

11227
④

H.R.I.Z ISSSTE


Dr. ALEJANDRO VAZQUEZ LOPEZ

COORDINACION DE CAPACITACION
INVESTIGACION Y DESARROLLO.

Dra. MARIA DE LOURDES ROMERO.
JEFE DE ENSEÑANZA


Dr. RENE GARCIA SANCHEZ
ASESOR DE TESIS


Dr. ALBERTO TREJO GONZALEZ
PROFESOR TITULAR DE MEDICINA INTERNA


Dr. GABINO PELAEZ VILLALPANDO
JEFE DE SERVICIO DE MEDICINA INTERNA.

MEDICO RESPONSABLE: MARIA GUADALUPE ANGELES MORALES

112273



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**EVALUACION DE LA HEPATITIS C
MEDIANTE BIOQUIMICA, PCR,
GAMMAGRAFIA Y BIOPSIA
HEPATICA**

MARIA GUADALUPE ANGELES MORALES

ASESOR: Dr. RENE GARCIA SANCHEZ

MEDICINA INTERNA

H.R.I.Z ISSSTE

EVALUCION DE LA HEPATITIS C MEDIANTE BIOQUÍMICA, PCR, GAMAGRAFIA Y BIOPSIA HEPATICA

RESUMEN

La prevalencia de la hepatitis C oscila entre el 0.4 y el 16%. Se considera que uno de cada 200 latinos que habitan el Estados Unidos están infectados por el virus de la hepatitis C. Por lo menos tres cuartas partes de estos pacientes evolucionan a la cronicidad, cursando de manera asintomática hecho que complica su diagnóstico temprano.

Debido a su tasa de replicación baja el diagnóstico se confía en las pruebas serológicas indirectas de anticuerpos para HVC (virus de la hepatitis C) o ensayos directos sensibles que incluyen a la transcriptasa reversa y - PCR-RT - y amplificación de la cadena del DNA.

El objetivo del estudio es determinar el método menos invasivo con similar o mejor sensibilidad y especificidad más simple y menos costoso para evaluación diagnóstica y pronostica del paciente con hepatitis C crónica.

En este estudio se captaron 51 pacientes de ambos sexos mayores de 15 años con hepatitis C crónica o anticuerpos anti-HVC positivos, determinándoseles niveles de ALT, PCR y realizándoseles Gammagrafía hepática con toma en diferentes proyecciones y de acuerdo con autorización del paciente la realización de biopsia hepática.

Análisis estadístico: se realizo en base al programa Epi infor 6.04 y por el prueba de ji cuadrada.

Los resultados obtenidos fueron que el 51% de estos pacientes tuvo niveles normales de aminotransferasas. La técnica de PCR y Gammagrafía tuvieron la misma significancia estadística y en cuanto a la biopsia hepática no fué posible un análisis completo ya que se necesita mayor número de muestras.

Summary:

The prevalence of the Hepatitis C oscillates between 0.4% and 16% it is that one of each 200 latin that in States United be infected by the virus of the Hepatitis C. at least ¾ parts the these patients evolved to be chronic to study of way asymptomatic that complicates their early diagnosis.

Due to their rate of reproduced decrease the diagnosis is confident to the tests serologicals indirect of antibody for HVC (Virus of the Hepatitis C) or direct test sensibility that include the transcriptase reverse and PCR-RT and amplification of the chain of the DNA.

The objective of the study is to determine, what is the method less invasive with similar or better sensibility and specific, easy and less costly for the diagnosis evaluation prognosis of the patients with chronic Hepatitis C.

In this study get 51 patients of both sexes only high of 15 year-old with chronic Hepatitis C or antibody, anti-HVC made levels of ALT, PCR and Hepatic gammagrafic took different projections and with authorization of the patients for make the Hepatic biopsy.

Statistic analysis: it is made in base to the program Epi-Info 6.04 and by the test of ji square.

The results was that 51% these patients had normal level of aminotransferasas. The technique PCR and gammagrafy having the same statistic mean and with regard to the Hepatic biopsy was not possibility a full analysis because it needed greater number of samples.

INTRODUCCION

El virus de la hepatitis C (HVC) fue descubierto en 1989 y ha sido reconocido como el agente responsable de la mayoría de los casos de hepatitis no A no B.

La hepatitis C es una infección común con una prevalencia mundial que oscila entre el 0.4 y 16%, de acuerdo a diferentes reportes. Una de las características más importantes es la frecuencia con la cual progresa a una enfermedad crónica.

En algunos países desarrollados la hepatitis C crónica constituye la causa más importante de cirrosis. Por lo menos las tres cuartas partes de los pacientes infectados, evolucionan a la cronicidad. La mayor parte de los casos de hepatitis C aguda cursa de manera asintomática, hecho que complica su diagnóstico temprano. La progresión de la infección a menudo es insidiosa y subclínica cursando con sintomatología que es pasada por alto.

El virus se transmite por productos sanguíneos, o la prevalencia de la infección es alta en pacientes que reciben transplante de órganos, transfusiones sanguíneas o factores de la coagulación comercial, en pacientes con exposición percutánea a través del abuso de drogas intravenosas y en pacientes en diálisis renal, así como también en exposición materno fetal.

Considerando las características particulares del virus éste contiene una cadena RNA con aproximadamente 9400 nucleotides (nt). Esta secuencia contiene una tira única que abarca el genoma completo y puede codificar un gran polipéptido viral de 3011 a 3010 aminoácidos.

Análisis secuencial comparativo completo y parcial del HVC indican que este puede ser ampliamente subdividido en al menos tres grupos; básicamente debe hacerse énfasis que sólo la secuencia parcial es disponible para el virus en el grupo III y que uno o más de estos pueden separarse en diferentes grupos. La hipervariación y heterogeneidad observadas en el aislamiento de HVC son de aspectos clínicos importantes.

La secuencia de aminoácidos, la homología de un polipéptido del HVC con un nucleótido trifosfato son similares sólo en los casos del HVC flavivirus y pestivirus humanos indicando que estos tres virus son similares genéticamente.

Debido a su tasa de replicación baja el diagnóstico de la infección se confía en las pruebas serológicas indirectas de anticuerpos para HVC o ensayos directos sensibles que incluyen a la transcriptasa reversa y - PCR-RT - y amplificación de la cadena del DNA. Recientemente in situ transcriptasa reversa - PCR-IS-RT - ha sido útilmente aplicada para la detección y localización del RNA HVC en muestras hepáticas montadas en parafina y fijadas en formalina. La caracterización molecular y clonación del HVC rápidamente lleva a la producción de una gran cantidad de proteínas virales de organismos recombinantes. Cuando se purifican los polipéptidos recombinantes pueden ser usados para producir ensayos sensibles para reactividad de anticuerpos, indicando exposición del individuo a HVC. El primero de tales ensayos incorporando el polipéptido C-100-3 expresado en levaduras. Los anticuerpos a esta proteína se desarrollaron en casi todos los pacientes pos transfusión de hepatitis no A no B esto está particularmente asociado con infecciones crónicas y es un buen marcador de la presencia de la infección viral. Usando un derivado proteico viral adicional para detectar otros anticuerpos, hay más sensibilidad en los ensayos para anti HVC que pueden producirse así como reducir el tiempo de retraso en detectar la seroconversión.

La detección del RNA HVC ayuda al diagnóstico de la infección. La aplicación de la técnica de PCR para la amplificación de la transcriptasa reversa, es un ensayo muy sensible para el RNA viral circulante en el flujo sanguíneo y en los especímenes de biopsia.

Los datos obtenidos por PCR indican que la viremia puede ser detectada en pocos días de la exposición al virus, algunas semanas antes de la elevación de ALT y de los niveles de anticuerpos virales. El PCR mejora la información disponible concerniente al estado viremico cuando anti HVC están presentes pero la función hepática es normal. La técnica con PCR es un instrumento valioso para los niveles viremicos en pacientes que responden a la terapia con interferón, permitiéndole al clínico medir éste estado viremico (lo cual ocurre frecuentemente en ausencia de ALT) directamente.

En suma el ensayo con PCR puede ser usado para el diagnóstico de hepatitis crónica, en pacientes quienes pueden ser seronegativos; también el PCR tiene la capacidad de detectar la transmisión vertical de HVC en madres con infecciones crónicas. Es interesante hacer notar que algunos de estos bebés infectados muestran evidencia de viremia persistente en ausencia de seroconversión.

*Evaluación de la H.C
mediante BX, PCR, GGPE y
Biopsia Hepática.
Dra. Angeles*

La biopsia hepática permanece como la mejor arma diagnóstica para determinar el pronóstico y evolución de los pacientes con hepatitis C crónica. La biopsia ha asumido menos importancia como método diagnóstico en general, gracias a la disponibilidad de pruebas de laboratorio más rápidas. Sin embargo no hay sustituto para la biopsia hepática en la determinación del grado de lesión hepática y pronóstico así como también nos da información del tratamiento con interferón.

MATERIAL Y METODOS

Se captaron a 51 pacientes de ambos sexos mayores de 15 años del HRIZ, quienes contaban con anticuerpos anti HVC positivos o con historia de hepatitis C crónica. Se incluyeron a pacientes con tiempos de coagulación dentro de límites normales y con plaquetas mayores de 100 000/mm³. A estos pacientes se les determino niveles de ALT (por medio de DAKUS COUNTER), así como la realización de RT-PCR método que incluyó:

- *Extracción de ácidos nucleicos:* a muestras de 100 µl de suero en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml., se añadió tiocinato de guanidino a una concentración de 4M y cinco minutos después 100 µl de una mezcla de defenol, cloroformo, alcohol isoamilico. La mezcla de centrífugo y el sobrenadante se traslado a un tubo conteniendo 10 µl de acetato de sodio 3M (en agua tratada con DPEC) y 300 µl de etanol absoluto; se congelo a -70° C. y se centrífugo nuevamente por 15 min. y el sobrenadante se decantó y se enjuago con etanol al 70% secándose al vacío en un DNA Centrivap (Labconco).
- *Retrotranscripción:* la pastilla seca se resuspendió en una mezcla de reacción de retrotranscripción (cDNA synthesis Kit, Boheringer) conteniendo transcriptasa reversa, dNTP's hexámeros aleatorios, inactivador de RNA asa y amortiguador, incubando a 42°C. X 1hr. Se removió el RNA enzimáticamente y se sintetizó la cadena complementaria, con DNA polimerasa, incubando sucesivamente. El DNA resultante se precipito con etanol y se seco al vacío.
- *Amplificación:* el DNA se resuspendió en una mezcla de amplificación conteniendo dNTP's, primers, amortiguador y DNA polimerasa Taq y se sometió a 40 ciclos de amplificación de 30 seg. / 94°C. - 1min- / 59°C. - 1min / 72°C. precedido por una incubación a 94°C. por un minuto y seguido por otra de 72°C. por 7 min. en un GENE Cyclor (bio-rad). Como controles de amplificación se utilizo el plásmido pHCV, que contiene cDNA de los primeros 400 nucleótidos de la secuencia del virus de la hepatitis C.

- **Electroforetograma:** los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 % en TAE, durante 15 min. a 5 V/cm. El gel fue teñido con SybrGreen (1:10,000)durante 15 min. y fue analizado en un trans iluminador UV de onda corta. Se obtuvo una fotografía b/n con película polaroid ASA 3200.
- **Análisis y cuantificación:** la imagen fotográfica fue digitalizada utilizando un scanner Snap Scann 600 en una computadora power Macintosh G3 y fue analizada utilizando el software Un – scann – it. Los controles cuantitativos de amplificación se utilizaron para definir una ecuación de correlación entre copias y pixeles y los valores de cada muestra se introdujeron en esa ecuación para definir el número de copias presente.

Gammagrafia Hepática

La evaluación mediante gammagrafia hepática consistió: se realizó SPECT (tomografía por emisión de fotón único) mediante medicina nuclear. Así como imágenes planares para valorar cuál metodología nos da más información de daño parenquimatoso.

Los estudios se realizaron en una gammacámara Elscint, con un solo cabezal y se tomaron dos tipos de estudio. En el primero se administro 5 cm. de sulfuro coloidal 5 min. previo a la toma de la imagen.

Tomandose el estudio a 360°C..

En el siguiente estudio se tomaron 4 imágenes planares: anterior, posterior, lateral derecha y oblicua anterior derecha.

Biopsia Hepática

Se realizó con previa autorización de los pacientes mediante punción.

Análisis Estadístico

Se realizo con base al programa epi infor y mediante la prueba de ji cuadrada

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

*Evaluación de la H.C
mediante BX, PCR, GGHE y
Biopsia Hepática.
Dra. Angeles*

RESULTADOS

Niveles de Aminotransferasas

| | | |
|---|----|------|
| 0 | 26 | 51 % |
| 1 | 9 | 17.6 |
| 2 | 4 | 7.8 |
| 3 | 6 | 11.8 |
| 4 | 2 | 3.9 |
| 5 | 2 | 3.9 |
| 6 | 2 | 3.9 |

Tabla 1: se enumera los diferentes niveles de aminotransferasas por arriba del rango considerado como normal para ALT en los pacientes con hepatitis C crónica.

CARGA VIRAL

| | | |
|---|----|------|
| 0 | 10 | 19.6 |
| 3 | 13 | 25.5 |
| 4 | 13 | 25.2 |
| 5 | 7 | 13.7 |
| 6 | 5 | 9.8 |
| 7 | 3 | 5.9 |

Tabla 2: En esta tabla se encuentra la carga viral determinado por la PCR considerándose como negativo una PCR menor de 10^3 genomas.

GAMMAGRAFIA HEPATICA

| | | |
|---------|----|------|
| Anormal | 47 | 92.2 |
| NORMAL | 4 | 7.8 |

Tabla 3: En esta tabla se observa el porcentaje de normalidad y anormalidad en los pacientes con hepatitis C crónica.

BIOPSIA HEPATICA

| | |
|----------------|----|
| Sin reporte | 43 |
| 3 ptos. | 1 |
| 4 | 1 |
| 5 | 1 |
| 6 | 1 |
| 9 | 2 |
| 10 | 1 |
| No concluyente | 1 |

Tabla 4: De la biopsias realizadas, se evaluaron mediante el índice de knodell estableciéndose la puntuación que se observa en el lado izquierdo de la tabla.

Del análisis realizado con el paquete Epi infor 6.04, con prueba de ji cuadrada se obtuvieron los siguientes resultados:

Aminotransferasas-PCR ji 30.23, P = 0.4539 (ns)

GGHE- PCR ji 10.8 p 0.053(estadísticamente significativa).

Biopsia- PCR ji 34.97 p 0.469.

De lo anterior, se puede inferir que el estudio que demostró significancia estadística asociada fue el gammagrama hepático con la PCR.

Debido al número reducido de biopsias hepáticas reportadas hasta el momento, los valores obtenidos no se pueden tomar para realizar un análisis completo, sin embargo esto será posible en cuanto se obtenga un mayor número de muestras para su análisis.

*Evaluación de la H.C
mediante BX, PCR, GGHE y
Biopsia Hepática.
Dra. Angeles*

CONCLUSIONES

En conclusión, el gammagrama con la técnica descrita parece ser lo suficientemente sensible como para determinar a los pacientes que cursan con alteraciones de funcionalidad y morfología hepática, lo cual en un momento determinado puede tomarse como una alternativa para la evaluación de dichos pacientes en aquellos casos en que no se cuente con la prueba de PCR y tal vez en un futuro sea factible incluso suficiente con esta prueba para tener un panorama aproximado del curso de la enfermedad de estos pacientes y de esta forma no tener que recurrir a una prueba costosa o riesgosa.

BIBLIOGRAFIA

Desmet J. Valeer, et al. Classification of Chronic Hepatitis: diagnosis, grading, and estagin Hepatology. Vol. 19. June. Num. 6 1994; 1513-1520.

Lau Y.N. Johson, et al. Significance of serum Hepatitis C virus R.N.A in chronic Hepatitis C. the lancet Vol. 341. June 12, 1993; 1501-1504.

Alter et al. The Natural History of community acquired Hepatitis C in teh United States. The New England Journal of Medicine. Vol. 327. December 31, Num 27. 1992; 1899-1905.

Houghton, Michael et al. Molecular Biology of thee Hepatitis C.viruses: Implication for diagnosis, development and control of viral disease. Hepatology Vol. 14 Num. 2, 1991; 381-387.

Alter M. Hadler S.C. Judson F.N. Mares, A. Alexander et al. Risk factors for acute non-A non-B Hepatitis in the United States and association with Hepatitis C virus infeccion. JAMA. 1990, 264; 2223-2235.

Lau K.K George, Gary L. Davis. Hepatic expression of Hepatitis C virus R.N.A in chronic Hepatitis: A estudy by *in situ reverse* Transcription Polymerasa Chain Reaction. Hepatology. Vol 23, June, Num. 6 1996; 1318-1323.

Olle Reichard, Gunnar Norkrans, et al. Efficasy of combined interferon and ribavirin for treatement of Hepatitis C. The lancet. Vol 351. Janury 10, 1998; 78-86.

Siimmonds Peter , Alberti Alfredo et al. A proposed system for the nomenclature of Hepatitis C viral genotypes. Hepatology. Vol. 19, May, Num. 5 1994; 1321-1324.

Jeffeers J. Lennox, Hasan Fuat, et al. Prevalenced of antiboidies to Hepatitis C viirus among patients with cryptogenig chronic Hepatits and cirrosis. Hepatology Vol. 15. Num. 2 1992; 187-190.

Madejón Antonio Cotonat, Teresa et al. Treatement of chronic Hepatitis C virus infection with low and high doses of interferon alfa. Utility of Polymerasa Chain Reaction in monitoring antiviral respose. Hepatology. Vol 19, June, Num 6 1994; 1331-1336.

*Evaluación de la H.C
mediante BX, PCR, GGHE y
Biopsia Hepática.
Dra. Angeles*

Conferencia sobre Hepatitis C. Anual
Febrero 2 1997.

Hepatitis C virus. New diagnostic tools.
Groupe Francois d' Études.
Moleculaires des Hépatites.
Editorial John Libbey Eurotext 1994.

International group. Acute and chronic Hepatitis revisited. Lancet 1997;
914-919.

Batts Kp Ludwig J., Chronic Hepatitis. Am J Surg Pathol. 1995; 19:
1409-17.