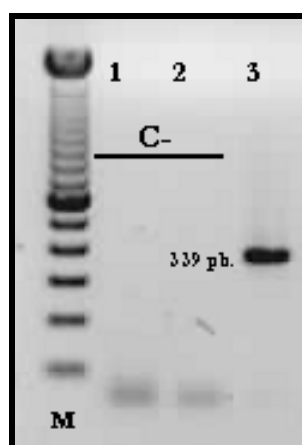


Figura 7.2.1. Fragmento de 339 pb amplificado por PCR. Electroforesis en gel de agarosa 1% con BE. Para este PCR de prueba, se utilizaron en el ensayo, las siguientes muestras como templado: *Controles negativos* (C-) 1. DNA de individuo sano; 2. Agua inyectable; *Control positivo* 3, DNA de paciente con HBV. **M:** Marcador de Peso Molecular, cada banda refiere 100 pares de bases, pb: pares de bases.

En la figura 7.2.2 se muestran los primeros ensayos con las muestras de difícil amplificación cuyo número de muestra se resalta en color rojo.

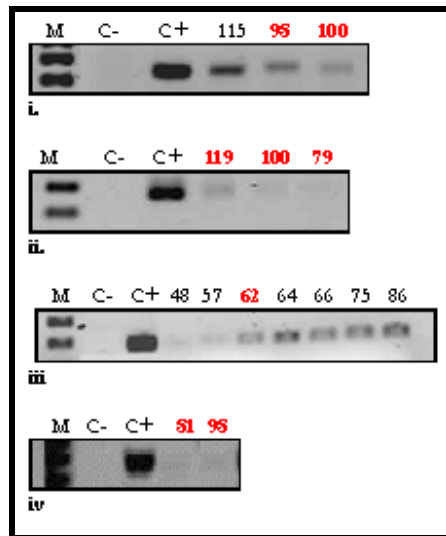


Figura 7.2.2. Muestras de difícil amplificación del fragmento de 339 pb. Geles de agarosa al 1%. Se denota en rojo los carriles cuyo producto de PCR corresponde a las muestras que tuvieron baja amplificación del fragmento viral con respecto a otras muestras. Se muestran 4 paneles (i-iv), los cuales contienen además fragmentos que amplificaron bien. Las bandas de interés (F339 pb) se ubican entre el marcador 300 y 400 (lado izquierdo). M: Marcador de Peso Molecular.

Finalmente, se obtuvo la cantidad necesaria de producto de PCR amplificado del fragmento de 339 pares de bases, a partir de 35 muestras de pacientes con HBV. Una vez resueltos los problemas de poca amplificación, se logró aumentar el amplificado para las muestras de baja CV mostradas en la figura anterior (en color azul figura 7.2.3).

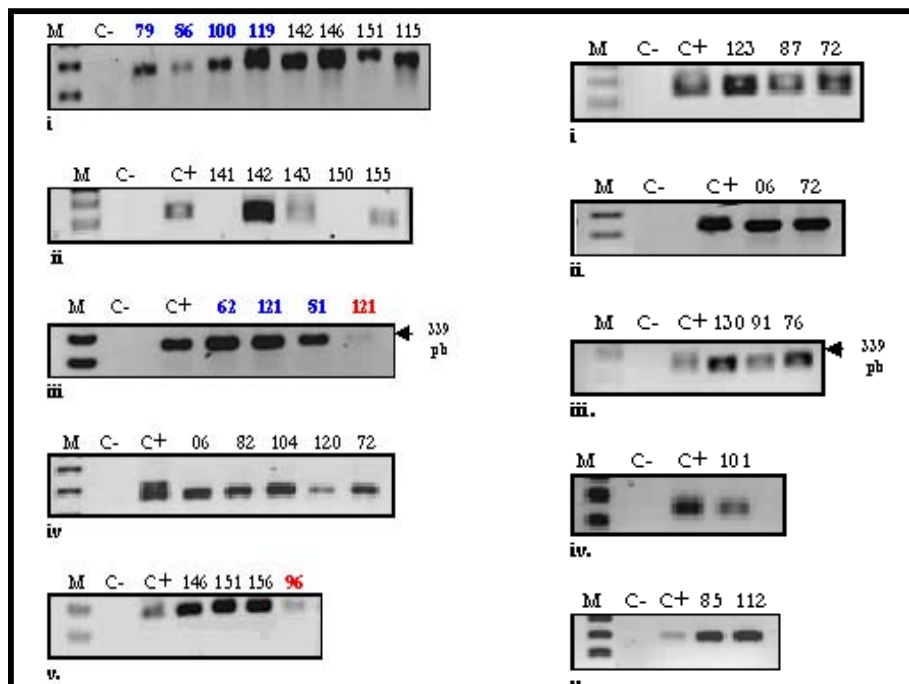


Figura 7.2.3. Muestras amplificadas por PCR: fragmento de 339 pb. Geles de agarosa al 1%. Las bandas de interés (F339 pb) se ubican entre el marcador 300 y 400 (lado izquierdo).M: Marcador de Peso Molecular

Una vez que se obtuvo la cantidad de DNA viral amplificado por PCR, para cada muestra se obtuvieron y analizaron los dos sentidos de los fragmentos secuenciados (Sentido 1603 y Anti-sentido 1942). En la figuras 7.2.4 se muestra un ejemplo representativo de los electroferogramas obtenidos, en este caso para la muestra HBV-142.

Como se ve es una lectura clara y confiable, sin embargo, existen los inicios y finales dudosos por la falta de la adecuada definición de esas señales. Sobre todo este problema se acentúa más cuando el fragmento secuenciado es el sentido 1603 (figura 7.2.4, arriba). Por ello se decidió secuenciar con el anti-sentido 1942 que por complementariedad de bases, éste representa el inicio poco confiable del fragmento sentido 1603.

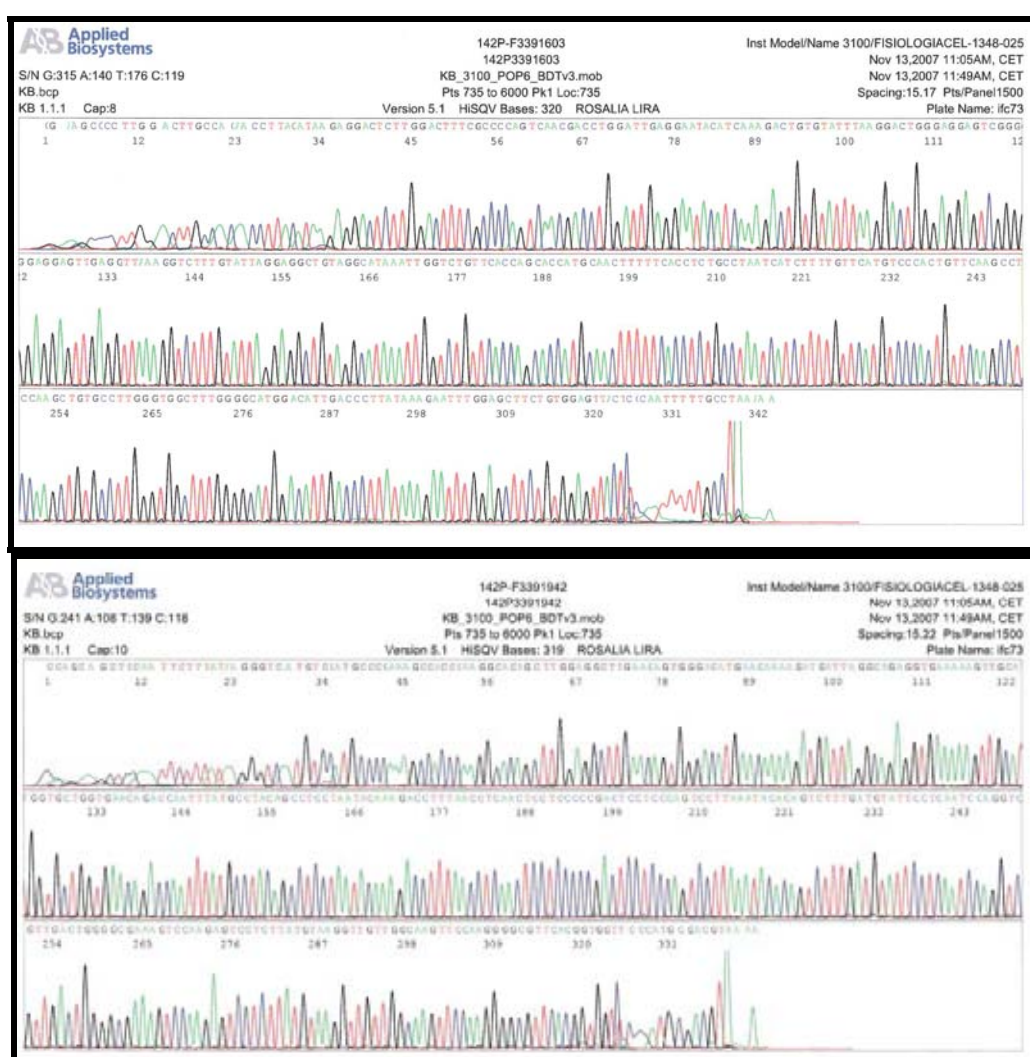


Figura 7.2.4. Electroferogramas de la muestras HBV 142. Arriba: Sentido 1603, este es el electroferograma de la muestra 142 que representa un ejemplo de lo que se consideró una lectura confiable. Nótese el inicio y fin con 10-15 bases poco confiables. Abajo: Anti-sentido 1942, el inicio y fin con 10-15 poco confiable aunque este inconveniente se acentúa menos al final.

7.3. Clonación.

En el caso de las muestras 72 y 81 (después de evaluar sus primeros electroferogramas) se decidió clonarlas para poder separar las posibles secuencias virales existentes en la muestra o determinar si se trataba de un artefacto dado por el PCR (figura 7.3.1). Después de su clonación, se secuenciaron dos clones de cada muestra y los electroferogramas se resolvieron con una secuencia confiable mostrando que estas dos clonas trabajadas para cada muestra, en efecto resultaron distintas entre sí, representando que en estos paciente puede estar circulando más de una variante viral o quasispecies no detectadas por PCR directo en donde sólo se amplifica una y sólo una secuencia viral (Carman, W. *et al.*, 1993). En el caso del primer electroferograma obtenido a partir de la muestra HBV-143, hubieron 3 sitios en la señal de fluorescencia en los que se denotó N, en cuya posición se pudo determinar perfectamente dos bases nitrogenadas para ese sitio (dato no mostrado), indicando puede haber una u otra base (ver cuadros de mutaciones más adelante), quizás indicando que se amplificó más de una variante viral. No obstante, para este caso, no se continuó con la clonación.

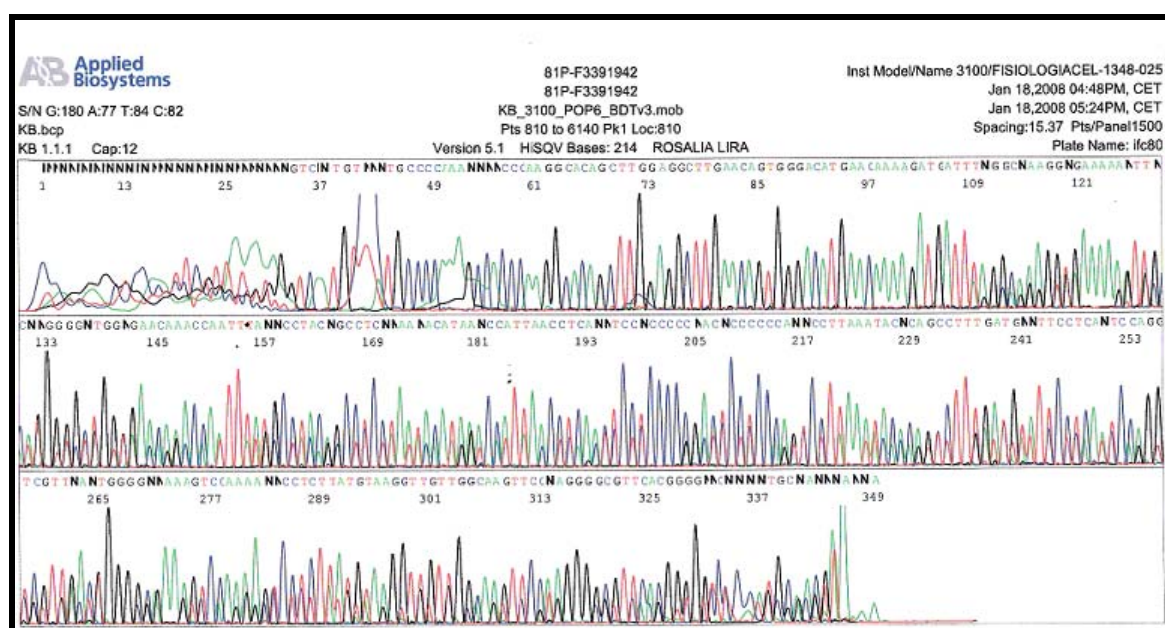
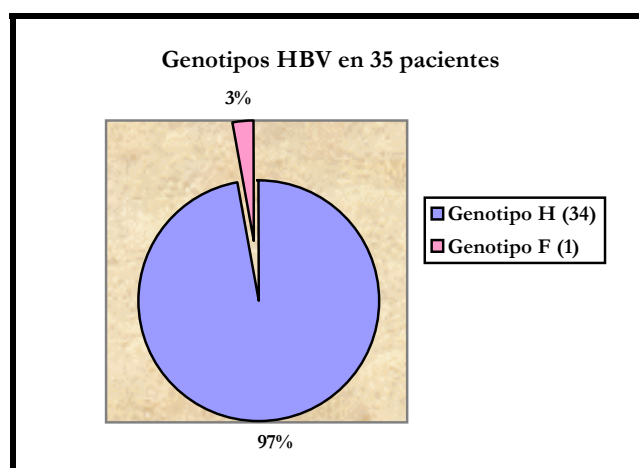


Figura 7.3.1. Electroferograma de la muestras HBV 81 (Anti-sentido 1942): Este es el electroferograma de la muestra 81 que representa un ejemplo de lo que *no* se consideró una lectura confiable. Nótese la gran cantidad de sitios no resueltos indicados con N.

7.4. Genotipificación

Mediante la herramienta *Genotyping* (NCBI) se compararon las secuencias obtenidas con aquéllas ya reportadas en la base de datos del NCBI. Se determinó que 34 de las 35 secuencias correspondieron al genotipo H (97.2%), mientras que la muestra restante (HBV-115) correspondió al genotipo F (2.8%). Con este resultado, se reafirma lo ya reportado para México: el genotipo H predomina en pacientes mexicanos (figura 7.4.1).



Gráfica 7.4.1. Genotipos de HBV encontrados en 35 pacientes mexicanos. Se observa que el genotipo predominante fue el H. Se halló solo un paciente con genotipo F.

También se construyó una dendrograma (MEGA 4) con las secuencias prototipo de cada una de los 8 genotipos de HBV junto con las secuencias obtenidas en este trabajo, el cuál corrobora el agrupamiento de estas muestras en su respectivo genotipo H y F (Figura 7.4.2).

Se observó que las muestras del genotipo H se agruparon de modo interesante. Las secuencias prototipo del genotipo H mostraron variación entre los nucleótidos 1635-1640 (figura 7.5.3), por tanto las secuencias prototipo 1 y 2 resultaron ser iguales entre sí en esta región, con respecto a la 3. Se observó que 23/34 (67.7%) secuencias se parecieron más en esta región variable a la prototipo 3 (cepa LAS2523, [AY090460.1](#)) mientras que las restantes 11/34 (32.3%) se parecieron más a las prototipo 1 y 2 (cepa1853Nic, [AY090454.1](#) y cepa 2928Nic, [AY090457.1](#), respectivamente), lo cual se ve claramente en el árbol obtenido ya que las muestras que más se parecieron las prototipo 1 y 2 se agrupan en un clado mientras que las restantes se agrupan junto con la secuencias prototipo 3. Esto denota la variación aún entre aislados del mismo genotipo de HBV y las muestras de este estudio exhiben esa misma variabilidad de nucleótidos observada para estas secuencias prototipo del genotipo H.

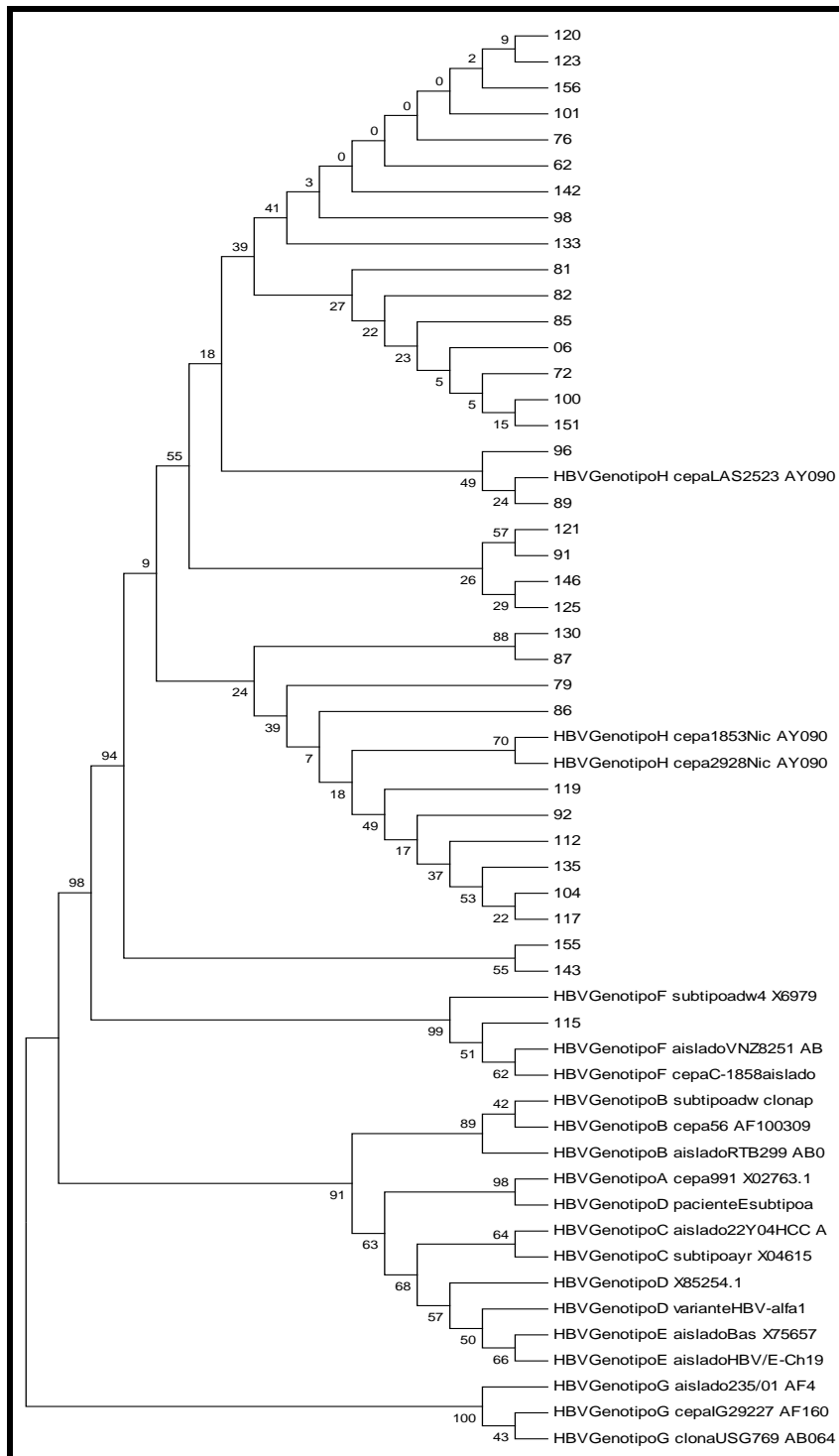


Figura 7.4.2 Relaciones evolutivas de 55 secuencias prototipo de 8 genotipos de HBV y 35 secuencias de pacientes mexicanos con HBV obtenidas en este estudio. La historia evolutiva se infirió utilizando el método del vecino más cercano (NJ, Neighbor-Joining). Las distancias evolutivas se calcularon por el método de Kimura 2 parámetros. Los valores de bootstrap basados en 1000 replicas se muestran en la base de cada clado. MEGA4.

7.5. Alineamiento múltiple e identificación de mutaciones.

Con el genotipo viral de cada una de las muestras secuenciadas, se hizo la comparación con las tres secuencias prototipo de HBV de cada genotipo identificado. Así, se compararon las 35 secuencias consenso de Genotipo H con las 3 prototipos de este mismo genotipo. Por otro lado, la muestra HBV-115 se comparó con las 3 secuencias de referencia del Genotipo F (figura 7.5.1).

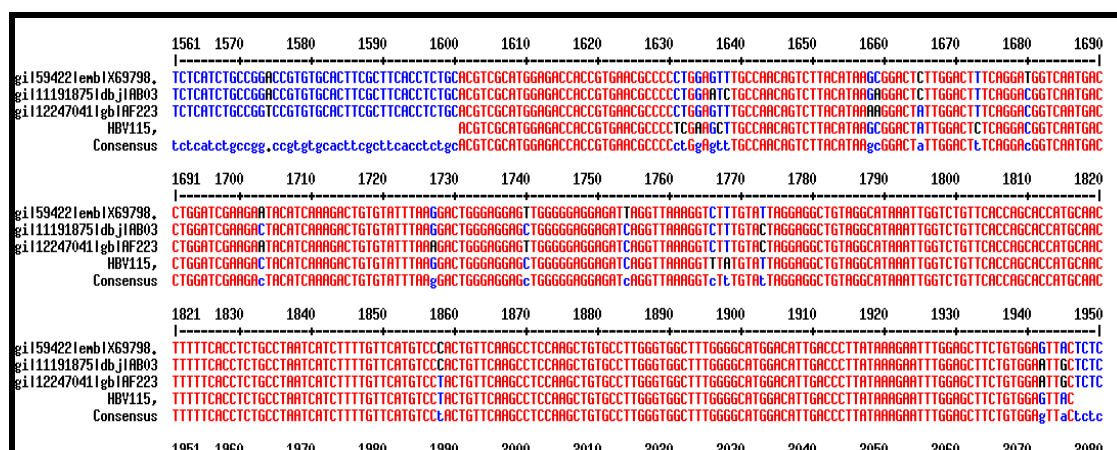


Figura 7.5.1. Alineamiento múltiple, Genotipo F. Se observa la secuencias consenso de la muestra HBV-115 comparada con las 3 secuencias prototipo del Genotipo F (parte superior del alineamiento). Las letras en rojo indican la igualdad en las bases entre las secuencias de referencia y la obtenida en este estudio. Las letras en color negro indican diferencias entre las secuencias prototipo y la 115: esto se consideró como una mutación.

En los alineamientos con las secuencias prototipo se puede ver que las letras en rojo indican igualdad de esas bases entre todas las secuencias. En cambio, las letras que aparecen en azul y negro indican lo que se determinó como una mutación: la letra negra se refiere al cambio para esa base en la secuencia problema (figura 7.5.2).

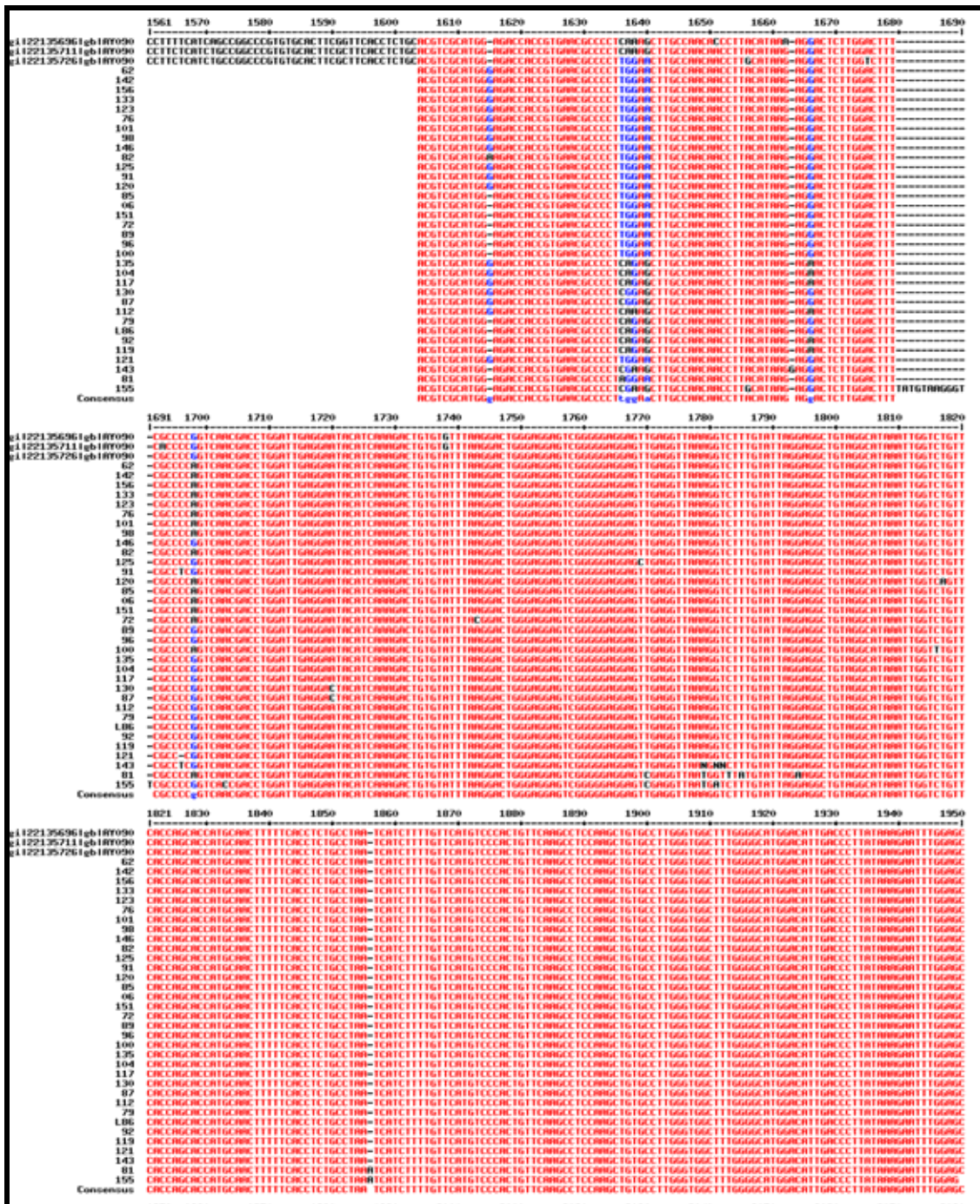


Figura 7.5.2 *Alineamiento múltiple, Genotipo H.* Se observan todas las secuencias consenso comparadas con las 3 secuencias prototipo del Genotipo H (parte superior del alineamiento). Las letras en rojo indican la igualdad en las bases entre las secuencias de referencia y las obtenidas en este estudio. Las letras en color negro indican diferencias entre las secuencias prototipo y las problema: esto es una mutación. Cabe aclarar que el multi-alineamiento no muestra las posiciones reales de cada mutación, al modificarse con la inserción de 12 pares de bases de la muestra HBV-155, entre otras.

Con respecto a la base nucleotídica de las 3 secuencias prototipo, indicadas en azul para esta misma posición en particular (figura 7.5.3): hay casos en donde se advierte la variabilidad entre las tres secuencias prototipo como se ve en el alineamiento. Por ejemplo, las dos primeras prototipo F presentaron citosina en la posición 1665, mientras que la tercera presenta adenina (A); la secuencia 115 presenta igualmente citosina (C). Al no haber una diferencia completa entre las prototipos y las problema, no se trata de una mutación. Cabe mencionar que se observó que algunas muestras se parecieron más a una prototipo que a otra, justamente en estas regiones variables. Variabilidad esperada en secuencias del virus de la Hepatitis B y que además su posición no afecta ningún dominio funcional en el promotor del *core* (particularmente en la región 1635-1640).

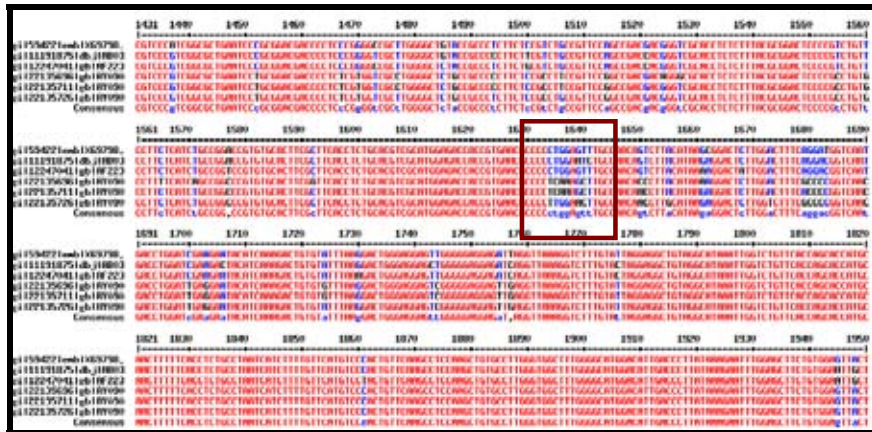
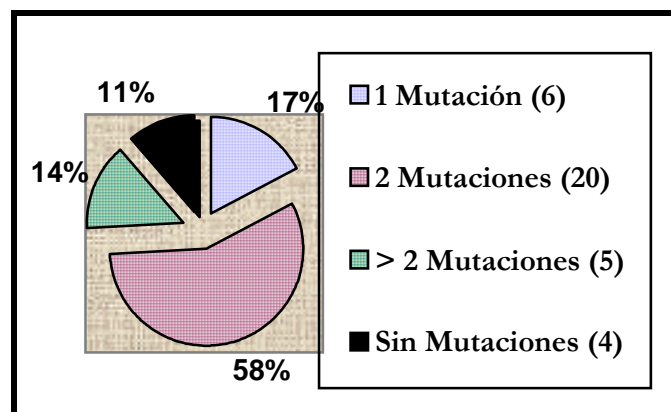


Figura 7.5.3. Variabilidad entre las secuencias prototipo del Genotipo H y F. Se muestran en azul y negro, las bases que no son iguales aún entre las secuencias prototipo (recuadro rojo). Este fragmento corresponde al fragmento de 339 pares de interés para este estudio. Las primeras tres secuencias son de genotipo F, las tres últimas pertenecen a genotipo H.

Se encontró que 31 de las 35 muestras presentaron al menos una mutación (88.6%), mientras que las 4 restantes (11.4%) no presentaron mutación alguna (gráfica 7.5.4). En algunas muestras se encontraron hasta 7 inversiones (el cambio de una base por otra), siendo 2 mutaciones la frecuencia mayor en 20 de éstas 30 muestras (figura 7.5.5).



Gráfica 7.5.4. Número de mutaciones halladas en los 35 pacientes con HBV. El número de muestras que presentaron ese número de mutaciones se indica entre paréntesis.

No.	Muestra HBV:	Mutaciones	
1	06		G1684A
2	62	G1615	G1684A
3	72		G1684A
4	76		G1684A
5	79	Ninguna	
6	81		G1684A, A1765T, C1769T, T1771A, A1842 G1780A, T1756C
7	82	A1615	G1684A
8	85		G1684A
9	86	Ninguna	
10	87	G1615	A1707C
11	89	ninguna	
12	91	G1615	C1682T
13	92		G1664A
14	96	Ninguna	
15	98	G1615	G1684A
16	100		G1684A
17	101		G1684A
19	104	G1615	G1664A
19	112	G1615	G-1664A
20	115-F*		C1631T, T1632C, G1634A, T1637C, T1673C, C1766T, T1768A
21	117	G1615	G1664A
22	119		G1664A
23	120	G1615	G1684A
24	121	G1615	T1803A
25	123	G1615	G1684A
26	125	G1615	T1756C
27	130	G1615	A1707C
28	133	G1615	G1684A
29	135	G1615	G1664A
30	142	G1615	G1684A
31	143		C1682T, G1661, A1766W, G1767R, T1768Y
32	146	G1615	
33	151		G1684A
34	155		1677-1689: inserción 12 pb; A1853; A1691T, T1756C, A1765T, y G1767A
35	156	G1615	G1684A
Total mutaciones mas frecuentes		20/35	16/35

Figura 7.5.5. Mutaciones identificadas en cada paciente a partir del Multialineamiento con secuencias prototipo de HBV. Se muestra el total de muestras que presentaron las mutaciones más frecuentes G1684A y G1615. Para la muestra HBV 143, en los sitios señalados se identificaron dos bases para esa misma posición. Así, por convención, **W** representa las bases Adenina y Timina; **R** Adenina y Guanina; **Y** Citosina y Timina. La muestra HBV-115 se señala en rosa, por ser la única perteneciente al genotipo H.

7.6. Mutaciones en el promotor del core.

En la figura 7.6.1 se presenta un esquema del promotor del core con todos sus elementos funcionales (Elemento de Regulación Negativa o NRE, Promotor Básico del Core o BCP, etc.) así como los sitios de unión a factores de transcripción hepáticos y ubicuos (HNF-3 y 4, SP1 respectivamente) y la lista con cada una de las 31 muestras genotipo H que presentaron mutaciones, así como la ubicación de las mismas en el promotor. Además, se indican las mutaciones para cada muestra y su contraparte en la secuencia consenso de las tres prototipo de este genotipo H, resaltándose cada uno de los cambios en un mismo color para las muestras que los presentaron.

En los cuadros 7.6.2, 7.6.3 y 7.6.4, se muestran las frecuencias de las mutaciones identificadas o localizadas en cada una de las secuencias obtenidas, así como su ubicación en el promotor viral y su posible relevancia en la regulación del mismo. Para las muestras pertenecientes al Genotipo H (cuadros 7.6.2 y 7.6.3), se identificaron 17 cambios de nucleótidos o mutaciones en el

promotor del *core* únicamente (no se consideraron los cambios en el ORF C), distintas entre sí: 14 inversiones (cuadro 7.6.1) y 3 inserciones (cuadro 7.6.2) una de ellas de 12 pares de longitud (HBV-155).

La mayoría de las mutaciones identificadas se ubican en la región reguladora río arriba o URS, la cual a su vez contiene los elementos funcionales NRE y la región reguladora río arriba del *core* (CURS). Aquí se observan las mutaciones más frecuentes (A1615, G1684A y G1664A), particularmente la inserción G1615 (figura 7.6.1) que se posiciona en la *secuencia mínima* de regulación en el NRE (nt.1613-1620); las inversiones G1684A en el dominio γ (nt. 1671-1686) de CURS A y G1664A en el dominio α (nt. 1646-1668), también de CURS A. Todos estos motivos participan en la regulación del BCP y con ello, en la síntesis de la proteína Core y el antígeno *e*.

Particularmente en la muestra HBV-155, su inserción de 12 pares de bases podría hipotéticamente explicar la ausencia de antígeno *e* en el paciente, ya que sin lugar a duda, esta inserción está adicionando nucleótidos que pueden afectar la síntesis de este antígeno (perdida de sitios de inicio para el mRNA, modificando sitios de unión a factores de transcripción). No obstante, se requiere de un análisis más profundo para explicar cómo esta adición de nucleótidos podría afectar la función del CP.

Es importante mencionar que el fragmento de 339 pares de bases, incluyó hasta el nt. 1942 que es la parte inicial del ORF C. En esta región sólo se encontró una inserción de adenina en el nt. 1853 (A1853) en el marco de lectura que podría afectar la estructura y/o funcionalidad de los productos virales de este ORF. Tal suposición esta aún por dilucidarse, es decir, si esa mutación es silenciosa (sin efecto alguno en las proteínas) o no.

Figura 7.6.1. *Mutaciones y su ubicación en el promotor del core.* Se observan los siguientes dominios funcionales: EnhII con sus dominios α y β ; NRE y en recuadro azul su *secuencia mínima* de regulación; CURS junto con sus dominios A y B; BCP. También se detallan los sitios de unión a factores de transcripción Sp1, HNF 3 y 4, C/EBP. En flechas se indican los dos sitios de inicio para el mRNA del Precore. El mapa comienza desde el nt. 1600 y termina en 1800. **i**: inserción. La primera secuencia mostrada corresponde a una secuencia consenso de las 3 prototipo del Genotipo H (Pro H).

Cuadro 7.6.2. Inversiones identificadas en el promotor *core* en muestras HBV: Genotipo H.

No.	Inversión	Porcentaje (%)	Frecuencia	Ubicación	Significado probable
1	G1684A	46	(16/35)	Motivo γ del CURS A	Afecta la regulación positiva del BCP
2	G1664A	17	(6/35)	Motivo γ del CURS A, dominio α del Enh II	Afecta la regulación positiva del BCP, Sitio de unión a C/EBP-HNF4
3	C1682T	6	(2/35)	Motivo γ del CURS A	Afecta la regulación positiva del BCP
4	A1706C	6	(2/35)	Dominio β del Enh II	Afecta la regulación positiva del BCP
5	T1756C	6	(2/35)	BCP	NS
6	G1729A	3	(1/35)	CURS	NS
7	T1757C	3	(1/35)	BCP	NS
8	A1765W,T	9	(3/35)	BCP	Afecta sitio de unión a HNF4 sitio 2
9	G1767R,A	6	(2/35)	BCP	Ya reportada (Li, J. <i>et al.</i> , 1999)
10	T1768Y	3	(1/35)	BCP	Sitios de inicio de los mRNA Ya reportada (Chen, C. <i>et al.</i> , 2005).
11	C1769T	3	(1/35)	BCP	Sitios de inicio de los mRNA, HNF4 sitio 2
12	T1771A	3	(1/35)	TA3, Dominio Kunitz del ORF X	Afecta sitio de unión a HNF4 sitio 2 Sitio de unión a TBP, modificación de la actividad de la proteína X
13	G1780A	3	(1/35)	Dominio Kunitz del ORF X	
14	A1691T	3	(1/35)	Dominio δ del CURS A	

NS. No significativo: cambio que cae en los espacios entre los motivos funcionales del promotor.

Cuadro 7.6.3. Inserciones identificadas en el promotor *core* en muestras HBV Genotipo H.

No.	Inserción	Porcentaje (%)	Frecuencia	Ubicación	Significado probable
1	G1615*	57	(20/35)	NRE	Afecta la <i>secuencia mínima</i> funcional para la regulación negativa del CP
2	G1661	3	(1/35)	Motivo α del CURS A. Dominio α del Enh II	Afecta el sitio de unión a C/EBP-HNF4. Regulación positiva del BCP
3	1677-1689(12 pb)	3	(1/35)	Motivos γ y δ del CURS A. Dominio α del Enh II	Pérdida importante de los nts. Para la regulación positiva del BCP

NS. No significativo: cambio que cae en los espacios entre los motivos funcionales del promotor.

*A1615, una de las 20 muestras (HBV82), presentó adenina insertada en vez de guanina.

Para el caso de las mutaciones identificadas en la muestra HBV 115, que por pertenecer al genotipo F no se muestra en la figura 7.6.1, sólo se detallarán en el cuadro 7.6.4 las inserciones identificadas en esta muestra. Únicamente se identificaron inversiones. Estas mutaciones se hallan en los elementos NRE aunque no en su secuencia mínima esencial, en el motivo γ del CURS y mutaciones cercanas a las cajas tipo TATA pero no en ellas: TA1 y TA3 (ver el alineamiento con sus secuencias prototipo en la figura 7.5.1). Las mutaciones C1766T y T1768A se reportaron en pacientes con hepatitis fulminante y que su presencia representa factores de riesgo en pacientes con HBeAg positivos (Chen, C. *et al.*, 2005). En base a la posición de tales mutaciones, teóricamente éstas no afectan alguno de los productos antígeno *e* y proteína Core dado el fenotipo viral que expone este paciente: CV baja y HBeAg positivo, aunque esta observación se discutirá más adelante.

Cuadro 7.6.4. Inversiones halladas en el promotor *core* en la muestra HBV 115: Genotipo F.

No.	Mutación	Porcentaje (%)	Frecuencia	Ubicación	Significado probable
1	C1631T	3	(1/35)	NRE	Afecta la regulación negativa del BCP
2	T1632C	3	(1/35)	NRE	Afecta la regulación negativa del BCP
3	G1634A	3	(1/35)	NRE	Afecta la regulación negativa del BCP
4	T1637C	3	(1/35)	Motivo γ de CURS A	CURS, NS
5	T1673C	3	(1/35)		Afecta la regulación positiva del BCP
6	C1766T	3	(1/35)	BCP	Ya reportada (Chen, C. <i>et al.</i> , 2005; Tong, S. <i>et al.</i> , 2005). Sitios de inicio de los mRNA HNF4 sitio 2
7	T1768A	3	(1/35)	BCP	Ya reportada (Chen, C. <i>et al.</i> , 2005). Sitios de inicio de los mRNA, HNF4 sitio 2

NS. No significativo: cambio que cae en los espacios entre los motivos funcionales del promotor.

Tanto para las mutaciones de Genotipo H como F, se encontraron dos mutaciones ya reportadas en otros estudios con regular frecuencia (ver cuadros 7.6.2 y 7.6.4). Para ninguna de las 31 muestras se encontró la mutación dual mejor estudiada A1762T y G1764A que se localiza en el BCP a diferencia de las identificadas en este estudio que se localizaron en el URS, mayoritariamente (figura 7.6.5).

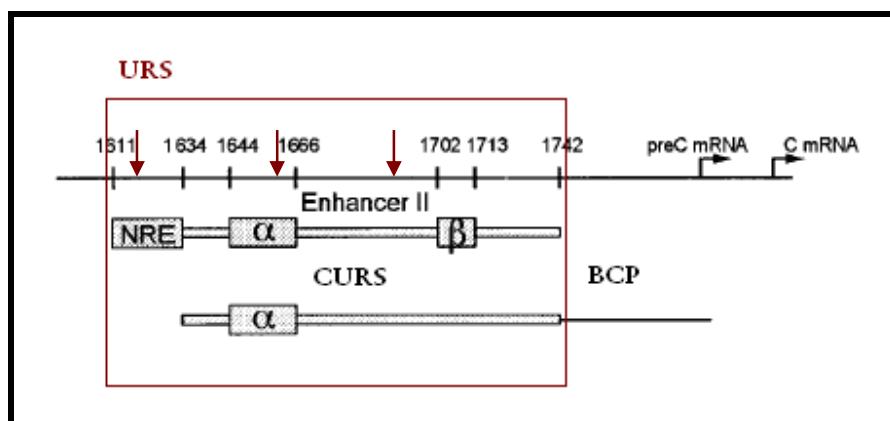


Figura 7.6.5. Mutaciones el Promotor del core identificadas en este estudio. Esquema *grosso modo* de las mutaciones encontradas en los pacientes para este estudio.

7.7. Mutaciones y Pacientes.

7.7. 1. Agrupación de los pacientes.

Para una mejor comprensión de las semejanzas y diferencias entre los grupos de pacientes y las características clínicas de la infección crónica por HBV así como con las mutaciones identificadas en cada paciente, se clasificaron en tres grupos (cuadro 7.7.1), en base a dos parámetros: carga viral mayor o menor a 10^5 copias/mL ($\log_{10} 5$) y positividad o negatividad de HBeAg.

En el Apéndice III, se muestra el cuadro con los datos que se utilizaron para la clasificación de los 35 pacientes en los tres grupos. El **grupo I** o de *Replicación activa*, correspondió a la mayoría de los pacientes que participaron en este estudio (24/35): carga viral $>10^5$ copias/mL y HBeAg positivos, con la excepción de la muestra HBV-155, la cual es HBeAg negativo por lo que

sólo se consideró su carga viral para incluirla en este grupo. El **grupo II** o de *Portadores* en el que se incluyeron por su carga viral $<10^5$ copias/mL y HBeAg negativos, 6 pacientes y el **grupo III** o de *Seroreversión* en el que se agruparon 5 pacientes por su carga viral $<10^5$ copias/mL y HBeAg positivos.

Cuadro 7.7.1. Características clínicas, viremia HBV y mutaciones en diferentes grupos de pacientes mexicanos con HBV crónica. Valores expresados como la \bar{X} de cada grupo.

Características	Grupo I Replicación Activa	Grupo II Portadores	Grupo III Seroreversión
Edad (años)	33.5	44.5	35
Sexo (F:M)	7:17	1:5	1:4
Nivel ALT/AST	81/57	87/49.5	116.4/143.2
DNA HBV (CV)	6.45	4.5	4.38
HbeAg	2.71	0.114	2.92
Tratamiento Antiviral	17	3	3
No. pacientes	24	6	5
Pacientes HBV	06,72,76,156,87,89,91,92, 112,117,120,130,133,135, 142,143,146,82,85,104,151, 123, 25 y 155 23/24	81,98,100,86,119 y 121	79,96,101,115, y 62
Muestras con mutaciones	23/24	5/6	3/5
	<i>Inversiones</i> G1684A (11) G1664A (5) C1682T(2) A1706C (2) C1729A T1756C T1757C A1765W, T (2) G1767R, A (2) T1768Y T1803A <i>Inserciones</i> G1615(16) G1661 1677-1689: inserción 12 pb; A1853, A1857	<i>Inversiones</i> G1684A (3) 1664A T1756C A1765T C1769T T1771A G1780A C1802T <i>Inserciones</i> G1615 (2) A1842	<i>Inversiones</i> G1684A (2) C1631T T1632C G1634A T1637C T1673C C1766T T1768A <i>Inserciones</i> G1615 (2)

En las figuras 7.7.2 y 7.7.3, se observan las diferencias entre los parámetros de CV y antígeno e para la formación de los 3 grupos de pacientes. En la figura 7.7.2 gráfica A, el grupo I presentó en promedio, cargas virales mayores con respecto a los dos grupos restantes que lo hace ser el grupo de replicación viral alta mientras que en la gráfica B, se muestra la negatividad del antígeno e para el grupo II.

En la figura 7.7.3 gráficas A y B, se muestra que los valores de enzimas hepáticas tanto ALT como AST, no difieren significativamente entre los grupos a pesar de que los niveles de AST en el grupo III presentaron los niveles más altos.

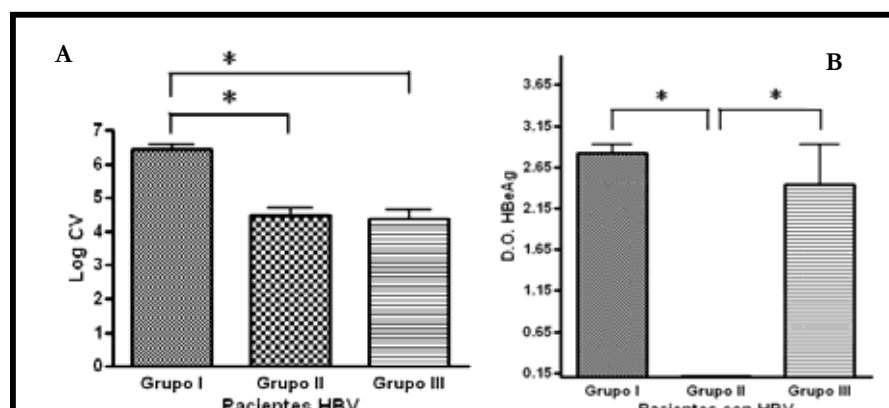


Figura 7.7.2. Diferencias en la CV y HBeAg en los 3 grupos de pacientes. En las gráficas A y B se muestran los valores del logaritmo de la CV por grupos de pacientes así como la densidad óptica (D.O.) del HBeAg registrada en cada grupos, respectivamente. * $P < 0.001$

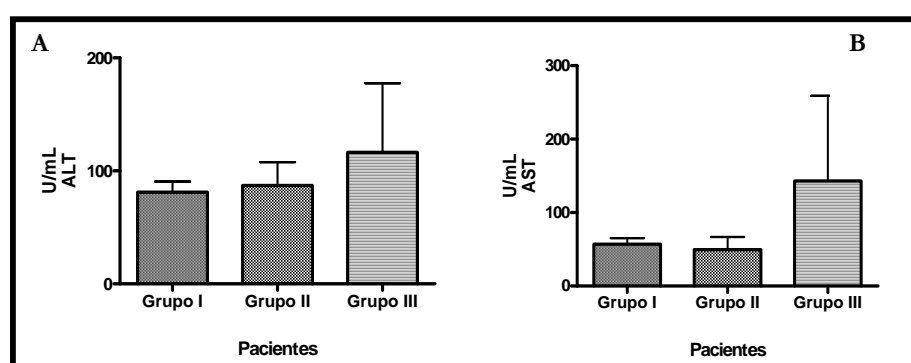


Figura 7.7.3. Diferencias en los niveles de las enzimas ALT y AST entre los 3 grupos de pacientes. En la gráfica A se muestran los niveles de la enzima hepática ALT mientras que en la gráfica B, se muestran los niveles de AST por grupo de pacientes.

7.7.2. Asociación de mutaciones con parámetros clínicos.

Se hicieron dos pruebas estadísticas X^2 y t -student para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con ciertos valores clínicos y la presencia o ausencia de mutaciones. El cuadro 7.7.4 muestra que no existe una dependencia entre las variables evaluadas pues el análisis utilizando la frecuencia de mutaciones en pacientes con alta o baja carga viral, positividad o negatividad para antígeno e o tener niveles elevados de transaminasas no depende de la presencia o no de mutaciones en el CP.

Cuadro 7.7.4. Tabla de Frecuencias. Dependencia entre presencia o ausencia de mutaciones con 3 parámetros de importancia clínica.

Parámetro clínico	Muestras		Dependencia entre las variables. $P < 0.05^*$
	Con mutaciones	Sin mutaciones	
HBeAg positivo	6	1	
HbeAg negativo	24	4	NS
CV $> 10^5$ c/mL	22	2	
CV $< 10^5$ c/mL	8	3	NS
AST elevada	16	2	
ALT elevada	14	3	NS

*Tablas de contingencia de 2x2. X².

Adicionalmente, los promedios o medias de los valores de densidad óptica para el antígeno *e*, logaritmos de la carga viral, y transaminasas se compararon entre pacientes con mutaciones y pacientes sin mutaciones (cuadro 7.7.5), mostrando que no existe una diferencia significativa entre las medias de estos dos grupos de pacientes (31 pacientes con mutaciones *versus* 4 pacientes con mutaciones). A pesar del número tan bajo de pacientes sin mutaciones, este análisis indica que al menos la presencia o ausencia de mutaciones en el CP no determina diferencias importantes en los parámetros clínicos del paciente con HBV.

Cuadro 7.7.5. Comparación de medias. Promedios de los valores de los parámetros clínicos de pacientes que presentaron o no mutaciones.

Parámetro clínico	Media de las Muestras		Diferencia entre las medias*
	Sin mutaciones (4 pacientes)	Con mutaciones (31 pacientes))	
HBeAg positivo	4.78	5.52	NS
Log 10 CV	2.18	2.50	NS
ALT	79.77	131.2	NS
AST	53.77	153.63	NS

*t-student p<0.05

Con este primer análisis de modo general, se concluye que no hay relación entre HBeAg, CV, ALT y AST con la presencia o no de mutaciones.

Para afinar el análisis, se realizó otra comparación, en donde se utilizó el número de mutaciones por muestra obteniéndose el siguiente cuadro:

Cuadro 7.7.6. Comparación de medias. Diferentes parámetros clínicos de pacientes que presentaron o no mutaciones.

Parámetro clínico	Media cada parámetro clínico			Dependencia entre las variables. P<0.05*
	Sin mutaciones	Con 1 mutación	Con 2 o más mutaciones	
HBeAg positivo	2.5	1.93	2.25	NS
Log 10 CV	4.45*	5.41	6.18*	P<0.05
ALT	131.2	63.44	86.76	NS
AST	153.6	43	58.38	NS

*t-student p<0.05.

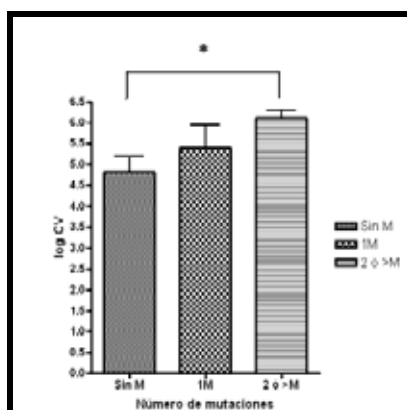


Figura 7.7.7. Diferencia entre los valores de CV y el número de mutaciones. Análisis de Varianza ANOVA. Comparación múltiple con la prueba de Dunnett (* $p < 0.05$). Sin M, sin mutaciones; 1M, una mutación; 2 ó >M, dos o más mutaciones.

El número de mutaciones no influye en los valores del antígeno e , ni las enzimas ALT y AST, No obstante, es significativa la diferencia de medias de la carga viral entre muestras sin mutaciones con respecto a las que presentan 2 mutaciones o más, siendo estas últimas, de pacientes con más carga viral (cuadro 7.7.6). Adicionalmente, con un análisis de varianza, se corroboró el resultado arrojado por t -student. Por lo anterior, se conjetura que la presencia de 2 ó más mutaciones se relacionan con una réplica viral mayor.

7.7.3. Asociación de las mutaciones más frecuentes con parámetros clínicos.

Una vez que se encontró la asociación entre mutaciones y la carga viral, se pensó en que también las mutaciones más frecuentes encontradas en los pacientes (es decir, que una parte importante de las muestras la presentaron) podrían tener alguna relación con los datos clínicos. Por tanto, se procedió a la comparación entre medias de aquellos parámetros entre pacientes con una mutación en particular y los que no la presentaron.

En el cuadro 7.7.8, se encontró que las cargas virales altas se relacionan significativamente con la mutación G1615, que además es esta la inserción más frecuente en el estudio.

Cuadro 7.7.8. Comparación de medias. Medias de los valores de los parámetros clínicos de pacientes con la inserción G615.

Parámetro clínico	Media de las Muestras:		Diferencia significativa entre las medias*
	Con G-1615	Sin mutación	
HBeAg positivo	2.42	2.05	NS
Log 10 CV	6.19	5.48	$P < 0.05$
ALT	87.12	87.11	NS
AST	62.28	73.5	NS

* t -student $p < 0.05$.

Los datos hasta ahora expuestos, dejan ver cierta consistencia: no hay asociación entre las mutaciones y los parámetros clínicos, con la excepción de que la CV alta se relaciona con 2 ó más mutaciones: en las muestras con esta característica sobre el número de mutaciones, en 18 de los 24 casos, estuvo presente la inserción G1615 (18/24; 75%) que en efecto se asocia con esta CV incrementada. Más aún, esta inserción predominó en el grupo I de pacientes y 17 de ellos (17/24) presentaron 2 ó más mutaciones, lo cual tiene sentido en este contexto clínico: alta réplica viral y HBeAg positivo (cuadro 7.7.1).

La otra mutación frecuente, la G1684A (16/31) parece no tener alguna relación con los parámetros clínicos analizados (cuadro 7.7.9) y tampoco la *presencia* de estas dos mutaciones G1615 y G1684A (cuadro 7.7.10).

Cuadro 7.7.9. Comparación de medias de los valores de los parámetros clínicos de pacientes con y sin la inserción G1684A.

Parámetro clínico	Media de las Muestras:		Diferencia entre las medias*
	Sin G1684A	Con G1684A	
HBeAg positivo	2.2	2.23	NS
Log 10 CV	5.8	5.84	NS
ALT	77.8	94.9	NS
AST	56.8	77.5	NS

*t-student $p < 0.05$.

Cuadro 7.7.10. Comparación de medias de los valores de los parámetros clínicos de pacientes con y sin las dos mutaciones G-1615 y G1684A.

Parámetro clínico	Media de las Muestras:		Diferencia entre las medias*
	Sin G-1615 y G1684A	Con G-1615 y G1684A	
HBeAg positivo	2.25	2.22	NS
Log 10 CV	6.09	5.74	NS
ALT	85.4	87.6	NS
AST	67.88	68.07	NS

*t-student $p < 0.05$.

7.7.4. Asociación de mutaciones con los pacientes que han recibido tratamiento antiviral para HBV.

Para concluir, se elaboró una tabla de los pacientes (Apéndice III) con referencia al tratamiento antiviral, carga viral y mutaciones. En base a esos datos se construyó el siguiente cuadro:

Cuadro 7.7.11. Comparación de medias de parámetros clínicos de pacientes con la inserción G1684A.

	Sin mutaciones	Con mutaciones
23 pacientes con tratamiento (Lamivudina, Interferón) (65.7%)	3 pacientes (13%)	20 pacientes (87%)
	CV > log ₅ (1 paciente)	CV > log ₅ (16 pacientes)
	CV < log ₅ (2 pacientes)	$\bar{X} = 6.75^*$
		CV < log ₅ (4 pacientes)
		$\bar{X} = 4.5$

*t-student $p < 0.05$.

Como se muestra en el cuadro 7.7.11, el 65.7% de los pacientes ha recibido tratamiento antiviral (23/35). Un 87% de éstos pacientes presentó mutaciones, en donde hay diferencia significativa entre la media de la CV de los pacientes que aún con tratamiento mantienen una carga viral elevada ($CV > 10^5$ c/mL ó log₁₀ 5) y que tienen mutaciones en el promotor viral del *core* con aquéllos con baja carga viral ($CV < \log_{10} 5$) y que también tienen mutaciones. Así, un número importante de pacientes con tratamiento, presentó mutaciones y carga viral alta. No obstante, la carga viral de pacientes con tratamiento, no se asoció a la mutación 1615 (comparación entre medias: con mutación $\bar{X} = 5.72$, sin mutación $\bar{X} = 5.58$, $p > 0.05$).

8. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

8.1. Discusión.

El objetivo principal de esta tesis fue identificar las mutaciones presentes en el promotor del gen *core* y analizar la posible relación del genotipo viral con las características clínicas de los pacientes mexicanos con HBV.

Los resultados obtenidos permitieron analizar la secuencia nucleotídica de la región del promotor *core* en 35 muestras, número que representa el 83% de los pacientes participantes en este estudio (35/42); identificar genotipos, mutaciones y asociarlos con parámetros clínicos.

Pacientes.

Las 35 muestras amplificadas en este estudio pertenecieron a pacientes HBsAg positivos y por los niveles de bilirrubinas que estuvieron dentro del rango normal (32/35; 91.4%), se determinó que el curso clínico para estos pacientes fue Hepatitis Crónica. Además el 91.4% de los pacientes (32/35 pacientes) fueron sintomáticos (pacientes bajo tratamiento antiviral) mientras que 3/35 (8.6%) resultaron ser asintomáticos, éstos últimos pertenecientes a Banco de Sangre Central (donadores).

Para poder comprender mejor las diferencias entre los distintos marcadores clínicos de la infección por HBV (CV y antígeno *e*) y su relación con las mutaciones en el Promotor del Core (CP) que pudieran afectarlos, los pacientes se clasificaron en 3 grupos. El grupo I de *Replicación Activa* se caracterizó por agrupar a pacientes con carga viral alta y ser positivos para el HBeAg, dos condiciones características en este tipo de cronicidad. Cabe mencionar que sólo una de las muestras (HBV-155) aunque fue de carga viral alta, resulto negativa para HBeAg (se sospechó que podría tratarse de una muestra con mutaciones que afectarían innegablemente la síntesis de esta proteína) no obstante, también se le clasificó en este grupo I por su CV alta. El grupo II consistió de pacientes HBeAg negativos y con una CV baja, marcadores que lo definieron como el grupo de *Portadores*, es decir, pacientes cuyo organismo ha contrarrestado la replica viral, limitándola por medio del sistema inmunitario generando anticuerpos anti HBeAg (White, D. & Frenner, F. 1994; Decker, R. 1993). Así, es de esperarse que al no haber réplica viral tampoco se exprese su marcador HBeAg. Este es un evento de conversión inmunológica de antígeno a anticuerpo denominado *seroconversión* en HBV (Valmasakis, A., 2007). Finalmente el grupo III estuvo formado por pacientes HBeAg positivos pero con carga viral baja en donde se clasificaron 5 pacientes; a este grupo se le denominó de *Seroreversión* (se sabe que una pequeña porción de los portadores inactivos serorevierten o vuelven al estado HBeAg positivos, denominado seroreversión del antígeno *e*), ya que aún después de mantener una carga viral baja, puede reaparecer el HBeAg en circulación, evidenciando la réplica viral baja en el hígado, pero no lo suficiente para ser detectada en circulación como carga viral alta (Valmasakis, A. 2007).

Para el resto de los marcadores clínicos como son los niveles de bilirrubinas totales y directas así como los de las enzimas ALT y AST no existieron diferencias significativas entre los grupos I y II (para el grupo II se ha reportado que los niveles en estas enzimas se mantienen estables; Valmasakis, A. 2007) a pesar de que en el grupo III, estos niveles enzimáticos fueron mayores; fenómeno que podría tener sentido en el contexto de la positividad de su antígeno *e* al representar un blanco inmunológico para los hepatocitos y generando con ello esta inmunopatología en el hígado, indicada por el aumento en estas enzimas de daño hepático (Valmasakis, A. 2007).

Cabe mencionar que este aumento en los niveles de enzimas hepáticas depende no sólo de la presencia del antígeno *e* o alta replicación viral sino también de otros factores como el estado inmunológico del paciente (Rehermann, R. & Nascimbeni, M. 2005).

Amplificación del fragmento de 339 pares de bases.

Mediante el sistema montado para la realización del PCR directo con los oligonucleótidos (sentido 1603 y anti-sentido 1942) fue factible la amplificación del fragmento viral de interés, así como la obtención de la cantidad de templado suficiente para la secuenciación posterior. Por lo que este método representó una técnica apropiada para la amplificación de esta región del genoma viral, logrando secuenciar 35 muestras. La sensibilidad de este sistema permitió la amplificación de muestras con carga viral muy baja (4,400 copias/mL, log 3.6). Este valor de detección representa una ventaja y utilidad en el diagnóstico clínico (por ejemplo, en pacientes con CV baja como los Portadores o Serorevertantes), tanto para la detección de DNA viral en muestras sanguíneas de los pacientes con HBV como para el análisis de las secuencias virales. Ello podría ser útil en el caso de la búsqueda de mutaciones con asociación al curso de la infección. Incluso, la búsqueda en el futuro de mutaciones en el CP en más pacientes con variabilidad en la carga viral. Sin embargo,, no se debe olvidar aquéllas muestras que no se secuenciaron dada su baja carga viral. Será necesario implementar una estrategia específica para estudiar el genoma de HBV en estos pacientes (una de las preguntas en tales estudios podría ser ¿hay mutaciones asociadas a pacientes con muy baja replicación viral?); en principio, aumentarse la cantidad de muestra biológica para la extracción de DNA total o realizar PCRs anidados.

Determinación de genotipos de HBV.

Con la secuencia nucleotídica de este fragmento de 339 pares de bases obtenido, se pudo determinar a qué genotipo viral pertenecieron cada una de las muestras, mediante un BLAST (Genotyping tool, NBI; Rozanov, M. *et al.*, 2004) con todas las secuencias prototipo disponibles en el GenBank. El 97.2% de los pacientes perteneció al genotipo H, este resultado coincide con lo ya reportado, en donde los países de la parte norte de América Latina, incluyendo América Central y México representan los límites geográficos para este genotipo (Arauz-Ruiz, P. *et al.*, 2002; Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006; Ruiz-Tachiquin, M. *et al.*, 2007). Para el único paciente que perteneció al genotipo F, este también concuerda con lo descrito para México pues estos dos genotipos H y F parecen haber tenido origen común constituyendo un grupo monofilético, siendo el H un genotipo resultante por la alta divergencia de F (Arauz-Ruiz, P. *et al.*, 2002) por lo que no es de extrañar su presencia en estos pacientes.

Este trabajo representa el primer reporte sobre el genotipo en pacientes exclusivamente de la Ciudad de México y Área Metropolitana a diferencia del trabajo de Alvarado-Esquivel, C. *et al.*, 2006 cuyos pacientes provinieron de las ciudades de México y Guadalajara. Además, a diferencia de este mismo reporte y del de Ruiz-Tachiquin, M. *et al.*, 2007, la mayoría de los pacientes para este trabajo de tesis fueron sintomáticos (91.4%) y muchos de ellos (65.7%) bajo tratamiento antiviral lo cual dejaría ver el genotipo viral que presentan individuos con signos clínicos de la infección por HBV y bajo presión selectiva por la administración de fármacos antivirales, particularmente interferón y lamivudina.

Mutaciones en el promotor core.

Respecto a la búsqueda de mutaciones comparando las secuencias determinadas en este estudio con secuencias prototipo de HBV, se encontró que la mayoría de las mutaciones identificadas no han sido reportadas en la literatura. Debe mencionarse que esta falta de reportes a la que se hace referencia, se debe fundamentalmente al hecho de que este genotipo H ha sido el

último en describirse (Arauz-Ruiz, P. *et al.*, 2002.). Por tanto, aunque diferentes grupos de investigación en el mundo ya se encuentren trabajando con este genotipo viral, en las mutaciones que podrían asociarse a este genotipo y a pesar de que ya se han incluido secuencias de genomas completos de aislados de HBV mexicanos en el GenBank, todavía existe muy poca información acerca de la biología de estas variantes circulantes en México. Por lo cual este trabajo forma parte de esos estudios preliminares en el entendimiento de las singularidades del genotipo H que circula en México.

La hipótesis de trabajo fue que se esperaba encontrar mutaciones en el promotor viral *core* en base a dos hechos bien estudiados en este virus: la alta tasa mutacional de HBV (Devesa, M. & Pujol, F. 2007; Carman, W. *et al.*, 1993; Brunetto, M. *et al.*, 1999; Karayiannis, P. *et al.*, 2005; Burda, M. *et al.*, 2001) y la fijación de mutaciones que eliminen la síntesis del antígeno *e* sin afectar la réplica viral (lo cual representa un mecanismo eficiente de evasión inmune y daño hepático considerable), esto es, mutaciones en el ORF Precore/Core (ORF C) o mutaciones en los sitios de inicio para la transcripción de los mRNA mensajeros del *core* y pregenómico. (Devesa, M. & Pujol, F. 2007, Carman, W. *et al.*, 1993; Brunetto, M. *et al.*, 1999, Karayiannis, P. *et al.*, 2005, Burda, M. *et al.*, 2001). Para este último, hay un reporte en donde se propuso que aquéllos genotipos con una citosina C en la posición 1858 del genoma de HBV (genotipos A, H, C₂ y F₃), la probabilidad de fijar mutaciones en el ORF Precore/Core que afecten la síntesis del antígeno *e* es baja pues esta C predispone a que la base complementaria durante la formación de la señal ϵ de encapsidación sea G (*versus* T1858, que de haber mutación se aparearía con A, lo que genera un codón de paro y con ello la eliminación de la proteína *e* (Chen, C. *et al.*, 2005). Por ello, se propone que al no haber este tipo de mutaciones en el ORF, su fijación en el promotor del *core* se verá favorecida. Con este antecedente, se esperaba encontrar mutaciones en el promotor del *core* de los pacientes de este trabajo en base a que la mayoría de las muestras pertenecieron al genotipo H.

Interesantemente, se observó que la posición esperada en el nucleótido 1858 para alguna de las secuencias prototipo de los genotipos H y F, no fue citosina, sino timina, lo que significaría que se encontrarían mutaciones en el ORF C *más* que en el promotor y con ello la poca probabilidad de hallar mutaciones en este CP que pudieran afectar la síntesis del antígeno *e* en las secuencias obtenidas en este trabajo Y ello fue consistente con los resultados de esta tesis, ya que no se identificaron mutaciones en el BCP del CP como se ha reportado, sino en el CURS. Por consiguiente se identificaron mutaciones en regiones donde no han sido reportadas previamente.

En este sentido, hay diferencias importantes entre las mutaciones ya reportadas en la literatura con las que se encontraron en estos 31 pacientes mexicanos. La más notable es que las mutaciones que se han reportado para el CP (aunque no en genotipos H y F) se ubican en el Promotor del Core Básico (BCP). Éste contiene los sitios de inicio para la transcripción de los mRNAs mensajeros (precore y pregenómico) así como en sitios de unión de reconocimiento para el Complejo de Inicio de la Transcripción Celular. En este estudio, la gran mayoría de las mutaciones identificadas, se encontraron en la región reguladora río arriba ó URS que a diferencia del BCP, se encarga de regular positiva o negativamente la función del BCP (Okamoto, H. *et al.*, 1994; Moriyama, K. 1997; Kidd-Ljunggren, K. *et al.*, 1997; Li, J. *et al.*, 1999; Chan, H. *et al.*, 1999; Baptista, M. *et al.*, 1999; Moolla, N. *et al.*, 2002; Chen, C. *et al.*, 2005; Kann, M. & Gerlich, 2005; Yokosuka, O. & Arai, M. 2006 & Baumert, T. *et al.*, 2007).

Por lo anterior, hipotéticamente se podría esperar que la síntesis del antígeno *e* no se verá afectada por las mutaciones encontradas en los 31 pacientes como tampoco la síntesis de la proteína Core (y con ello la carga viral), puesto que estos

cambios no actúan en los sitios de inicio que están en el BCP. No obstante, lo que sí podría asociarse con las mutaciones en el URS es la *sobreexpresión* o *subexpresión* de alguno de estos dos productos del ORF C.

Cabe mencionar que no se conoce bien cómo interaccionan los motivos funcionales del URS con moléculas celulares, es decir, cómo se regula esa tasa transcripcional en el CP. La falta de reportes en la literatura de esta región permite suponer que no se han hallado mutaciones en la misma, aunque no hay reportes que confirmen este argumento.

Relación entre las mutaciones encontradas y los pacientes.

Una vez que se identificaron las mutaciones en la secuencias de los pacientes, fue importante determinar si existía una relación estadísticamente significativa entre estas mutaciones y los marcadores de la infección, a fin de proponer posibles escenarios que expliquen mejor el curso clínico del paciente en un contexto geonómico debido a mutaciones en el CP (por ejemplo, cómo los cambios en el URS sobre o subexpresan alguno o ambos productos del ORF C) o bien encontrar alguna(s) mutación(es) que sean de utilidad para el tratamiento del paciente mexicano con HBV; es decir, proponer si la existencia de secuencias mutantes en el CP en el paciente influye en la respuesta a tratamiento antiviral.

En primera instancia, cuando se analizó la relación entre pacientes positivos o negativos para HBeAg, carga viral mayor o menor (log 5), niveles enzimáticos de ALT normales o elevados con la *presencia o no de mutaciones*, (independientemente de si las muestras tuvieran 1, 2 o más mutaciones), no se encontraron diferencias significativas con esta primera evaluación dicotómica *grasso modo* (ausencia/presencia).

Por lo tanto, fue necesaria la realización de un análisis más específico utilizando otros parámetros o variables particulares. Así, se encontró que la presencia 1, 2 ó más mutaciones incluso ninguna, no afecta la expresión del antígeno *e*, ni los niveles enzimáticos de ALT y AST. Con estos análisis, se concluye que las mutaciones encontradas en el URS no parecen tener asociación con la patogenicidad hepática indicada por los niveles de transaminasas ni con la expresión del antígeno *e*. Tal vez las posiciones de estos cambios no afectan los motivos funcionales el CP encargados de la síntesis de los mRNA del Precore y Core. Para comprobar esta suposición, es necesario la implementación de experimentos de mutagénesis sitio- dirigidas con estas mutaciones en particular.

Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en los niveles de carga viral entre las muestras que no exhibieron alguna mutación con aquéllas que tuvieron 2 o más mutaciones. Estas diferencias se observaron sólo entre muestras con más de una mutación, lo que deja ver el efecto acumulativo de mutaciones en el URS del promotor en la funcionalidad del CP: probablemente se estaría afectando la regulación del mismo por efecto sumatorio de las mutaciones y no sólo de una. En muestras con CV alta y con más de 1 mutación, se afectan varios sitios encargados de evitar una sobre-regulación positiva para la transcripción del mRNA pregenómico, fundamentalmente (sin verse afectado el mRNA del Precore o antígeno *e*). Por ejemplo, en las muestras con las mutaciones G1615 y G1684A podría existir un defecto en el NRE (1613-1620) y en el dominio γ del CURS A (1671-1786), ya que estos dos motivos regulan al BCP. En este caso, en donde se observa que las muestras presentan alta carga viral con estas mutaciones, la suposición es clara: estos cambios favorecen la sobreexpresión del mRNA pregenómico.

Ya se ha reportado el efecto acumulativo *in vitro* de la mutaciones en el CP que revelaron un incremento en la replicación del genoma viral y una reducción la expresión del HBeAg (Tong, S. *et al.*, 2005). No obstante, el resultado presentado en este trabajo sobre el efecto acumulativo para estas muestras es opuesto en cuanto a la síntesis del antígeno *e*, pues en este caso se

ve una réplica o carga viral mayor sin afectar al HBeAg. También, existe la posibilidad de que la sensibilidad en el método de detección de este antígeno (ELISA) no permita ver el efecto mutacional que podría estar ocurriendo en estos pacientes. Por tanto, no se excluye que éste antígeno puede también estar afectado por las mutaciones identificadas.

El análisis estadístico estableció la diferencia significativa entre la media de la carga viral de pacientes con la inserción G1615 (57% en 20/35 pacientes) y aquellos pacientes sin esta mutación; siendo la carga viral alta en muestras en donde tal mutación estuviese presente (en el grupo I, en 18 de los 24 casos, estuvo presente esta inserción G1615). Esta relación estadística podría explicarse a nivel genómico del siguiente modo:

Esta inserción se ubica en la secuencia mínima esencial de regulación del NRE (1613-1620) en el URS del promotor (Buckwold, V. *et al.*, 1992; Chien-Tzang, S. *et al.*, 2001). Una alteración de este elemento silenciador podría afectar la actividad supresora en el CP (Gerlach, K. & Schloemer, R. 1995). Si la función reguladora de BCP se ve afectada negativamente, se espera que haya una réplica viral incrementada en pacientes que mostraron este cambio, por extensión, fenotípicamente estas poblaciones virales exhibirán una réplica mayor.

Es importante mencionar que en la determinación de esta inserción se debe tomar en cuenta que su ubicación esta contenida en el iniciador sentido 1603 (Forward) el cual (como se detalló en los resultados) amplificó de modo no confiable este inicio del CP y aunque esto se resolvió secuenciando el final del fragmento, Antisentido 1942 (Reverse), será necesario demostrar que esta inserción es auténtica y que no se trata de un efecto generado por el oligonucleótido durante la reacción de amplificación. Para demostrar que esta inserción sea real se propone la construcción de un iniciador Sentido 50 nucleótidos río arriba con respecto al oligo 1603 utilizado en este trabajo, con la intención de obtener un fragmento viral de mayor longitud que contenga a este inicio del CP para asegurar su amplificación fidedigna y determinar con seguridad la existencia de esta inserción en las muestras de los pacientes estudiados.

Esta probable inserción tiene implicaciones notables, como se ha discutido ya, la asociación significativa con el aumento en la CV, así como la posible existencia de una delección río abajo (no detectada al menos en el CP, puede hallarse en el ORF C, por ejemplo) que contrarreste el posible cambio en el Marco de Lectura generado por la inserción.

Respecto a la mutación G1684A que también fue frecuente en este estudio (46 % ,16/35), no se encontró asociación significativa con algún parámetro clínico a pesar de su frecuencia en las muestras. En un inicio esto podría atribuirse al tamaño de la muestra, por lo cual quizás sea importante contar con una número de pacientes mayor en trabajos posteriores y discernir si en realidad este cambio es significativamente frecuente; no obstante, esta relación no significativa podría atribuirse en teoría, a que en efecto su ubicación no altera la función del CP: el cambio G1684A se encuentra en el dominio γ del CURS A (1668-1686) que actúa en sinergia con el resto de sus dominios α y β y se encarga de regular positivamente al BCP aunque débilmente con respecto al CURS B. Quizás por ello, los cambios en la región γ no afectan importantemente la funcionalidad del CP. Además el sitio de unión a Factores de Transcripción (HNF-3) en este CURS A no es el dominio γ sino el α (Costa, J. 2002).

Así también se encontró que el 87% (20/23) de los pacientes con tratamiento antiviral del Grupo I (los tres pacientes restantes, pertenecieron al grupo II), presentaron mutaciones asociadas a la carga viral alta. Este resultado tiene sentido ya

que el 80% (16/20) de estos pacientes, presentaron 2 o más mutaciones, lo que es consistente con el efecto acumulativo de cambios en la carga viral alta ($\log_{10} CV > 5$), discutido anteriormente.

Podría suponerse que las mutaciones en esta región están contribuyendo a la resistencia a fármacos como el interferón o la lamivudina que constituyen los medicamentos de primera elección para los derechohabientes del IMSS, quizá se trate de la presión de selección de los tratamientos están originando mayor número de mutaciones en el genoma viral, seleccionando poblaciones virales con ventaja replicativa (Heipertz, R. *et al.*, 2007).

Para la terapia con IFN, existen reportes sobre el efecto dominante de las mutaciones en la región del promotor en el incremento de la replicación viral o la encapsidación, obstaculizando la eliminación viral inducida por IFN (Erhardt, A. *et al.*, 2000), aunque el mecanismo de resistencia no está bien entendido. En el caso del tratamiento con Lamivudina, se sabe que la mayor limitación para el uso de este fármaco es la aparición de mutantes de resistencia y aunque ya se han reportado mutaciones en el dominio catalítico del motivo YMDD del ORF S (gen s) de HBV (Heipertz, R. *et al.*, 2007); así como la resistencia en aislados del genotipo H de México (Alvarado-Esquivel, C., *et al.*, 2006), no se sabe hasta ahora cómo las mutaciones en el promotor del *core* podrían participar en la resistencia a Lamivudina.

Además, la asociación notable entre las mutaciones halladas en este estudio con el tratamiento podría ser reflejo no sólo de estas mutaciones sino además de cambios en otras regiones del genoma de HBV, particularmente, en el ORF S. Aunque se sugiere por los datos arrojados en este estudio, que el aumento en la carga viral (atribuida a un efecto acumulativo de mutaciones) sólo puede asociarse con la respuesta fallida al tratamiento. Si bien las mutaciones en el CP no son las únicas responsables de este efecto, si podrían contribuir con él. Se deberán buscar mutaciones de resistencia en el ORF S de estos mismos pacientes y contar con más evidencia que sustente o descarte el argumento propuesto.

En el caso del grupo II de los pacientes (Portadores), por lo antes descrito, ninguna de las mutaciones encontradas en estos pacientes tuvo efecto significativo con los marcadores clínicos de este grupo: carga viral baja y antígeno *e* negativo. Tres de los pacientes de este grupo recibieron tratamiento antiviral; sin embargo, en estos individuos, la carga viral se mantuvo baja atribuido en parte al tratamiento administrado. Todo en conjunto es consistente: los pacientes con hepatitis crónica en fase de portadores no presentan evidencia de mutaciones que se asocien con la carga viral y los pacientes con tratamiento tampoco las exhibieron. La baja o nula réplica viral no es favorable para la fijación de mutaciones en el CP y en sí, en todo el genoma de HBV (Carman, W. *et al.*, 1993). Sin embargo, en este grupo se encuentra la muestra HBV-81 que presentó 7 mutaciones en el CP, no obstante, esta muestra fue clonada por lo que los cambios reportados no corresponden a una única secuencia.

Los cambios en cada una de las clonas de este paciente (HBV-81) por sí solos, no parecen tener efecto en las características fenotípicas dentro la población viral de este individuo, dada su clasificación como *Portador*. Sería interesante obtener las secuencias del CP a partir de clonación del resto de las 34 muestras para saber si existen variantes virales que estén coexistiendo con el hospedero. Ello permitiría comprender mejor el fenotipo viral en el paciente debido no sólo a una población viral homogénea genéticamente sino a más de una variante o quiasiespecie (Okamoto, H. *et al.*, 1994) y comprender mejor los patrones de la enfermedad en base a la heterogeneidad génica de las poblaciones virales (Brunetto, M. *et al.*, 1999). Su presencia puede escapar a la detección por PCR directo.

Por otro lado, la muestra HBV-155, que se encuentra en el grupo I de pacientes, fue la única en la que se identificó una inserción de 12 pares de bases además de 6 inversiones. Como se dijo antes, el hecho de que se tratara de un individuo con CV alta y HBeAg, la posibilidad de que se tratase un mutante convencional como los ya reportados fue alta; y en efecto, las posiciones de estas mutaciones afectan la síntesis de este antígeno. Particularmente, se han descrito inserciones en el BCP: en un paciente con exacerbación fulminante de hepatitis crónica, una inserción de 11 pares de bases se asoció a la aparición de un nuevo sitio de unión para HNF-1 y alta replicación viral. (Devesa, M. & Pujol, F). Por otro lado, las inversiones A1765T y G1767A afectan, en teoría, el sitio de unión a HNF-4 sitio 2 (1759-1770) y el efecto final podría ser semejante al reportado para las mutaciones A1762T y G1764A que afectan el mismo motivo en el CP con la consecuencia mencionada. No obstante, la baja frecuencia de este tipo de muestras no permite establecer asociaciones significativas con los cambios reportados en este trabajo. Al parecer, este tipo de mutaciones que generen el genotipo viral de esta muestra, es poco frecuente.

La muestra HBV 115 fue una muestra particular, primero por ser la única que perteneció al genotipo F y luego por presentar 7 cambios en su CP, además de que por marcadores clínicos se clasificó en el grupo de la Seroreversión. Devesa, M. & Pujol, F. 2007 han hecho referencia a un alto número de variaciones en el BCP para este genotipo. Por otra parte, parece ser que las mutaciones identificadas no afectan la función del CP: las inversiones C1631T, T1632C, G1634A y T1637C que aunque forman parte del NRE no lo son de la secuencia mínima esencial de este motivo con lo que no se vería afectado por estos cambios; la mutación T1673C cae en el sitio γ del CURS A mientras que los cambios C1766T y T1768A (ya reportados) se han detectado en pacientes con hepatitis fulminante, mientras que la mutación C1753 ha sido asociado con la progresión del daño hepático (Chen, C. *et al.*, 2005; Tong, S. *et al.*, 2005). Algunas de estas mutaciones se sobrelapan con la región del gen X de HBV, y se han propuesto como marcadores pronósticos para el desarrollo de cáncer de hígado (Devesa, M. & Pujol, F. 2007). A pesar de tantos cambios, no hay réplica viral alta (a diferencia de los propuesto anteriormente), por tanto, es difícil con sólo una muestra de este tipo, proponer algún escenario teórico que permita entender qué pasa en este paciente a nivel genómico. Sin embargo, es importante la identificación de muestras con este tipo de mutaciones, sobretodo si se tienen antecedentes sobre su relación con el paciente. Esta muestra fue un hallazgo interesante y valioso como antecedente para trabajos posteriores.

Finalmente, este trabajo representa un estudio importante en términos de conocimiento preliminar del genotipo predominante en la población mexicana con hepatitis B. Los datos arrojados podrían ser base de trabajos posteriores para dilucidar con claridad el papel real de las mutaciones identificadas. A corto plazo, realizando un estudio con un tamaño de muestras mayor, sobre todo con pacientes cuyas características sean las de los grupos II y III presentadas aquí para ver si lo hallado en este estudio se mantiene o cambia y en este caso, cómo y porqué cambia. Adicionalmente, podría hacerse un estudio longitudinal (a diferencia de este trabajo transversal) a largo plazo con tres puntos de observación: inicial, intermedio y final con la intención de ver los cambios mutacionales en el CP y otras regiones, fluctuaciones en CV y niveles de AST y ALT, serología (seroconversión y seroreversión), presión de selección de fármacos específicos, mutantes revertantes de HBV, mutantes emergentes, y lo más interesante, su papel en el curso clínico del paciente.

A largo plazo, se podrían estudiar otras regiones de HBV cuya función y efecto sea cooperativo con el CP, estudios *in silico* sobre las interacciones de los factores de transcripción hepáticos y los motivos mutados del CP (predecir si el cambio en la geometría molecular e interacciones electrostáticas en estos sitios de reconocimiento se ven afectados) y, montando ensayos *in vitro* de mutagénesis sitio-dirigida que experimentalmente dejen ver el fenotipo viral predicho en este trabajo.

Todo encaminado a comprender mejor la dinámica de la genética viral de HBV que a su vez forma parte de un conjunto mas amplio y complejo que es el paciente en donde no se debe olvidar, que el curso clínico no sólo es efecto de las mutaciones, sino que esta sujeto a su carga genética (background), el estado inmunológico y salud del paciente, infecciones *ab initio* con mutantes HBV, la zona de endemia para HBV, la edad y tiempo de infección, tratamiento, etc.

Por ende, la integración todos estos datos permitirían entender de un modo más integral y con un enfoque multifactorial, el curso y posible desenlace del paciente con hepatitis B.

8.2. Conclusiones.

Primero, se alcanzaron todos los objetivos planteados: se logró amplificar el fragmento viral del CP en las muestras de pacientes mexicanos con HBV; se logró determinar el genotipo viral; identificar mutaciones no reportadas previamente en la literatura, en donde a pesar del número considerable de muestras con cambios, ninguna de ellas por sí sola, parece tener efecto en los marcadores clínicos del paciente. En vez de ello, se encontró una asociación significativa del efecto acumulativo de las mutaciones con el aumento de la carga viral, hipotéticamente, favoreciéndola y con ella, la deficiencia en la respuesta al tratamiento con lamivudina o interferón. Así también, la presencia de una inserción que podría estar afectando el elemento silenciador en el CP, no obstante, es necesario la aplicación de otras técnicas de estudio que ratifiquen o refuten el escenario teórico propuesto.

Segundo, este trabajo permitió ver la gran variabilidad genética que existe en este virus a pesar de las constricciones en su genoma, entiendo su tasa mutacional como la fuente de esta variación y traducida en la generación de 8 genotipos discretos y con ellos, particularidades que pueden jugar un papel fundamental en la interacción del virus con el hospedero.

Finalmente, este sistema biológico representa un ejemplo notable, de que cómo la *tasa de replicación* es un factor importante no sólo en la evolución genética de una población viral; sino que aquélla, repercute importantemente en las poblaciones de su hospedero; siendo la selección positiva por parte éste, la mayor fuerza de cambio evolutivo dentro de una población viral de HBV.

Literatura Citada.

1. Lyle, W. Horn. 2005. *Hepatitis*. Chelsea House Publishers. Filadelfia. 128 p.p.
2. Abbas, Z., Muzaffar, R., Siddiqui, A., Naqvi, S. & Rizvi, S. 2006. *Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi*. BMC Gastroenterology. 6:20.
3. Baumert, T., Thimme, R. & Weisäcker, F. 2007. *Pathogenesis of hepatitis B virus infection*. Gastroenterology. 313(1): 82-90.
4. Abbas, A. & Litchman, A. 2004. *Inmunología Celular y Molecular*. 4° edición Mc Graw-Hill Interamericana. 577 pp.
5. White, D. & Frenner, F. 1994. *Medical Virology*. 4° edición. Academic Press, Inc. San Diego California.
6. Alvarado-Esquivel, C., Sablon, E., Conde-González, C., Juárez-Figueroa, L., Ruiz-Maya, S. 2006. *Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: Predominant circulation of hepatitis B virus genotype H*. World Journal of Gastroenterology. 12 (40): 6540-6545.
7. Chen, C., Lee C., Lu, S., Changchien, C., Eng, H., Huang, C., Wang, J., Hung, C. & Hu, T. 2005. *Clinical significance of Hepatitis B (HBV) genotypes and Precore and Core Promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan*. American Society for Microbiology. 43(12): 6000-6006.
8. Rivera-López, M., Zavala-Méndez, C. & Arenas-Esqueda, A. 2004. *Prevalencia de seropositividad para VIH, hepatitis B y C en donadores de sangre*. Gaceta Médica de México. 140(6): 657-660.
9. Cisneros-Castolo, M., Hernández-Ruiz, L., Ibarra-Robles, I., Fernández, I., Escobedo-de la Peña, J. 2001. *Prevalence of hepatitis B virus infection and related risk factors in a rural community of Mexico*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 65(6): 759-763.
10. Schaefer, S. 2007. *Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes*. World Journal of Gastroenterology. 13(1): 14-21.
11. Rehermann, R. & Nascimbeni, M. 2005. *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*. Nature Reviews Immunology. 5(3):215-229.
12. Gerlich, W. 1993. *Structure and molecular virology*. En Viral Hepatitis. Editores: Zuckerman, A. & Thomas, H. Churchill Livingstone. London. 83-113 p.p.
13. Carman, W., Howard, T., Zuckerman, A. & Harrison, T. 1993. *Molecular variants*. En Viral Hepatitis. Editores: Zuckerman, A. & Thomas, H. Churchill Livingstone. London. 115-124 p.p.
14. Decker, R. 1993. *Diagnosis*. En Viral Hepatitis. Editores: Zuckerman, A. & Thomas, H. Churchill Livingstone. London. 165-181 p.p.
15. Devesa, M. & Pujol, F. 2007. *Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America*. Virus Research. 127:177-181.
16. Brunetto, M., Aragon, U. & Bonino, F. 1999. *Hepatitis B virus mutants*. Intervirology. 42:69-80.
17. Valdespino, J., Conde-González, C., Olaiz-Fernández, G., Palma, O. & Sepúlveda, J. 2007. *Prevalencia en México de la infección y el estado portador de la hepatitis B en adultos*. Salud Pública de México. 49(3): 404-411.
18. Costa, J. 2002. *Variantes de la región del promotor básico del gen Precore-Core del virus de la hepatitis B. Relación con la región Precore y los genotipos virales*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de España. Barcelona, España. 14 -23 p.p.
19. Román, M., Vazquez, M. & Panduro, A. 2005. *La infección por VHB: un problema de salud a nivel mundial*. Investigación en Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. Marzo, 6:6-11.

20. Karayiannis, P., Carman, W. & Thomas, H. 2005. *Molecular variations in the core promoter, precore and core regions of hepatitis B virus, and their clinical significance*. En Viral Hepatitis. Thomas, H., Stanley, L & Zuckerman, A. 3° edición. Blackwell Publishing. Massachusetts. 242-250.
21. Kann, M. & Gerlich, W. 2005. *Structure and molecular virology*. En Viral Hepatitis. Thomas, H., Stanley, L & Zuckerman, A. 3° edición. Blackwell Publishing. Massachusetts.149-179.
22. Moolla, N., Kew, M. & Arbuthnot, P. 2002. *Regulatory elements of hepatitis B virus transcription*. Journal of Viral Hepatitis. 9:232-331.
23. Tong, S., Kim, K., Chante,C., Wands, J. & Li, J. 2005. *Hepatitis B virus antigen variants*. International Journal of Medical Sciences. 2(1) 2-7.
24. Jie, L, Buckwold, V., Hon, M. & Ou, J. 1999. *Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation*. Journal of virology. 73(2):1239–1244.
25. Chun, Y., Kim, J., Woo, H., Oh, S., Kang, I., Ha, J. & Kim, S. 2000. *No significant correlation exists between core promoter mutations, viral replication, and liver damage in chronic hepatitis B infection*. Hepatology. 32: 1154-1162.
26. Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Sugai, Y., Yoshida, M., Kosei, M., Tanaka, T., Miyakawa, Y. & Mayumil, M. 1994. *Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen*. Journal of Virology. 68 (12): 8102-8110.
27. Tsai, W., Lo, G., Hsu, P., Lai, K., Lin, C., Chan, H., Chen, W., Cheng, J., Liu, Y., Huang, T., Ger, L. & Lin, H. 2008. *Role of genotype and precore/basal core promoter mutations of hepatitis B virus patients with chronic hepatitis B with acute exacerbation*. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 43:196-201.
28. Burda, M., Günter, S., Dandri, M. Will, H. & Petersen, J. 2001. *Structural and functional heterogeneity of naturally occurring hepatitis B virus variants*. Antiviral Research. 52: 125-138.
29. Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. & Magnius, L. *Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America*. 2002. Journal of General Virology. 83: 2059–2073.
30. Alvarado-Esquivel, C., Carrera-Gracia, M., Conde-González, C., Ruiz-Maya, L., Aguilar-Benavides, A., Torres-Valenzuela, A. & Sablon, E. 2006. *Genotypic resistance to lamivudine among hepatitis B virus isolates in Mexico*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 57: 221-223.
31. Yokosuka, O. & Arai, M. 2006. *Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B*. Medicine Molecular Morphology. 39: 115-120.
32. Günther, S., Piwon, N., Iwanska, A., Schilling, R., Meisel, H. & Will, H. 1996. *Type, prevalence, and significance of Core Promoter/Enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease*. Journal of Virology. 70(12):8318-8331.
33. Erhardt, A., Reineke, U., Blondin, D., Gerlich, W., Adams, O., Heintges, T., Niederau, C. & Haussinger, D. 2000. *Mutations of the Core Promoter and response to Interferon treatment in chronic replicative hepatitis B*. Hepatology. 31: 716-725.
34. Seeger, C. & Mason, W. 2000. *Hepatitis B Virus Biology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64(1): 51-68.
35. Chan, H., Hussain, M. & Lok, A. 1999. *Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the Core Promoter and Precore regions during hepatitis B e Antigen seroconversion*. Hepatology. 29: 976-948.
36. Glebe, D. 2007. *Recent advances in hepatitis B virus research: A german point of view*. World Journal of Gastroenterology. 13(1): 8-13.

37. Kidd-Ljunggren, K., Öberg, M. & Kidd, A. 1997. *Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status and disease.* Journal of General Virology. 78: 1469-1478.
38. Pult, I., Chouard, T., Wieland, S., Klemenz, R., Yaniv, M. & Blum, H. 1997. *A Hepatitis B virus mutant with a new Hepatocyte Nuclear Factor Binding site emerging in transplant-transmitted fulminant Hepatitis B.* Hepatology. 25: 1507-1515.
39. Baptista, M., Kramvis, A. & Kew, C. 1999. *High prevalence of 1762^T 1764^A mutations in the Basic Core Promoter of Hepatitis B virus Isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers.* Hepatology. 29: 946-953.
40. Sánchez, L., Maldonado, M., Bastidas-Ramírez, B., Norder, H. & Panduro, A. 2002. *Genotypes and S Gene Variability of Mexican Hepatitis B Virus Strains.* Journal of Medical Virology 68: 24–32.
41. Moriyama, K. 1997. *Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter.* Journal of General Virology. 78: 1479–1486.
42. Kreutz, C. 2002. *Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses.* Journal of Medicine Molecular and Cellular. 6(1):113-43.
43. Traducción del folleto *Liver Function Tests* de la American Liver Foundation, 1997.
44. Buckwold V., Chen, M. & Ou, J. 1992. *Interaction of transcription factors RFX1 and MIBP1 with the gamma motif of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter.* Virology. 189(1):59-66.
45. Chen, M. & Ou, J. 1997. *Cell type-dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter.* Virology. 227(2):515-518.
46. Kidd-Ljunggren, K., Oberg, M. & Kidd, A. 1997. *Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status disease.* Journal of General Virology. (78):1769-1478.
47. Günther, S., Pivon, N., Twanska, A., Schilling, R., Meisel, H. & Will, H. 1996. *Type, prevalence, and significance of Core promoter/Enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease.* Journal of Virology. 8318-8331.
48. Rozanov, M., Plikat, U., Chappey, C., Kochergin, A. & Tatusova, T. 2004. *A web-based genotyping resource for viral sequences.* Nucleic Acids Research. 32: W654-W659.
49. Ruiz-Tachiquin, M., Valdez-Salazar, H., Juárez-Barreto, V., Dehesa-Violante, M., Torres, J., Muñoz-Hernández, O. & Álvarez-Muñoz, M. 2007. *Molecular analysis of hepatitis B virus "a" determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers.* Virology Journal. 4:1-6.
50. Chien-Tzang, S., Wir-Yo, L., In-Hsun, W., Yu-Hsun, L., Shen-Ru, S., Chao-Kuen, L. & Ling-P., T. 2001. *Transcription repression of human hepatitis B virus genes by Negative Regulatory Element-binding protein/SON.* The Journal of Biological Chemistry, 246(26): 24059-24067.
51. Heipertz, R., Miller, T., Kelley, C., Delaney, W., Locarnini, S. & Isom., H. 2007. *In vitro study of the effects of Precore and Lamivudine-Resistant mutations on hepatitis B virus replication.* Journal of Virology. 81(7): 3068-3076.
52. Valsamakis, A. 2007. *Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B.* Clinical Microbiology Reviews. 20 (3): 426-439.
53. Daniel, W. 2006. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.* Limusa Wiley. México, D.F. 755 p.p.
54. Alvarez-Muñoz T, Bustamante-Calvillo E, Martínez-García C, Moreno-Altamirando L, Guiscafrec-Gallardo H, Guiscafrec JP, Muñoz O. 1989. *Seroepidemiology of the hepatitis B and delta in the southeast of Chiapas, Mexico.* Archivos de Investigación Médica en México. 20(2): 198-195.

Sitios webs, utilizados como herramientas para el análisis de las secuencias y mutaciones.

Convertidor de secuencias FASTA:

<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/>

Genotyping tool del NCBI National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>

BLAST nucleotídico del NCBI

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Multalin

<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

Chromas Lite Versión 2.01

<http://technelysium.com.au/>

APÉNDICE I.

Resultados de los 42 pacientes con HBV.

i. Carta de Consentimiento Informado



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

UTILIDAD DEL EMPLEO DE MUESTRAS DE SANGRE SECA FIJADA EN PAPEL FILTRO (DBS), PARA DETERMINAR CARGA VIRAL, IDENTIFICAR GENOTIPOS Y MUTACIONES EN LA REGIÓN CORE Y PRECORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

De la institución: Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS
Dirección: Investigador principal: QBP. María Teresa Álvarez y Muñoz
Dirección Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México D. F.
Teléfono 56 27 69 00 Extensión 22407

La hepatitis B es una infección causada por un virus, cuya consecuencia principal es la de producir una enfermedad crónica, con deterioro paulatino de la función del hígado. Dicha condición se desarrolla exclusivamente en el 10% de los sujetos infectados, sin embargo pueden presentarse ciertas complicaciones como cirrosis y cáncer de hígado.

En el paciente con infección por VHB, estudios recientes señalan como factores importantes en el desarrollo de cirrosis y resistencia a antivirales, al genotipo y a la presencia de mutaciones en regiones del genoma viral.

El objetivo de este trabajo es analizar en individuos con hepatitis B crónica activa y en portadores asintomáticos, la cantidad de DNA del VHB (carga viral), identificar genotipos y mutaciones presentes en la región core y precore del genoma del VHB, a partir de una mínima cantidad de sangre seca fijada en papel filtro (DBS).

Participación: Se solicita la participación en el estudio anteriormente descrito con el objeto de conocer y actualizar el estado que guarda el funcionamiento hepático del sujeto objeto de este estudio.

Para lograr lo anterior se contará con:

- A- El consentimiento informado previamente leído y firmado
- B- Se llenará un formato con los antecedentes clínico-epidemiológicos del caso incluido en el estudio
- C- Para realizar los estudios necesarios se obtendrán las siguientes muestras del paciente:
 - a) 5 ml de sangre venosa tomada sin anticoagulante.
 - b) 5 ml de sangre venosa tomada con anticoagulante, EDTA.
 - c) 50 µl de sangre venosa tomada por punción del dedo pulgar y colocados en papel filtro.

Se hace del conocimiento del interesado que:

- Los procedimientos a que será sometido cada sujeto no implican ningún riesgo físico y que sí aportarán el beneficio del conocimiento que guarda su estado de salud.
- Durante el desarrollo de este estudio se informará periódicamente al participante (caso sujeto de análisis) de los resultados obtenidos en cada etapa, los cuales serán explicados ampliamente, resolviendo cualquier duda existente.
- Los resultados de esta investigación no se darán a ninguna persona que no sea directamente interesada.
 - No existirá ningún tipo de compensación económica por la participación en este proyecto.
 - Que existe la libertad de retirar el consentimiento para continuar participando en el estudio, sin afectar mi atención médica futura.

CONSENTIMIENTO.

Consiento en participar en este estudio, del cual conozco los beneficios que aportará al mejoramiento de mi salud.

NOMBRE Y FIRMA.....

Testigo (Nombre y firma).....

Fecha..... Firma del investigador.....

COORDINACION DE INVESTIGACION EN SALUD
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS
(UDMEIyP). Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional siglo XXI

**UTILIDAD DEL EMPLEO DE MUESTRAS DE SANGRE SECA FIJADAS EN PAPEL FILTRO
(DBSs) PARA DETERMINAR CARGA VIRAL, IDENTIFICAR GENOTIPOS Y MUTACIONES EN LA
REGION CORE Y PRECORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.**

No. Caso: HBV-___

No. de afiliación al IMSS: _____

Nombre _____ edad _____ Sexo: M F

Fecha de Nacimiento : Día Mes Año

Dirección _____ Teléfono _____

Calle y No. Colonia CP

Ocupación _____

Fecha de la toma de muestra Día Mes Año

DATOS CLÍNICOS.

¿Ha recibido transfusiones sanguíneas? Sí No

Fecha de la última transfusión: _____

¿Utiliza drogas por vía endovenosa? ¿Cuáles? _____

¿Ha estado sujeto a tratamiento por acupuntura? Sí No

Fecha del diagnóstico de hepatitis tipo B _____

Recibe tratamiento _____ qué tipo de tratamiento _____

Tiempo de recibir tratamiento antiviral _____

Ha recibido vacunación para HBV Sí No

Tipo de vacuna _____ Fecha _____ No. de dosis _____

RESULTADOS SEROLOGICOS

HbsAg _____ Anti-HbsAg _____ Anti HbcAg _____

HbeAg _____ Anti-HbeAg _____ Anti-de Hta _____

ALT AST

Bilirrubina directa _____ Bilirrubinas totales _____

RESULTADOS DE PRUEBAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

- Presencia de DNA del HBV _____
- Evaluación de carga viral _____
- Identificación de genotipos _____
- Identificación de mutaciones en la región core y precore _____

Observaciones: _____

APÉNDICE I

ii. Procedencia, edad y sexo de cada paciente.

No.	Clave HBV	Procedencia	Edad	Sexo
1	06	Especialidades	52	M
2	48	Banco de Sangre Central	52	M
3	57	Banco de Sangre Central	53	M
4	62	Banco de Sangre Central	47	M
5	72	Centro Médico la Raza	16	M
6	76	Centro Médico la Raza	46	M
7	79	Centro Médico la Raza	25	F
8	81	Banco de Sangre Central	38	M
9	82	Centro Médico la Raza	21	M
10	85	Centro Médico la Raza	22	M
11	86	Banco de Sangre Central	29	M
12	87	Centro Médico la Raza	31	F
13	89	Centro Médico la Raza	43	M
14	91	Centro Médico la Raza	36	M
15	92	Centro Médico la Raza	37	M
16	96	Centro Médico la Raza	64	M
17	98	Centro Médico la Raza	54	M
18	100	Especialidades	55	M
19	101	Especialidades	19	M
20	104	Centro Médico la Raza	21	F
21	112	Centro Médico la Raza	39	M
22	115	Centro Médico la Raza	20	M
23	117	Centro Médico la Raza	38	M
24	119	Centro Médico la Raza	39	F
25	120	Centro Médico la Raza	31	M
26	121	Centro Médico la Raza	52	M
27	123	Centro Médico la Raza	23	F
28	125	Centro Médico la Raza	37 ^a	M
29	130	Centro Médico la Raza	38	M
30	133	Centro Médico la Raza	43	M
31	134	Centro Médico la Raza	46	M
32	135	Centro Médico la Raza	18	F
33	136	Centro Médico la Raza	17	M
34	139	Centro Médico la Raza	44	M
35	140	Centro Médico la Raza	41	F
36	141	Centro Médico la Raza	50	M
37	142	Centro Médico la Raza	34	F
38	143	Centro Médico la Raza	38	M
39	146	Centro Médico la Raza	45	M
40	151	Centro Médico la Raza	25	F
41	155	Centro Médico la Raza	56	M

*No aparece el paciente HBV156, cuya procedencia es de Centro Médico la Raza, tiene 16 años y es sexo femenino.

APÉNDICE I

iii..Resultados de Carga Viral de cada paciente

*No aparece el paciente HBV156, cuya CV es 37,400,000 copias/mL; log 7.6.

No.	Clave HBV	Carga Viral (copias/mL)	Logaritmo base 10
1	06	2 000 000	6.3
2	48	1 280	3.1
3	57	2 090	3.3
4	62	4 400	3.6
5	72	3 260 000	6.5
6	76	5 250, 000	6.7
7	79	6 080	3.8
8	81	84 300	4.9
9	82	1 260 000	6.1
10	85	143 000	5.2
11	86	54 500	4.7
12	87	3 190 000	6.5
13	89	478 000	5.7
14	91	8 400 000	6.9
15	92	2 460 000	6.4
16	96	79 900	4.9
17	98	76 100	4.9
18	100	55 900	4.7
19	101	52 400	4.7
20	104	17 400 00	7.2
21	112	1 290 000	6.1
22	115	80 600	4.9
23	117	1 880 000	6.3
24	119	5 260	3.7
25	120	1 280 000	6.1
26	121	11 800	4.1
27	123	3 130 000	6.5
28	125	4 970 000	6.7
29	130	12 500 000	7.1
30	133	1 270 000	6.1
31	134	7 950	3.9
32	135	2 690 000	6.4
33	136	ND	ND
34	139	58	1.8
35	140	30	1.5
36	141	ND	ND
37	142	68 000 000	7.8
38	143	60 750 000	7.8
39	146	2 520 000	6.4
40	151	130 000	5.1
41	155	224 000	5.4

APÉNDICE I

iv. Resultados Serología.

No	Clave HBV:	HBsAg	HBeAg	Anti-HBeAg	Core (IgG)	AUSAB
1	06	+	+	-	+	-
2	48	+	-	+	+	-
3	57	+	-	+	+	-
4	62	+	+	-	+	-
5	72	+	+	-	-	-
6	76	+	+	-	+	-
7	79	+	+	-	+	-
8	81	+	-	+	+	-
9	82	+	+	-	+	-
10	85	+	+	-	+	-
11	86	+	-	+	+	-
12	87	+	+	-	+	-
13	89	+	+	-	-	-
14	91	+	+	-	+	-
15	92	+	+	-	-	-
16	96	+	+	-	+	-
17	98	+	-	+	+	-
18	100	+	-	+	+	-
19	101	+	+	-	+	-
20	104	+	+	-	+	-
21	112	+	+	-	+	-
22	115	+	+	-	+	-
23	117	+	+	-	+	-
24	119	+	-	+	+	-
25	120	+	+	-	+	-
26	121	+	-	+	+	-
27	123	+	+	-	+	-
28	125	+	+	-	+	-
29	130	+	+	-	+	-
30	133	+	+	-	+	-
31	134	+	+	-	+	-
32	135	+	+	-	+	-
33	136	+	-	+	+	-
34	139	+	-	+	+	-
35	140	+	-	+	+	-
36	141	+	-	+	+	-
37	142	+	+	-	+	-

38	143	+	+	-	+	-
39	146	+	+	-	+	-
40	151	+	+	-	+	-
41	155	+	-	+	+	-
42	156	+	+	-	+	-

APÉNDICE I

v. Resultados Pruebas de Funcionamiento Hepático.

No.	ALT	AST	Bilirrubinas	Bilirrubinas
	(30-65 U/L)	(15-37 U/L)	directa (0-0.30 mg/dL)	Totales (0-1.0mg/dL)
1	50	45	0.1	0.53
2	58	25	0.14	0.52
3	47	25	0.15	0.69
4	41	16	0.14	0.56
5	83	46	0.17	1.36
6	101	65	0.26	0.76
7	70	31	0.11	0.53
8	105	46	0.1	0.7
9	63	26	0.18	0.97
10	44	30	0.11	0.62
11	57	23	0.11	0.7
12	86	32	0.1	0.41
13	116	75	0.08	0.32
14	72	40	0.16	0.73
15	89	52	0.14	0.76
16	360	606	0.29	0.94
17	177	134	0.19	0.86
18	90	40	0.1	0.72
19	43	29	0.13	1.16
20	53	33	0.09	0.47
21	58	60	0.16	0.62
22	68	34	0.12	0.74
23	233	210	0.08	0.51
24	35	23	0.06	0.45
25	181	127	0.15	0.62
26	58	31	0.08	0.64
27	53	36	0.08	0.51
28	53	23	6	0.52
29	141	54	0.11	0.9
30	48	77	0.07	0.29
31	171	98	0.09	0.33
32	38	27	0.08	0.28
33	37	15	0.06	0.49
34	40	33	0.16	1.21
35	180	157	0.06	0.21
36	61	35	0.05	0.44

37	41	34	0.08	0.26
38	96	51	0.09	0.6
39	59	38	0.11	0.28
40	62	30	0.05	0.32
41	79	93	0.32	0.36
42	46	64	0.07	0.32

APÉNDICE II

Determinación de Carga Viral por COBAS Amplicor MONITOR™ ROCHE

Para la determinación de la carga viral, las muestras de plasma se descongelaron y se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos. Mientras tanto se prepararon tubos Sartstedt de 1.5 mL estériles por cada muestra con 50 µL de la solución HMB LYS 1 (Kit de extracción COBAS Amplicor, ROCHE). Se incluyó un control negativo, un positivo alto y un positivo bajo. Posteriormente se añadieron 100 µL de Plasma Normal Humano (NHP) a los tres tubos controles y 100 µL de muestra de plasma del paciente, (ya descongelado y homogeneizado con vórtex) a cada tubo correspondiente. Luego, todos los tubos se centrifugaron a 12 670 x g durante 5 minutos a 25 °C. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 100 µL de Buffer QS-Lisis 2® (Kit de extracción COBAS Amplicor, ROCHE), se homogeneizó con vórtex hasta deshacer la pastilla del tubo. Se incubó durante 1 hora a 60°C ± 2°C.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 100 µL del Buffer de Lisis 3® a cada tubo de muestra (Kit de extracción COBAS Amplicor, ROCHE), se homogeneizó con vórtex por 5-10 segundos y se incubó a 100° C durante 10 minutos. Se centrifugaron a máxima velocidad (12 500 –16 000 x g) durante 15 minutos a TA para colectar todas las partículas insolubles. De esta preparación final se tomaron 50 µL, así como de los controles y se cargaron en cada uno de los tubos del anillo A-ring™ (Kit de extracción COBAS Amplicor, ROCHE) los cuales se prepararon previamente con 50 µL de la mezcla Master Mix (Adición de 100 µL de solución HBM Mg²⁺ a un vial de la mezcla Maestra HBM MMX. Listo el anillo, se colocó en el equipo COBAS Amplicor y se corrió con una duración total de 8 horas.

Se verificó que todas las determinaciones de carga viral mostrarán los valores de absorbancia del QS® mínimos que validarán una corrida de muestras adecuada (valores entre 3 y 4 indican un ensayo óptimo y confiable), del lo contrario se procedió a repetir la determinación de carga viral para esas muestras.

APÉNDICE III

Pacientes y Mutaciones

i. Datos de los pacientes considerados para la clasificación en los 3 grupos de pacientes.

Clave Pacientes HBV ²	Anti Core IgG/IAM	HBe Ag/anti-HBe	Carga viral > ó < 10 ³ copias/mL (=log ₁₀ 5)	CV Log ₁₀	Clasificación pacientes crónicos:
06	+/-	+/-	>	6.3	Activos
72	-/-	+/-	>	6.5	
76	+/+	+/-	>	6.7	
	+/-	+/-			
82			>	6.1	
85	+/-	+/-	>	5.2	
87	+/+	+/-	>	6.5	
89	-/-	+/-	>	5.7	
91	+/-	+/-	>	6.9	
92	-/-	+/-	>	6.4	
104	+/-	+/-	>	7.2	
112	+/-	+/-	>	6.1	
117	+/+	+/-	>	6.3	
120	+/-	+/-	>	6.1	
123	+/-	+/-	>	6.5	
125	+/-	+/-	>	6.7	
130	+/-	+/-	>	7.1	
133	+/-	+/-	>	6.1	
135	+/-	+/-	>	6.4	
142	+/-	+/-	>	7.8	
143	+/-	+/-	>	7.8	
156	+/-	+/-	>	7.5	
146	+/-	+/-	>	6.4	
151	+/-	+/-	>	5.1	
155	+/-	-/+	>	5.4	Mutante/Activo
100	+/-	-/+	<	4.7	Portadores
119	+/-	-/+	<	3.7	
121	+/-	-/+	<	4.1	
81	+/-	-/+	<	4.9	
98	+/-	-/+	<	4.9	
86	+/-	-/+	<	4.7	
96	+/-	+/-	<	4.9	Serorevertantes
79	+/-	+/-	<	3.8	
62	+/-	+/-	<	3.6	
101	+/-	+/-	<	4.7	
	+/-	+/-			
115			<	4.9	

APÉNDICE III.

ii. *Pacientes, tratamiento y número de mutaciones halladas.*

Clave Pacientes HBV [±]	Tratamiento Antiviral	Carga viral > ó < 10 ⁵ copias/ml (=log ₁₀ 0.5)	CV Log ₁₀	No. de mutaciones
06	S	>	6.3	2
62	N	<	3.6	2
72	S	>	6.5	2
76	N	>	6.7	1
79	S	<	3.8	0
81	N	<	4.9	7
	S			2
82		>	6.1	
85	S	>	5.2	2
86	N	<	4.7	0
87	N	>	6.5	2
89	S	>	5.7	0
91	S	>	6.9	2
92	S	>	6.4	1
96	S	<	4.9	0
98	S	<	4.9	2
100	S	<	4.7	2
101	S	<	4.7	2
104	N	>	7.2	2
112	S	>	6.1	2
115	N	<	4.9	7
117	S	>	6.3	2
119	S	<	3.7	1
120	N	>	6.1	3
121	N	<	4.1	1
123	S	>	6.5	2
125	S	>	6.7	2
130	N	>	7.1	2
133	N	>	6.1	2
135	S	>	6.4	2
142	N	>	7.8	2
143	S	>	7.8	5
146	S	>	6.4	1
151	S	>	5.1	1
155	S	>	5.4	6
156	S	>	7.5	2

S, Si tratamiento, N, No tratamiento 6i, 6 mutaciones y una inserción de 12 pb.