

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



**ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS: PCR (REACCIÓN EN CADENA  
DE LA POLIMERASA) CUANTITATIVA COMPETITIVA PARA CARGA  
VIRAL Y GENOTIPIFICACIÓN POR PCR-RFLP DEL VIRUS DE LA  
HEPATITIS B (VHB)**

Departamento de  
Exámenes Profesionales

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A N:**

**ANNA KARINA SÁNCHEZ GARCÍA  
NORMA LAURA SOTRES QUEZADA**

**ASESORES: Q.F.B. Ana Laura Vazquez Martínez  
M. en C. Hiram Olivera Díaz**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2004**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL  
 AVANPMA DE  
 MEXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estandarización de las técnicas: PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), cuantitativa competitiva para carga viral y Genotipificación por PCR-RFLP del virus de la hepatitis B (VHB).

que presenta la pasante: Anna Karina Sánchez García  
 con número de cuenta: 9661526-9 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Abril de 2003.

PRESIDENTE Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya Andrea A. Becerril Osnaya

VOCAL Dra. Susana E. Mendoza Elvira Susana E. Mendoza Elvira

SECRETARIO Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez Ana Laura Vázquez Martínez

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Rene Damian Santos Rene Damian Santos

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.C. Beatriz de Jesús Maya Montalvo Beatriz de Jesús Maya Montalvo



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL  
 AUTÓNOMA DE  
 MEXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estandarización de las técnicas: PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), cuantitativa competitiva para carga viral y Genotipificación por PCR-RFLP del virus de la hepatitis B (VHB).

que presenta la pasante: Norma Laura Sotres Quezada  
 con número de cuenta: 9661533-1 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Abril de 2003

PRESIDENTE Q.F.I. Andrea Becerril Osnava *Andrea A. Becerril*

VOCAL Dra. Susana E. Mendoza Elvira *Susana E. Mendoza Elvira*

SECRETARIO Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez *Ana Laura Vázquez Martínez*

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Rene Damian Santos *Rene Damian Santos*

SEGUNDO SUPLENTE Men F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy *Beatriz de Jesús Maya Monroy*

## ***DEDICATORIAS***

### ***A MIS PADRES:***

Que sin escatimar esfuerzo alguno me dieron una educación para llegar hasta donde estoy ahora; por la confianza que tuvieron en mí; por su ejemplo de superación incansable. Por que gracias a su amor y apoyo he podido realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, les dedico esta Tesis, con amor, admiración y respeto. GRACIAS.

### ***A DIOS:***

Por la oportunidad de estar aquí, por que a través de mi vida me a guiado en las decisiones importantes de mi vida. GRACIAS.

***Laura***

## ***DEDICATORIAS***

### ***A MIS PAPAS Y FAMILIA:***

Por haberme permitido llegar a ser alguien aunque esto les costara muchos sacrificios y esfuerzos, así como también pedirles perdón por todo el tiempo que les robe a ustedes por llegar a ser esto, no tengo palabras para agradecerles lo que hicieron por mí, solo puedo dedicarles lo que ahora soy prometiéndoles hacer lo mejor posible. De su hija que los quiere.

### ***A MI ESPOSO:***

Por estar conmigo a lo largo de mi formación, por tenerme la paciencia que me tiene y nunca frenar en mí los deseos de llegar a ser lo que ahora soy, por la comprensión que tuviste conmigo al no poderte dedicar el tiempo necesario, por eso y mucho más, gracias EDUARDO, de tu esposa que te ama.

### ***A MIS HERMANAS:***

Gracias por estar siempre conmigo y motivarme a seguir adelante, gracias a su apoyo llegue hasta aquí. De su hermana que las quiere.

***Karina***

## ***AGRADECIMIENTOS***

### **A DIOS:**

**Agradecemos a Dios que nos permitió llegar hasta aquí.**

*Karina y Laura*

### **A LAURA SOTRES QUEZADA:**

Amiga, si tuviera que escribir por todo lo que tengo que darte las gracias, no acabaría en esta tesis por lo que lo resumo en una sola palabra GRACIAS, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por tu paciencia, por las lecciones de vida que aprendimos juntas, por confiar en mí y compartir la realización de este proyecto, aunque mucha gente creyera que no lo lograríamos lo hicimos, gracias por ser mi Amiga de quien te quiere y admira.

*Karina*

### **A KARINA:**

Gracias amiga. Por el equipo que formamos juntas desde la escuela, por la confianza y paciencia que siempre me tuviste, por los consejos que me diste, por ser mi amiga, por formar parte de este reto que hoy vemos cumplido, por que lo hemos logrado;iii GRACIAS.

*Laura*

### **A MIS HERMANOS:**

Por los sacrificios que hemos hecho; por los buenos, malos, divertidos y tristes momentos que hemos vivido juntos, por brindarme su apoyo, por ser mis hermanitos Gracias Dany, Gaby, Dulce, Jesús y Manuel.

*Laura*

**M. en C. Hiram Olivera Díaz:**

Por la confianza de darnos este proyecto y el tiempo que nos dedico, así como por la paciencia que nos tuvo y por los conocimientos adquiridos gracias a usted.

**Depto. De Biología Molecular, principalmente a Q.B.P. Lorena Chavez, Q.F.B. Carlos Arturo Vázquez, Q.F.B. Jesús Manuel Tenorio Tec. Lab. Juan Carlos Mendez, Q.F.B. Carmen Huanaco, Tec. Lab. Elvia Davila, Tec. Lab. Estela Corona, Biol.. Carmen Esteban.**

Gracias a todos por la ayuda que recibimos de ustedes en la realización de este proyecto, así como la paciencia que nos tuvieron durante todo el tiempo que compartimos con ustedes.

**Q.F.B. Ana Laura Vázquez y Q.F.B. Roberto Vázquez:**

Por habernos orientado y encausado en la realización de este proyecto, así como también agradecerles por que siempre estuvieron al pendiente del trascurso del trabajo.

**A nuestros sinodales:**

Por los consejos y recomendaciones, que fueron de gran utilidad para la culminación de esta Tesis.

**A todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron con nosotras para alcanzar este meta. GRACIAS**

*Karina y Laura*



# INDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	6
2.1 Justificación.....	6
2.2 Generalidades.....	7
2.2.1 Historia.....	8
2.2.2 Características Biológicas.....	10
Estructura del Virión.....	11
Tipo de Partículas del VHB .....	13
Genoma viral.....	18
Mecanismo de Replicación.....	21
2.2.3 Epidemiología.....	28
2.2.4 Síndromes clínicos.....	31
2.2.5 Diagnóstico de Laboratorio.....	34
2.2.6 Tratamiento.....	48
2.2.7 Prevención y Vacunas Disponibles.....	50
3. Objetivos.....	53
4. Materiales y métodos.....	54
4.1 Material.....	54
4.2 Estandarización del Método de extracción de ADN del VHB.....	54
4.2.1 Extracción con Hidróxido de sodio (NaOH).....	54
4.2.2 Extracción con Proteinasa K/Fenol.....	54
4.3 Estandarización de PCR para el VHB.....	55
4.3.1 PCR cualitativo para el VHB con iniciadores HBV+ y HBV-.....	55
4.3.2 PCR cualitativo para el VHB con iniciadores HBV252 y HBV 428.....	56
4.3.3 Construcción de Control Interno Cuantitativo (CIC).....	56
4.3.4 PCR cuantitativa competitiva para carga viral del VHB.....	57
4.4 Genotipificación del VHB por PCR-RFLP.....	59
4.4.1 PCR para genotipificación por PCR-RFLP para VHB.....	59
4.4.2 Digestión con enzimas de restricción Ava II y Mbo I.....	59
5. Resultados .....	61
5.1 Métodos de Extracción para el VHB.....	61
5.2 Estandarización de PCR cualitativa para el VHB con los iniciadores HBV+ y HBV-.....	62

5.3 Estandarización de PCR cualitativa para el VHB con los iniciadores HBV252 y HVB428R.....	63
5.4 Elaboración de Control Interno Cuantitativo (CIC) para PCR cuantitativa competitiva del VHB.....	64
5.5 Estandarización de PCR cuantitativa competitiva para Carga Viral del VHB....	68
5.6 Estandarización del método de PCR-RFLP's para el Genotipo del VHB.....	74
6. Discusión.....	77
7. Conclusiones.....	86
8. Referencias.....	88
8.1 Lista de Abreviaturas.....	93
8.2 Apéndice de Reactivos.....	94
8.3 Apéndice de Técnicas.....	97

## ii Índice de Tablas

TABLA 2.1. Características de los antígenos y anticuerpos del VHB.....	17
TABLA 2.2. Pacientes en riesgo de contraer hepatitis B.....	30
TABLA 2.3. Marcadores serológicos de la hepatitis B en diferentes fases de la infección.....	40
TABLA 2.4. Kits Comerciales más utilizados para el Diagnóstico y Tipificación del VHB.....	46
TABLA 2.5. Objetivos de la terapia con interferón alfa-2b en pacientes con hepatitis B crónica.....	49
TABLA 4.1. Mezcla de reacción de PCR para elaboración del CIC, con volumen de 50µl.....	57
TABLA 5.1. Estandarización de la PCR cualitativa con los Iniciadores HBV+ y HBV-.....	62
TABLA 5.2. Condiciones Adecuadas de la PCR para la Construcción de CIC.....	66
TABLA 5.3 Cálculos para obtener la concentración del CIC.....	67
TABLA 5.4. Número de moléculas de CIC obtenidas.....	67
TABLA 5.5 Linealidad del Método de PCR cuantitativa competitiva.....	69
TABLA 5.6 Determinaciones estadísticas del Método de PCR cuantitativa competitiva.....	71
TABLA 5.7. Límite inferior de detección del Método de PCR cuantitativa competitiva para carga viral.....	71
TABLA 5.8. Carga Viral de muestras procesadas.....	72
TABLA 5.9. Valores de Frecuencia para Carga Viral del VHB.....	74
TABLA 5.10 RFLP's del segmento entre el nucleótido 2823 y 80 de la Región pre-S del VHB, generados por la acción de las enzimas Ava II y Mbo I.....	76E

TABLA 5.11. Resultados de Genotipo obtenidos de muestras con VHB.....	75
TABLA 5.12. Valores de Frecuencia de los Genotipos encontrados por PCR-RFLP's.....	76
TABLA 6.1 Comparación entre la serología de los pacientes y los resultados de ADN viral.....	79

## ii Índice de Figuras

FIGURA 2.1. Partículas que presenta el Virión del VHB.....	12
FIGURA 2.2 . Estructura del ε tallo-asa (ε stem-loop) de los <i>Hepadnaviridae</i> .....	20
FIGURA 2.3. Ciclo de vida del VHB.....	21
FIGURA 5.1.Comparación de las Técnicas de Extracción.....	61F
FIGURA 5.2. Comparación del método de Proteinasa K/Fenol con el método comercial PUREGENE .....	62F
FIGURA 5.3. Estandarización de PCR cuantitativa con iniciadores HBV+ y HBV-.....	63F
FIGURA 5.4. Curva de Cloruro de Magnesio (MgCl <sub>2</sub> ) para la PCR con iniciadores HBV252 y HBV428R.....	64F
FIGURA 5.5. Amplificación del CIC con iniciadores HBV+ y HBV-.....	65F
FIGURA 5.6. Cuantificación del Control Interno Cuantitativo (CIC).....	66F
FIGURA 5.7. Diluciones de trabajo de CIC para Carga Viral del VHB.....	68F
FIGURA 5.8 PCR cuantitativa competitiva para Carga Viral del VHB.....	69F
FIGURA 5.9. Curva de linealidad del Método de PCR cuantitativa competitiva....	70F
FIGURA 5.10. Determinación del Coeficiente de Varianza del Método de PCR cuantitativa competitiva.....	71F
FIGURA 5.11. Obtención de Limite mínimo detectable del Método de PCR cuantitativa competitiva.....	72F
FIGURA 5.12. PCR para genotipificación por RFLP's, utilizando los iniciadores P1 y P2. ....	74F
FIGURA 5.13. RFLP's obtenidos de un segmento de la región pre-S del VHB.....	76F
GRAFICO 2.1. Perfil de los marcadores serológicos.....	39
GRAFICO 5.1. Curva de Linealidad para PCR cuantitativa Competitiva del VHB.	70
ESQUEMA 2.1. Mecanismo de Transcripción Reversa de los <i>hepadnavirus</i> .....	26
ESQUEMA 2.2 Fundamento de Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	44
ESQUEMA 2.3. Esquemización de Método de PCR-RFLP's.....	47
ESQUEMA 5.1 Secuencia completa del genoma VHB.....	65E
ESQUEMA 5.2. Esquema de Construcción del CIC.....	65
ESQUEMA 5.3. Secuencia del genoma VHB, del Genotipo F.....	74E
ESQUEMA 6.1. Mapa de restricción del genotipo F1 para las enzimas Ava II y Mbo I.....	82
ESQUEMA 6.2. Mapa de restricción del genotipo F2 para las enzimas Ava II y Mbo I.....	83
ESQUEMA 6.3. Mapa de restricción del genotipo X, para la enzima Ava II.....	84

## 1. RESUMEN

Hoy en día existen muchos métodos moleculares (Berger y cols. 1998, Gerken y cols.1998, Lefrere y cols. 1999, Nagata y cols. 1999, Pawlowsky y cols. 2000) para el diagnóstico clínico del Virus de la hepatitis B (VHB), estos métodos permiten la detección específica y sensible del ADN viral.

Con este proyecto experimental se pretenden desarrollar dos pruebas moleculares que podrán ser aplicadas en el área clínica y en estudios epidemiológicos: la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa competitiva para la determinación de carga viral (número de moléculas de ADN/mL de plasma) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) para la genotipificación del VHB, estas pruebas pretenden ser sensibles, específicas, rápidas y además económicas en comparación con las pruebas comerciales

La PCR cuantitativa competitiva tiene una alta sensibilidad para la detección de pequeñas cantidades de ADN viral (Gerken 1998, Hammerle 1997, Pawlowsky 2000, Simpson 1997) y es de utilidad para la determinación de carga viral del VHB circulante, el cual refleja el balance entre el intervalo de replicación viral-que se lleva a cabo en hígado- y la respuesta inmune del hospedero, así como el efecto de la terapia antiviral (Gerken,1998).

Para la genotipificación del VHB la técnica que se utilizará es PCR-RFLP's método que se basa en el análisis de la región pre-S la cual está altamente conservada en el genoma del virus (Lindh,1998). Este método proporciona los fragmentos específicos para la identificación de los diferentes genotipos. Esta identificación es de gran utilidad a nivel epidemiológico, ya que los genotipos tienen una distribución geográfica característica (Arauz-Ruiz,1997); como es el caso del genotipo F que probablemente sea originario del continente americano mientras que la prevalencia de los genotipos A y D en Sudamérica, es probablemente debido a la migración del Norte y sur de Europa (Lindh,1998).

Para lograr los objetivos planteados en el proyecto es necesario estandarizar un método para la extracción del ADN viral de las muestras clínicas, que sea altamente sensible para recuperar pequeñas cantidades de ADN viral.

En el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (InDRE), Departamento de Diagnóstico y Caracterización Molecular, en el Laboratorio de Métodos Cuantitativos, se logró estandarizar y establecer un método completo para la cuantificación y genotipificación del VHB.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

La infección por VHB es una de las causas más comunes de viremia crónica con un estimado de 200 a 300 millones de portadores a nivel mundial, favoreciendo el mantenimiento de la cadena de transmisión. Este virus es considerado como el segundo carcinógeno humano conocido, después del tabaco, siendo la causa de hasta el 80% del Carcinoma Hepatocelular Primario. A nivel mundial se presentan más de 250 mil muertes anuales asociadas con el VHB por hepatitis fulminante y cirrosis. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud: la Hepatitis B continúa siendo un problema mayor de salud pública en las Américas, con casi 400 mil infecciones nuevas cada año. En regiones de endemia intermedia, como Latinoamérica, entre 20 y 55% de la población adulta ha estado expuesta a la enfermedad y de 0.5 a 7% son portadores.

Con este proyecto experimental se pretenden desarrollar dos pruebas moleculares que podrán ser aplicadas en el área clínica y en estudios epidemiológicos: la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa Competitiva para la determinación de carga viral, técnica que presenta una alta sensibilidad para la detección de pequeñas cantidades de ADN viral; y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción para la genotipificación del Virus de la Hepatitis B, la cual es de gran utilidad a nivel epidemiológico. Estas pruebas pretenden ser sensibles, específicas, rápidas y económicas en comparación con las pruebas comerciales; además, en el área clínica son útiles en el monitoreo de la terapia antiviral, la determinación de la infecciosidad y en combinación con marcadores serológicos para la resolución de perfiles inusuales.

## 2.2. GENERALIDADES

*Aún visualizamos a la enfermedad humana como la consecuencia de la intriga de un demonio moderno y muy organizado. En la vida real el mundo de los microorganismos rara vez es demonio para el huésped que lo alberga. La enfermedad es el resultado de negociaciones inconclusas, malentendidos biológicos entre el microorganismo no invitado y el huésped sorprendido.*

*Lewis Thomas.*

Los microorganismos son parte de la vida; la mayoría de ellos buscan sobrevivir, sin causar daño en el hospedero que los cobija, de esta manera aseguran un sustento continuo. La relación se llama simbiosis -es una forma armónica o equilibrada de coexistencia- (Poo y cols. 2001). Sin embargo algunos microorganismos como el virus de la Hepatitis B (VHB), al cual se enfoca el estudio, es capaz de producir daño al hígado de manera silenciosa e insidiosa a menos que nuestro propio sistema inmunitario sea capaz de neutralizarlo y eliminarlo.

La enfermedad que causa VHB es la hepatitis, definida como la inflamación del hígado (Poo y cols. 2001), la cual se ha clasificado en dos grandes grupos: la no infecciosa, provocada por agentes químicos (solventes, fármacos, etc.) y la infecciosa, ocasionada por virus, bacterias y parásitos. Para este proyecto la hepatitis de interés es la hepatitis viral, que se define como una infección viral de los hepatocitos provocando necrosis e inflamación del hígado, causada por uno o más de cinco tipos virales.

Los signos y síntomas son las señales de humo enviadas por nuestro cuerpo para advertirnos que algo anda mal (Poo y cols. 2001), y para el caso de la hepatitis B, el signo más notable de la enfermedad es la ictericia, que va de una coloración amarilla hasta naranja de la piel y conjuntiva causada por la deposición de niveles elevados de bilirrubinas en sangre como resultado de una excreción defectuosa del pigmento biliar, debido al daño causado al hepatocito (Fields y cols. 1996).

Dependiendo del tiempo que persista la inflamación y necrosis hepática, el daño puede ir desde una **Hepatitis aguda**, la cual es un padecimiento donde el tiempo de duración es menor a 6 meses en

los cuales se presentan los signos clásicos de la enfermedad: ictericia, orina oscura y excremento pálido, pudiendo existir fiebre, escalofríos, dolores musculares, inapetencia y cansancio; hasta una **Hepatitis crónica**, en la cual el padecimiento persiste por más de 6 meses, la mitad de los pacientes pueden ser asintomáticos, sin embargo se detecta daño al hígado, como células inflamatorias, necrosis y fibrosis; teniendo como consecuencia la aparición de **Cirrosis**, que representa una fase avanzada de daño a este órgano en el cual existen numerosas cicatrices o zonas de fibrosis rodeando a las células del hígado dándole un aspecto nodular. El tiempo necesario para desarrollar cirrosis es de 15 a 30 años, la enfermedad en esta etapa prácticamente no es reversible; y puede llegar a desencadenar un **Carcinoma hepático** (Poo y cols. 2001). El VHB puede causar cualquiera de estos padecimientos, siendo la respuesta del sistema inmune de cada individuo el principal determinante de que aparezcan unas formas u otras.

El número de personas infectadas por el VHB, en el mundo es difícil de establecer, se calcula que se trata de cientos de millones. Algunos de los casos evolucionaron a formas crónicas y eventualmente a cirrosis o carcinoma hepatocelular.

La hepatitis viral crónica es una de las enfermedades hepáticas más frecuentes a nivel mundial y es una causa importante de morbilidad y mortalidad. En México la prevalencia en la población adulta varía entre 0.5 y 1.5%. (Méndez 1999); en el año 2000 se reportaron 23,088 casos nuevos de hepatitis virales (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2001).

### 2.2.1.HISTORIA

*De diez cosas que nos molestan nueve no lo conseguiremos si entendiéramos perfectamente sus causas y autentica naturaleza.*

*Schopenhauer.*

En la primera civilización donde se detectaron enfermedades hepáticas fue en Mesopotamia. Sin embargo no fue sino hasta 1930 cuando se determinó la vía parenteral, como vía de transmisión para las hepatitis; y hasta 1947 cuando se introducen los términos de Hepatitis A y Hepatitis B por



MacCallum, categorizando la infección como epidemia y el suero de pacientes con Hepatitis como suero icterico. Más tarde, entre los 50's y a principios de los 70's, los estudios de Murria y Krugman fueron instrumento para definir posteriormente las relaciones y diferencias seroepidemiológicas entre la hepatitis A y la hepatitis B, lo cual finalmente ayudó para la evaluación de nuevos métodos para el diagnóstico e inmunoprofilaxis de estas enfermedades. Dos tipos distintos de hepatitis fueron diferenciados, el agente de hepatitis fue designado MS-2 y semejante a hepatitis B.

En el curso de una investigación, en 1965, el Dr Baruch Blumberg recopiló muestras de suero de pacientes de Australia, que contenían antígenos relacionados específicamente con los anticuerpos del suero de un paciente hemofílico de América, dándole el nombre de Antígeno de Australia (antígeno Au).

En 1970 Dane detectó el virión completo del VHB, de 42nm, que es una partícula con doble membrana, consta de una envoltura externa compuesta de un antígeno de superficie (HBsAg), y una envoltura interna o nucleocapside que contiene diferentes antígenos, el antígeno de core del VHB (HBcAg), además de un genoma pequeño, circular y parcialmente de doble cadena y una enzima ADN polimerasa endógena.

Un tercer antígeno fue descrito por Magnius y Espmark en 1972, y fue designado como antígeno e del VHB (HBeAg) (Bruss y cols.1988, Henry 1993). Tiene un peso molecular de 30,000 daltons (Henry 1993). Este antígeno es un marcador relevante de la presencia de viriones intactos, así como de su infectividad (Fields y cols. 1996). En 1973, Kaplan descubre que el VHB contiene una enzima DNA-polimerasa dependiente de ADN.

En 1965 Blumberg inicia los estudios para la vacuna del VHB (Fields y cols. 1996). Actualmente existen dos tipos de vacunas contra VHB, una derivada de plasma humano (ya no utilizada), autorizada en noviembre de 1981 en E.U.A. llamada Heptavax; y otra obtenida por ingeniería genética, que recibe el nombre de Recombivax (Maldonado-Jimenez 1998).

En 1993 al estudiar las variaciones genéticas de las cadenas del VHB, se observó que eran de origen geográfico diverso y con variaciones naturales en la estructura primaria del HBsAg; y en 1995 se observó que los subtipos, los genotipos y la epidemiología molecular del VHB se refleja en la variabilidad de la secuencia del gen S (MacDonald y cols. 2000).

## 2.2.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

*El temor ante lo desconocido se desvanece poco a poco, tan pronto nos atrevemos a describirlo y a explorarlo.*

*Anónimo.*

El VHB es un microorganismo que forma parte de los más de 10,000 que pueden ocasionar infección y enfermedad en nuestro cuerpo (Poo y cols. 2001). El VHB es el virus prototipo de una nueva familia de virus de ADN llamada *Hepadnaviridae*, es un virus envuelto, su nucleocapside es icosaédrica y presenta un ADN parcialmente de doble cadena (Gyoo y cols. 2002, Roossinck y cols. 1987); no presenta efectos citopáticos (Carretero y cols. 2002).

La inmunogenicidad y antigenicidad del VHB es retenida después de exponerse al eter, ácido (pH 2.4 por menos de 6 hrs.), y calor (98°C por 1 min; 60°C por 10 hrs). La exposición de HBsAg con hipoclorito de sodio 0.25% por 3min. destruye la antigenicidad (y probablemente la infectividad). La infectividad en suero es baja después de hervir directamente por 2min., autoclavar a 121°C por 20 min o por calor seco a 160°C por 1 hr. El VHB retiene su infectividad cuando es almacenado de 30–32°C por menos de 6 meses y cuando es congelado a –20°C por 15 años. El virión completo tiene una densidad de 1.22 g/cm<sup>3</sup> en CsCl (Fields y cols. 1996).

### 2.2.2.1 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

El VHB infecta células produciendo múltiples tipos de partículas relacionadas. A través de microscopía electrónica, con preparaciones purificadas se encuentran tres tipos de partículas del VHB:

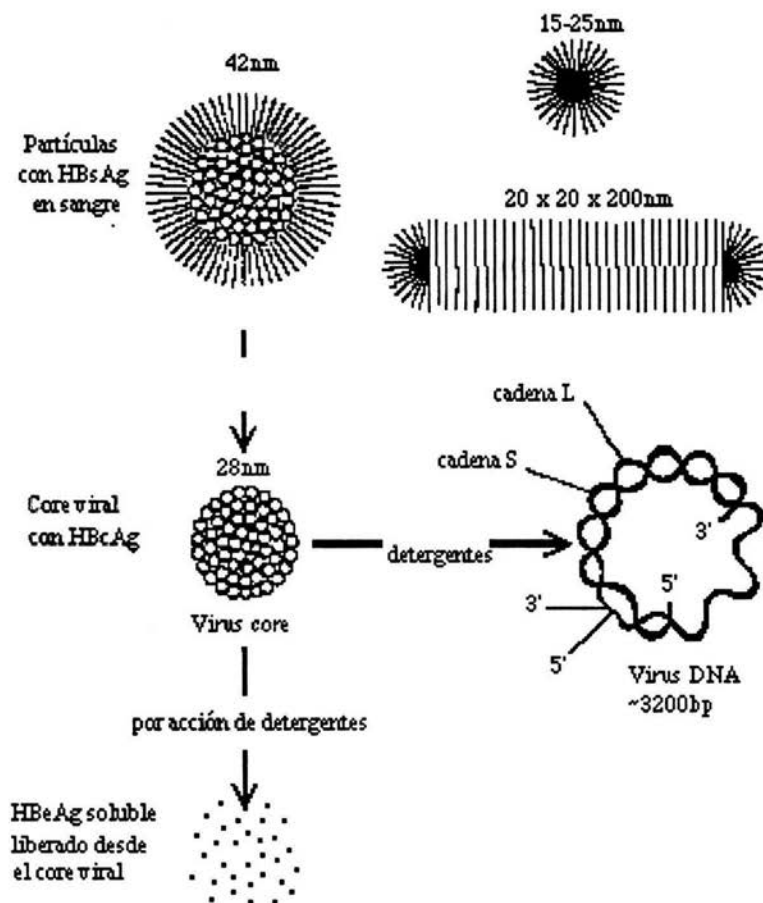
- a) partículas con doble membrana de 42-47 nm conocidas como partículas de Dane, de estas se encuentran alrededor de  $10^{10}$  partículas/mL de plasma.
- b) partículas pequeñas esféricas y pleomórficas, de 17 a 25 nm de diámetro aproximadamente, éstas se encuentran en mayor número, a una concentración aproximada de  $10^{13}$  partículas/mL.

La estructura esférica de 20 nm y la filamentosa están compuestas exclusivamente de HBsAg y derivados lipídicos (propios del hospedero), los principales lípidos contenidos son fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos (Roossinck y cols. 1987, Fields y cols. 1996). Estas partículas carecen de ácidos nucleicos, por lo que no son infecciosas. Sin embargo, en forma pura, estas partículas son altamente inmunogénicas e inducen eficientemente una respuesta de neutralización por anticuerpos anti-HBs (Fields y cols. 1996).

- c) en menor cantidad, se encuentran estructuras de forma tubular filamentosas de 20 nm de diámetro y de longitud variable.

Las tres formas tienen en común al antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), el cual está presente en cantidades enormes en el suero de pacientes infectados. La partícula de Dane, el virión infeccioso del VHB, es complejo y consiste en una partícula de doble envoltura, una exterior de 7nm, repleta con todos los polipéptidos del gen S y un core o capsida interior de 27nm, la cual contiene las proteínas HBc y HBe, un ADN circular de doble cadena y 3200 pb y una enzima DNA polimerasa. Los títulos de las partículas de Dane en sangre pueden ir desde muy bajos  $10^4$ /mL hasta muy elevados de  $10^{10}$ /mL.

FIGURA 2.1. Partículas que presenta el Virión del VHB. (Microbiología Clínica en la WWW. Virología.).



### 2.2.2.2 TIPO DE PARTÍCULAS VHB.

La replicación del VHB esta asociada con la formación de tres antígenos los cuales son; el antígeno de superficie (HBsAg), el antígeno C (HBcAg) y el antígeno E (HBeAg) (Bruss y cols. 1988).

- **Proteínas de Superficie de Hepatitis B**

Las proteínas de superficie (HBsAg) son tres: Proteína pequeña de antígeno de superficie (SHBsAg), proteína mediana de antígeno de superficie (MHBsAg) y proteína grande de antígeno de superficie (LHBsAg) (Budkowska y cols. 1995, Ryu y cols. 2000, Paulij y cols. 1999). El antígeno de superficie (HBsAg) se halla en la cubierta y en la superficie de las partículas esféricas y filamentosas- partículas no infecciosas-.

\*SHBsAg o HBsAg.

Esta proteína es la más pequeña de las proteínas de superficie, solo contiene un dominio-S (Mehdi y cols. 1994, Pontisso y cols. 1989). Históricamente nos referimos a ella como Antígeno de Australia (Au antigen). Es altamente hidrofóbica y es el principal constituyente de todas las partículas de hepatitis B y es la causa de la inserción de las tres proteínas S dentro de las membranas del retículo endoplásmico y subsecuentes formaciones de partículas. Esta proteína parece ser manufacturada por el virus en elevadas cantidades y forma parte de las partículas filamentosas y esféricas (Pontisso y cols. 1989); también contiene un epitopo altamente antigénico. El análisis de este epitopo permite clasificar a los portadores de VHB. Varios subtipos son reconocidos por anticuerpos. El determinante antigénico presente en todas las HBs conocidas se denomina "a" y los cuatro subtipos principales se denominan "d" ó "y" y "w" ó "r". Las posibles combinaciones de estos antígenos dan lugar a ocho subtipos de VHB, que son útiles como marcadores epidemiológicos (Araúz-Ruiz y cols 1997).

### \*MHBSAg

La proteína de superficie de tamaño mediano (MHBSAg) contiene 55 aminoácidos adicionales en el dominio conocido como pre-S2 (Mehdl y cols. 1994), este dominio es hidrofílico y parece residir extracelularmente. Esta proteína se encuentra en cantidades similares en las partículas filamentosas, esféricas y las partículas de Dane (Pontisso y cols. 1989). Se ha propuesto que esta proteína, está involucrada en la unión y entrada del VHB al hígado. Sin embargo, en un estudio de análisis genético en pacientes con VHB con hepatitis fulminante, se encontró una mutación proveniente de la expresión de esta proteína, lo que probablemente excluya a MHBSAg de participar como proteína de unión, aunque pueda contribuir a la unión viral por un mecanismo secundario.

### \*LHBSAg

Esta proteína es la mas larga de las proteínas de superficie, contiene un dominio pre-S1 además de los dominios pre-S2 y S (Mehdl y cols. 1994). La secuencia del dominio pre-S1 parece ser altamente variable en los pacientes infectados, esto sugiere que pueda ser una proteína involucrada en la unión con el hígado. Esta proteína se encuentra en mayor abundancia en las partículas esféricas (Pontisso y cols. 1989).

Se han observado dos estructuras diferentes para esta proteína: una en la superficie de la célula y en viriones maduros y la otra en la superficie del retículo endoplásmico (RE); estas formas pueden distinguirse en estudios con proteasas y anticuerpos. En estudios con VHB aviar –de pato- (DHBV), parece ser que ambos dominios, pre-S1 y pre-S2 siguen en el citoplasma cuando LHBSAg esta en el RE. Aun está bajo debate el cuando, donde y como el dominio pre-S2 es translocado a través de la membrana. Se han encontrado cantidades de LHBSAg en partículas filamentosas (Heermann y cols. 1984).

- Proteínas HBc y HBe.

La expresión del gen de core del VHB en células infectadas resulta en la producción de dos productos diferentes que son distintos en sus propiedades biofísicas y antigénicas. Estos productos son la proteína c (HBc) y la proteína e (HBe) que tienen una secuencia de aminoácidos muy similar (Wasenauer y cols. 1992).

La proteína de core de hepatitis B (HBc) es el mayor componente de la nucleocapside (Wasenauer y cols. 1992). Esta proteína de 183 aminoácidos es expresada en el citoplasma de la célula infectada (Birbaum y cols. 1990). El análisis de su secuencia indica que en HBc es predominantemente hidrofílica.

Los viriones purificados poseen la proteína HBc, la cual se agrega en forma de partículas de core. Esta envuelve al genoma viral y la polimerasa, encapsulándolos. En un virión maduro, las partículas de core terminan envueltas por varias proteínas de HBs. Hay en apariencia una concentración crítica requerida de partículas de core para el ensamblaje, de  $0.8\mu\text{M}$ .

El HBeAg como su nombre lo dice ("early" –temprana-), aparece durante la infección aguda del VHB; solo como un producto soluble (Bruss y cols. 1988). La HBe es una no partícula de 17 kd (Birbaum y cols. 1990), que es expresada por la traducción de una secuencia 5' con respecto al marco de lectura abierto (ORF) del HBc, y es conocida como la secuencia pre-C/C, esta secuencia codifica para un dominio hidrofóbico transmembranal, resultando en la traducción/translocación de la HBe dentro del lumen en el RE (Bruss y cols. 1988).

El propósito de la producción de esta forma secretora de HBc no está bien definido. Una teoría es que los niveles altos de HBe pueden de algún modo suprimir al sistema inmune. Los altos niveles de HBe son frecuentemente encontrados en el suero de pacientes con alta viremia del VHB.

- Proteína Polimerasa de Hepatitis B

La proteína polimerasa de hepatitis B (HBp) tiene el ORF mas largo, cerca de 80% del genoma del VHB. Proteína de 90Kd, tiene actividad de polimerasa dependiente de ADN y ARN. HBp es la llave para la generación del genoma y la encapsidación del ARN pregenómico (ARNpg). HBp esta empaquetada junto con ARNpg dentro de la nucleocapside del virión. Basándose en homologías de secuencia y en el estudio del mecanismo de replicación del genoma viral, HBp ha sido dividida en 4 dominios todos indispensables; lo que nos indica que el gen P es multifuncional (Radziwill y cols. 1990).

La porción N-terminal de la proteína actúa en el proceso de generar el iniciador -primer- para la síntesis de la cadena de ADN negativa y termina unida covalentemente a el extremo 5' de esta cadena de ADN (-). Este dominio es llamado primasa.

El subsecuente dominio al parecer no tiene solo una función enzimática, pero actúa como espaciador entre el primero y tercer dominios (Radziwill y col. 1990).

El tercer dominio le da nombre a la HBp. Este ocupa aproximadamente el 40% de la proteína y codifica para la actividad de polimerasa dependiente de ARN y ADN. Sin embargo la HBp requiere también de la presencia de iones metálicos, siendo el principal efector de esta reacción el magnesio con una concentración de 5mM (Urban y cols. 1998) y de el  $\epsilon$  tallo-asa para realizar la actividad de transcriptasa reversa/polimerasa. El cuarto dominio de la HBp presenta la actividad de RNAasa H - degrada el ARN en híbridos ADN:ARN- (Radziwill y cols. 1990).

- Proteína X de Hepatitis B

La proteína X de hepatitis B (HBx) presenta el ORF más pequeño del genoma del VHB. Es una proteína de 154 aminoácidos, cuya función y localización celular son un misterio; no ha sido encontrada en viriones maduros y no esta asociada con partículas de nucleocapside. El análisis de su secuencia sugiere su localización en citoplasma. La expresión de HBx es corta de acuerdo al estado de infección (Reifenberg y cols. 2002).



La estricta conservación del ORF X en el genoma del VHB sugiere un rol importante de HBx en el ciclo viral; aunque solo se tengan especulaciones del rol de esta proteína (Reifenberg y cols. 2002).

Se sugiere que **HBx tiene actividad** de cinasa serina/treonina. Quizá el efecto más intrigante de HBx en células infectadas es su actividad tumorigénica (Kim y cols. 1991). HBx esta asociada con infección crónica y con carcinoma hepatocelular (HCC) (Young y cols. 2002).

Esta proteína de 17kd esta involucrada en multiples procesos virales y celulares, como son la replicación viral, control y apoptosis de ciclo celular, adhesión intracelular y migración celular (Carretero y cols. 2002).

**TABLA 2.1. Características de los antígenos y anticuerpos del VHB.** (Fields y cols. 1996)

<i>Abreviatura</i>	<i>Termino</i>	<i>Descripción</i>
HBsAg	Antígeno de superficie de hepatitis B. Antes llamado antígeno de Australia	El complejo de los determinantes antigénicos encontrados en la superficie del VHB y en partículas de 22nm y formas tubulares.
HBcAg	Antígeno de core de hepatitis B	La especificidad antigénica asociada con el core (27nm) del VHB.
HBeAg	Antígeno e de hepatitis B	Los determinantes antigénicos están íntimamente asociados con la nucleocápside de VHB. Estas proteínas se encuentran solubles en suero.
Anti-HBs, Anti-HBc y Anti-HBe	Anticuerpos de HBsAg, HBeAg y HBcAg	Anticuerpos específicos que son producidos en respuesta a sus respectivos determinantes antigénicos.

### 2.2.2.3. GENOMA VIRAL

Su **genoma** es un ADN circular pequeño parcialmente bicatenario, de aproximadamente 3200 nucleótidos de longitud (3.2Kb). La forma circular está mantenida por la unión con extremo 5', esta molécula tiene una estructura inusual con dos cadenas de ADN que no son perfectamente simétricas (Radziwill y cols. 1990, Noppampanth y cols. 2003, Roossinck y cols. 1987, Wu y cols. 1991). Presenta cuatro marcos de lectura abiertos (preS/S, preC/C, P y X) (Arauz-Ruiz y cols. 1997, Carretero y cols. 2002, Roossinck y cols. 1987, Will y cols. 1987), codifica una transcriptasa inversa y su replicación es a través de un ácido ribonucleico (ARN) intermediario (Radziwill y cols. 1990, Urban y cols. 1998, Wu y cols. 1991).

Los viriones VHB contiene ADN y ARN, además en algunas regiones del genoma este puede ser de cadena sencilla, cadena doble y algunas veces de triple cadena; esta peculiar característica es un resultado directo del mecanismo de replicación del genoma del VHB.

Cada par de bases en el genoma del VHB está involucrado en la codificación de al menos una proteína del VHB, el genoma también contiene elementos genéticos que regulan los niveles de transcripción, determinan los sitios de poliadenilación, e incluso marca un transcrito específico para ser encapsulado en la nucleocapside.

Hay definidos cuatro marcos de lectura abiertos (ORFs) en el genoma, los cuales resultan en la transcripción y expresión de siete diferentes proteínas del VHB, mediante el uso de diferentes cadenas de inicio para la síntesis de proteínas que son: ORF P ocupa la mayor parte del genoma y codifica para la polimerasa viral (con actividad enzimática central en la replicación del genoma); ORF S codifica para las tres proteínas de superficie, se divide en dos subregiones (pre-S1 y pre-S2); ORF C codifica para las proteínas de core y e, proteínas estructurales de nucleocapside; y ORF X codifica para la proteína X del VHB (Hirsch y cols. 1990).

Para la comprensión adecuada del mecanismo de replicación del VHB es necesario definir algunos elementos que intervienen en éste, como son:

- **ARN pregenómico –ARNpg-**: Es un transcrito genómico al cual le falta el codón de inicio AUG. Es específicamente elegido por la polimerasa del VHB para su empaquetamiento; sirven como molde para la síntesis del ADN y se dice que son ARN genómicos bifuncionales ya que también sirven de mensajeros para la traducción de ORF's pre-C, C y P (Pollack y cols. 1994, Will y cols. 1987); por lo que el ARN pregenómico de los *hepadviridae*, es igualmente infeccioso que el ADN contenido en el virus (Wu y cols. 1991).
- **Enhancer o Potenciador**: secuencia nucleotídica que produce un incremento regional en la transcripción.
- **Tallo-asa**: estructura secundaria en una cadena sencilla de ácido nucleico que muestra una región de bases apareadas y una región libre, ver figura 2.2.

## Avian Hepadnaviruses (DHBV16)

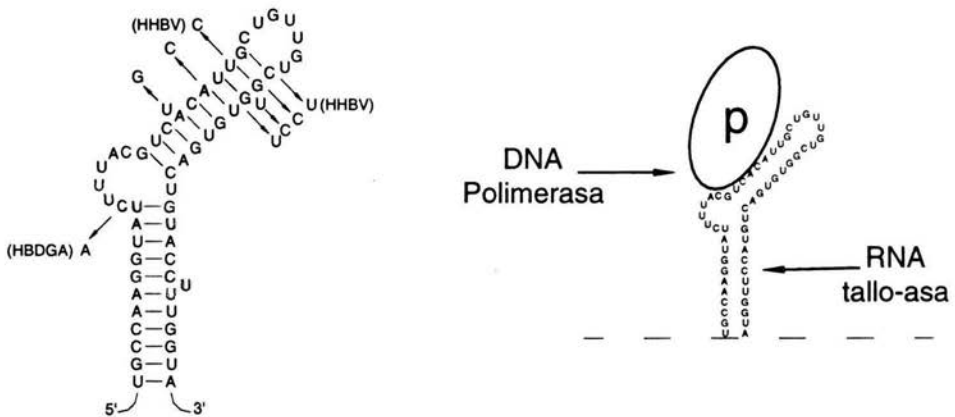
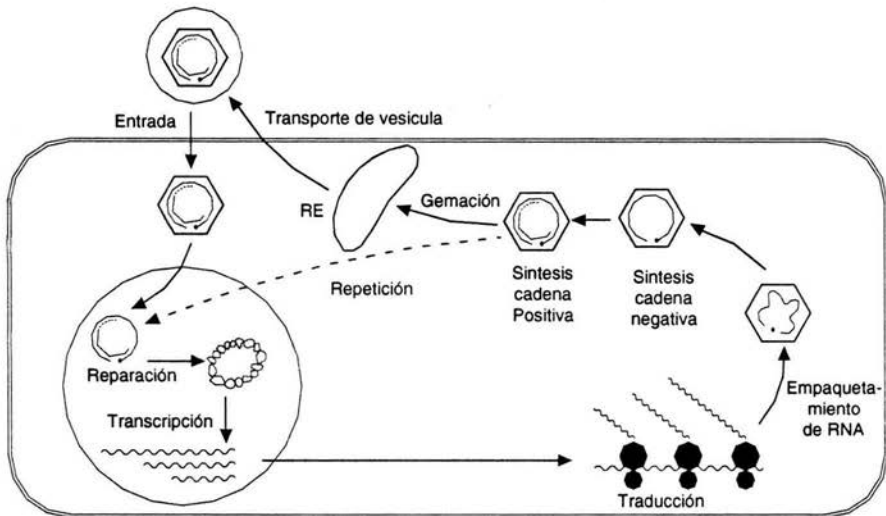


FIGURA 2.2 . Estructura del  $\epsilon$  tallo-asa ( $\epsilon$  stem-loop) de los *Hepadnaviridae*.

- **DR1:** es una pequeña secuencia de 11 a 12 nucleótidos localizada cerca del extremo 5' terminal del ARNpg.
- **Secuencia redundante terminal** (extremo 3' redundante): es una redundancia de aproximadamente 200 nucleótidos que comprende parte de la región 5' incluyendo el  $\epsilon$  tallo-asa y el DR1 (Fields y cols. 1996).
- **ADNccc:** es una forma del ADN del VHB circular covalentemente cerrada, la cual solo se presenta al momento de la reparación y transcripción del genoma viral.
- **Cap:** esta contenido en el extremo 5' del ARNm, el cual esta formado de guaninas metiladas; y desempeña diferentes funciones como son, evitar que el extremo 5' del ARNm sea digerido por nucleasas, ayuda a transportar el ARNm hacia fuera del núcleo y desempeña un papel importante para iniciar la traducción del ARNm ( Karp 1998)

## 2.2.2.4. MECANISMO DE REPLICACIÓN VIRAL

FIGURA 2.3. Ciclo de vida del VHB (Fields y cols. 1996)



- Unión y Entrada.

El VHB se adhiere de forma específica a células capaces de soportar esta replicación. Aunque los hepatocitos, son el tipo de células más efectivas para la replicación del VHB, otros sitios extrahepáticos han sido encontrados por ser capaces de soportar la replicación, pero en menor grado. Los intermediarios de replicación y/o los transcritos virales han sido encontrados en células mononucleares, en epitelio de conducto biliar, endotelio, células acinares pancreáticas y en tejido muscular liso, también se han encontrado en glándulas adrenales, gónadas, riñón, nódulos linfáticos, bazo y glándula tiroides en pacientes con infección aguda (Budkowska y cols. 1995). La adhesión

viral frecuentemente determina la especificidad del virus por el tejido y el hospedero. Sin embargo, para VHB no hay cultivos celulares primarios –hepatocitos de adultos normales y fetos humanos-viables, ya que el virus no se une a dichos cultivos, y a demás no son capaces de soportar la replicación viral (Pontisso y cols. 1989); sin embargo existen líneas celulares, como es el caso de HepG2, -que se obtienen de HCC- la cual es útil en el estudio de la replicación del virus (Terre y cols. 1991). Intentos para determinar el receptor del VHB han señalado candidatos semejantes a la apolipoproteína H (apo-H), la cual se cree que se une a la proteína SHBsAg, pero esta molécula no es una proteína integrada en la membrana del hepatocito; ya que esta proteína esta asociada con los kilomicrosomas y lipoproteínas de alta densidad, las cuales entran en los hepatocitos en el curso normal del metabolismo de lípidos, por lo que se cree que facilita la entrada del VHB de esta forma (Mehdi y cols. 1994), y la forma alterada de apolipoproteína H (alt apo-H) (Medl y cols. 1996), albúmina serica poli-humana (pHSA), fibronectina – unión vía dominio preS2- (Budkowska y cols. 1995) e interleucina-6 (IL-6) (Ryu y cols. 2000), otra proteína que se une con HBsAg, por fosfolípidos es la endonexin-2 (Fields y cols. 1996). Recientemente una proteína (gp 180) ha sido definida por interacción del receptor de unión de la célula hospedera y con el dominio pre-S1 en virus de la hepatitis B aviar (DHBV). También, se ha identificado una proteína de 80 Kd en los hepatocitos, la cual se une sobre el dominio pre S1 (Ryu y cols. 2000), que ha sido encontrada en la unión con el VHB.

- Desnudamiento o Descapsidación y Transporte al Núcleo.

Los pasos inmediatos, seguidos a la entrada del VHB no están definidos claramente. Se cree que la nucleocápside debe liberarse de las proteínas de envoltura. Otros estudios sugieren un evento proteolítico en la proteína de superficie larga (L HBsAg) produciendo la exposición de un dominio de fusión de membrana. Se cree que esto ocurre en membrana plasmática y no dentro de una vesícula ácida.

Después de la pérdida de la envoltura, se cree que la nucleocapside es transportada a la membrana nuclear. El sistema DHBV es el modelo que ha sugerido que la descapsidación del genoma del VHB ocurre en la membrana nuclear (Tutteeaman y cols. 1986).

- Reparación y Transcripción del genoma VHB.

El ADN del VHB es llevado dentro del núcleo donde es reparado a la forma covalentemente circular-cerrada (ADNccc) (Gyoo y cols. 2002, Kóck y cols. 1993). La reparación completa requiere de la doble cadena (ADNdc) removida por la estructura 5' terminal (un iniciador de ARN y la proteína polimerasa) (Fields y cols. 1996), resultando una buena unión covalente de las cadenas. La polimerasa del VHB no es requerida en este paso. A diferencia de los *retroviridae*, la replicación del VHB no requiere la integración del ADN viral en el genoma de la célula hospedera.

Una vez recircularizado, se inicia la actividad potenciadora -enhancer- y promotora generando los transcritos requeridos para la síntesis de proteínas y la generación del ARNpg. Los transcritos generados pueden ser divididos en 2 categorías: subgenómico y genómico. Los ARNs subgenómicos tienen la función exclusiva de mensajeros; para la expresión de proteína X y las proteínas de superficie (HBsAg). Los ARNs genómicos son bifuncionales, ambos sirven como moldes para la síntesis de ADN y de mensajeros para traducción de ORFs pre-C, C y P. El transcrito largo mide más de un genoma completo, sirve para la producción de las proteínas e, core y polimerasa. Un transcrito genómico particular, al cual le falta el codón de inicio AUG, para la proteína e, es llamado ARNpg por ser específicamente elegido por la polimerasa del VHB para el empaquetamiento. Se ha hipotetizado una supresión mediada por los ribosomas, puede inhabilitar al VHB para empaquetar genomas con el codon de inicio de la proteína e. Las mutaciones que inactivan este AUG permiten la encapsidación de los mensajeros largos. Las diferentes clases de transcritos virales, pueden originarse por el uso de varios promotores. Han sido identificados cuatro promotores virales, dirigiendo la expresión de: ARNs genómico (pre-C y C), ARNm para proteína L, ARNm para proteína M y S, y ARNm para proteína X (Gyoo y cols. 2002, Seeger y cols. 1986, Su y cols. 1989).

- Ensamblaje de Nucleocápside.

Los niveles altos de expresión de las proteínas de core pueden producir la formación de la nucleocapside (vacía), sin la información genética contenida dentro de esta (Birnbbaum y cols. 1990, Miyahara y cols. 1986). Se cree que la unión de la proteína polimerasa a una estructura de tallo-asa resulta en la encapsulación del ARNpg (Tavis y cols. 1998, Hirsch cols. 1990). La delección del C-terminal de la proteína polimerasa permite la unión de la polimerasa al tallo-asa, pero previene la encapsulación. Se cree que el C-terminal de la polimerasa está involucrado en la interacción con proteína del core de hepatitis B (Köck y cols. 1993). En los *Hepadnaviridae*, solo la polimerasa unida a los tallo-asa es empacada por las proteínas de core.

- Síntesis de ADN viral de VHB.

La transcripción reversa del ARNpg ocurre después de que las proteínas del core se unen a la polimerasa (Pollack y cols. 1994). Se cree que la transcripción reversa/replicación del ADN, inicia al mismo tiempo que la encapsidación (Tavis y cols. 1994).

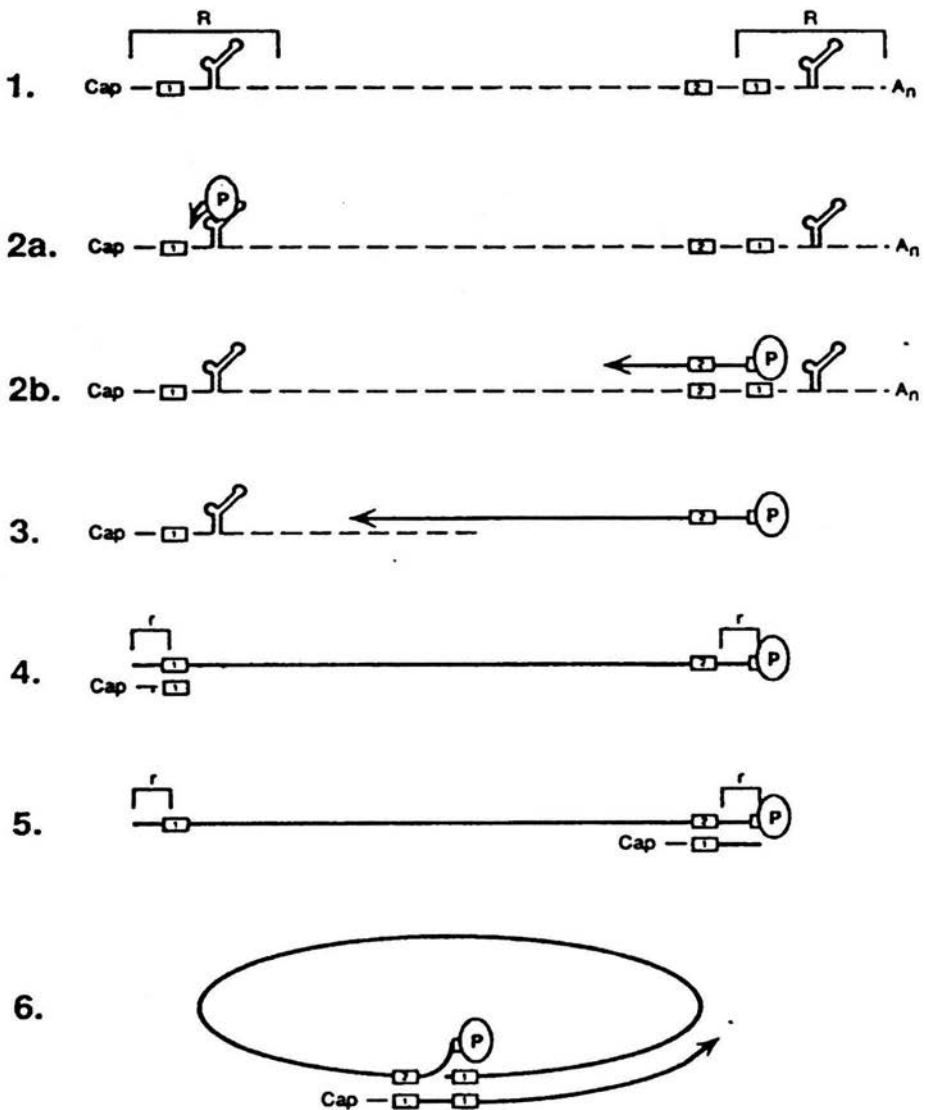
El complejo mecanismo empleado por el VHB para la conversión del ARNpg en ADN de doble cadena (ADNdc) está bien caracterizado. La transcripción de ARNpg resulta en la generación de una cadena de ARN con el extremo 3' redundante. La redundancia, de aproximadamente 200 nucleotidos comprende redundancias de la región 5' incluyendo el  $\epsilon$  tallo-asa y una pequeña secuencia de 11 a 12 nucleotidos llamada DR1. Otra copia de DR1 está localizada cerca del extremo 3' terminal del ARN y es llamada DR2, ver Esquema 2.1 paso 1. Con la unión de la polimerasa inicia la transcripción reversa del molde ARNpg por 3 a 4 bases antes del DR1. La proteína polimerasa en este momento esta sujeta covalentemente sobre la cadena de ADN negativa en crecimiento. La polimerasa sirve como un iniciador cuando comienza la transcripción reversa. (Tavis y cols. 1994, Gyoo y cols. 2002, Seeger y cols. 1986), ver Esquema 2.1 paso 2a.



La polimerasa usa el  $\epsilon$  tallo-asa como molde para iniciar la transcripción reversa. Los cuatro nucleótidos copiados, son idénticos a cuatro nucleótidos localizados en la región DR1. Este pequeño segmento de ADN puede ser transferido a la secuencia DR1 del extremo 3' y la transcripción reversa puede continuar por los mecanismos de elongación conocidos, ver Esquema 2.1 pasos 2b y 3. La transcripción reversa del ARNpg genera la cadena de ADN negativa, la cual tiene extremos redundantes iguales a el ARN que se utilizó como molde (Tavis y cols. 1994, Gyoo y cols. 2002).

Cuando se genera el ADN negativo, el molde de ARN es degradado por la actividad de RNasa H de la polimerasa. Sin embargo, el cap de 15 a 18 oligoribonucleótidos en el extremo 5' terminal del ARN permanece sin degradarse y sirve como iniciador para la síntesis de la cadena de ADN positiva, ver Esquema 2.1 paso 4. Este ARN iniciador y los pares de bases se mueve para aparecer con la región DR2 del extremo 5' en la cadena de ADN negativa. Se cree que este paso puede ser facilitado por proteínas no identificadas (Tavis 1994, Gyoo 2002, Lien 1986), ver Esquema 2.1 paso 5.

Una vez translocado el iniciador, se inicia la síntesis de la cadena de ADN positiva y continua hasta el extremo 5' terminal de la cadena de ADN negativa. Para completar la síntesis de la cadena de ADN positiva se requiere una transferencia intramolecular de la cadena de ADN negativo dando acceso a la porción no copiada de la cadena. Este proceso es facilitado por la secuencia redundante terminal encontrada en la cadena negativa. Típicamente, la cadena de ADN positiva no es completada hasta la entrada del virus a otra célula hospedera. Esto da como resultado que en los viriones se observe el característico segmento de ADN de cadena sencilla propio de los *Hepadnaviridae.*, ver Esquema 2.1 paso 6. Una propuesta es que los eventos de replicación/transcripción reversa no pueden terminarse con el virión ensamblado debido a impedimento estérico; alternativamente se ha sugerido que esto se debe a la falta de precursores en la célula. De cualquier manera la existencia de los genomas incompletos de ADN/ARN esta una característica típica de esta familia (Gyoo y cols. 2002, Tavis y cols. 1994, Kock y cols. 1993, Enders y cols. 1987 ).

ESQUEMA 2.1. Mecanismo de Transcripción Reversa de los *hepadnavirus* (Tavis 1994).

Esquema 2.1. El ARNpg (paso 1 líneas punteadas) el cual presenta el cap y esta poliadenilado con una redundancia larga terminal (R). La localización de DR1 y DR2 es indicada por cajas numeradas; el  $\epsilon$  tallo-asa y el ARNpg están empaquetados dentro del core con la polimerasa (ovalado P). La interacción del DR1 en el extremo 3' con P inicia la transcripción reversa (paso 2). P inicia la transcripción reversa en el extremo 5' con el tallo-asa; extendiendo la cadena negativa de ADN (línea continua) por tres a cuatro nucleótidos (paso 2a). Entonces P y el ADN covalentemente generado son transferidos al extremo 3' con el DR1 (paso 2b), para que se lleve a cabo la extensión del ADN. El ARNpg es degradado por la actividad de RNAasaH de la polimerasa (paso 3) hasta que P alcanza el extremo 5' del molde, donde esta deja un oligomero de ARN alineado con la copia en el extremo 5' que es una duplicación terminal pequeña semejante a la cadena de ADN negativa (r, paso 4). El oligomero de ARN es transferido a DR2, donde este inicia la síntesis de la cadena de ADN positiva (línea continua pequeña paso 5). Durante la elongación, una transferencia del segundo molde circulariza el genoma y la cadena positiva es extendida por una longitud variable (paso 6) para la producción de un ADN de un virus nuevo (Tavis 1994 y cols.).

- Gemación y Secreción del Virión Maduro y Partículas No Infecciosas.

Debido a la variable cantidad de transcritos de las diferentes proteínas de superficie, son producidas mucho más proteínas de superficie pequeñas (SHBsAg) y medianas (MHBsAg), en comparación con la proteína larga de superficie (LHBsAg). Cuando el dominio S contiene varias secuencias transmembranales, estas proteínas son co-transladadas dentro del retículo endoplasmático (RE). Las proteínas HBs se agregan en regiones del complejo de Golgi, en un proceso en el cual las proteínas del hospedero son excluidas del complejo. Las regiones con alta concentración de las proteínas SHBsAg y con un mínimo de MHBsAg son capaces de gemar dentro del lumen del RE para producir las partículas de 22nm. Las proteínas LHBsAg raramente están contenidas dentro de las partículas de 22nm, ya que son retenidas en RE (Cheng y cols. 1986).

Se cree que la nucleocápside completa se asocia con áreas del Golgi de alto contenido de la proteína de superficie. Se piensa que LHBs interactúa con Hbc en el lado citoplasmático del Golgi, jalando las nucleocápsides dentro de las vesículas en formación, generando las partículas recubiertas de 42nm las cuales son excretadas por exocitosis.

Las tres proteínas de envoltura son expresadas mejor en membranas intracelulares que en la superficie de la célula. Una característica importante de los viriones, es la cantidad relativamente alta de la proteína L; en una buena preparación la proporción es de subunidades L:M:S es aproximadamente de 1:1:4 (Fields y cols. 1996).

### 2.2.3. EPIDEMIOLOGÍA

*La ignorancia no es una buenaventuranza, sino inconciencia y esclavitud; solo la inteligencia nos puede hacer partícipes en la construcción de nuestros destinos.*

*John Dewey.*

El VHB causa hepatitis aguda, crónica y es un agente etiológico para carcinoma hepatocelular primario (HCC) (Ryu y cols. 2000).

La infección por VHB es una de las causas más comunes de viremia crónica con un estimado de 200 a 300 millones de portadores a nivel mundial (Ryu y cols. 2000, Urban y cols. 1998, Pawlowsky y cols. 2000), favoreciendo el mantenimiento de la cadena de transmisión. Este virus es considerado como el segundo carcinógeno humano conocido, después del tabaco, siendo la causa de hasta el 80% del Carcinoma Hepatocelular Primario. A nivel mundial se presentan más de 250 mil muertes anuales asociadas con el VHB por hepatitis fulminante y cirrosis (Cheng y cols. 1986). De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud: la Hepatitis B continúa siendo un problema mayor de salud pública en las Américas, con casi 400 mil infecciones nuevas cada año (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2001).

En regiones de endemia intermedia, como Europa oriental, la región Mediterránea, Unión Soviética, Oriente Medio y Latinoamérica, entre 20 y 55% de la población adulta ha estado expuesta a la enfermedad y de 0.5 a 7% son portadores. Un 90% de la población afectada son niños (Urban y cols. 1998). La infección en niños es más común en regiones de endemia intermedia que en las de

endemia reducida. Los niños afectados con hepatitis B tienen más probabilidad de convertirse en portadores y corren mayor riesgo de presentar, más adelante, cirrosis o cáncer hepático. Los recién nacidos expuestos al virus a través de sus madres al momento de nacer, suelen más tarde (a los 20 o 30 años de edad) presentar lesión hepática crónica y muchos mueren debido a cáncer hepático.

Para la hepatitis B no se conoce reservorio en animales inferiores; los seres humanos constituyen el reservorio y el vector, por lo que se dice que es una infección específica de especie (Ryu y cols. 2000); aunque se ha encontrado esta infección en otras especies (MacDonald y cols. 2000, Noppompanth y cols. 2003). El virus se disemina directamente de persona a persona, sobre todo a través de portadores crónicos, individuos en los que se detecta el antígeno de superficie del VHB en dos determinaciones distintas separadas por un período mínimo de seis meses (Poo y cols 2001). La ruta de diseminación más eficiente del virus de la hepatitis B es la percutánea; en donde el virus puede transmitirse por medio de sangre o de productos sanguíneos contaminados. La transmisión perinatal y la diseminación a través de mucosas o por transmisión sexual son de baja eficiencia, generalmente requiere altas cantidades del virus. Normalmente se encuentran altas concentraciones del VHB en sangre y en hígado.

El virus también ha sido detectado en una variedad de secreciones corporales y excreciones, incluyendo semen, saliva –recientemente se han reportado casos de infección de VHB por mordedura con una alta prevalencia en dentistas y miembros de familias de pacientes con VHB lo que sugiere la propagación por este fluido- o fluidos nasofaríngeos, y fluidos menstruales (Noppompanth y cols. 2003). Por heces no ha sido demostrado el origen de la infección, presumiblemente por que el virus es inactivado por enzimas presentes en la mucosa intestinal o derivadas de bacterias de flora normal. El virus algunas veces esta presente en orina, pero esta presencia tiene un límite epidemiológico importante, excepcionalmente puede ocurrir cuando hay una infección crónica y se ha encontrado HBsAg positivo en orinas de pacientes urémicos dentro de la hemodiálisis. Se ha detectado HBsAg en bilis y jugo pancreático, pero no en jugo gástrico. También han sido positivos para HBsAg: el fluido pleural, fluido de ascitis, fluido cerebroespinal, lagrimas, leche materna; por lo que asumimos que todos los fluidos biológicos de pacientes infectados con VHB pueden ser infecciosos y capaces de transmitir VHB, especialmente en una

situación en la cual hay exposición de membranas mucosas o percutaneas (Fields y cols. 1996). La transmisión por contacto sexual y exposición parenteral -transmisión de madre a hijo-, es responsable de un alto grado de endemia en varias regiones del mundo; el 25 al 50% de los pacientes con hepatitis crónica resultan por transmisión vertical u horizontal por exposición nosocomial en la infancia (Noppompanth y cols. 2003).

La zoonosis no esta confirmada aun, pero se sabe que es similar a la transmisión zoonotica del virus de inmunodeficiencia humana VIH (Noppompanth y cols. 2003).

**TABLA 2.2. Pacientes en riesgo de contraer hepatitis B** (Méndez 1999).

<b>Pacientes en riesgo</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Personas con síntomas de hepatitis</li> <li>• Personas con elevación en la concentración de enzimas hepáticas</li> <li>• Contacto sexual con portadores identificados de VHB</li> <li>• Personas sexualmente activas con parejas múltiples</li> <li>• Personas que usen drogas intravenosas</li> <li>• Pacientes con hemodiálisis</li> <li>• Pacientes de instituciones para discapacitados mentales</li> <li>• Trabajadores de la salud expuestos a sangre o a sus productos</li> <li>• Recién nacidos de madres VHB-positivos (se recomiendan pruebas diagnósticas en mujeres embarazadas)</li> <li>• Personas con punción accidental con agujas</li> <li>• Personas con tatuajes o perforaciones corporales</li> <li>• Pacientes hemofílicos de transfusiones sanguíneas o de productos de sangre antes de 1990</li> </ul>

La clasificación genética del VHB se basa en la comparación del genoma completo, habiéndose definido seis genotipos; A,B,C,D,E,F (Mbayed y cols. 1998, Arauz-Ruiz y cols. 1997,). Los genotipos A y D están extensamente distribuidos en el Viejo Mundo, los genotipos B y C están confinados en el Este de Asia; el genotipo E en África (sub-Sahara). El genotipo F, que codifica para el subtipo adw4, es originario del Nuevo Mundo – en gente indígena del Centro y sur de America-. En un estudio reciente en América Central; de 90 cepas de VHB investigadas, el 71% corresponde al genotipo F, el 14% al genotipo A y los genotipos D y C el 6% y 1% respectivamente (Arauz-Ruiz y

cols. 1997, MacDonald y cols. 2000). La heterología serológica se basa en un determinante antigénico en común, "a", y dos pares de determinantes exclusivamente mutantes, "d/y", y "w/r", identificando cuatro subtipos de HBsAg; y son: adw, ayw, adr y ayr, aunque en una búsqueda posterior se definieron nueve subtipos (Arauz-Ruiz y cols. 1997).

#### 2.2.4. SÍNDROMES CLÍNICOS

*La vida es una constante búsqueda del equilibrio.*

*Anónimo.*

La evolución clínica de la hepatitis B puede ser muy variable, desde una infección asintomática, anictérica, que ocurre en la mayoría de los casos, hasta una enfermedad aguda, que en algunas ocasiones se complica evolucionando hacia la cronicidad, la cirrosis o al carcinoma hepatocelular (Maldonado-Jimenez 1998, Enders y cols 1987, Urban y cols 1998).

La infección del VHB se caracteriza por un largo período de incubación y un inicio insidioso. Entre los síntomas del período prodrómico se encuentra la fiebre, malestar y anorexia; seguidos de náuseas, vómitos, malestar abdominal, fiebre y escalofríos. Se desarrollan con rapidez los síntomas más clásicos indicando daño hepático ictericia, coluria y acolia.

Muchos pacientes con VHB tienen pocas manifestaciones clínicas de enfermedad hepática, si es que tienen alguna. Sin embargo la mayoría de los pacientes admiten tener fatiga o un malestar no específico que atribuyen a otras causas (Poo y cols 2001).

Puede existir infección viral sin Hepatitis, sin daño al hígado, pueden presentarse anticuerpos contra VHB e incluso partículas virales (carga viral positiva) en sangre, con transaminasas normales y por lo tanto el hígado no está inflamado. Esta condición se atribuye a un fenómeno de tolerancia del organismo a la presencia del VHB (parecido a un estado de coexistencia pacífica). Al realizar biopsia a estos pacientes sólo se encuentran cambios mínimos (Poo y cols. 2001).

Hepatitis aguda viral se divide en cuatro fases clínicas: a) período de incubación -tiempo comprendido entre la exposición y el primer día de síntomas o ictericia-, b) período prodrómico o estado de pre-ictericia, c) fase de ictericia y d) período de convalecencia.

El período de incubación para la hepatitis viral tipo B es de 45 a 160 días en la mayoría de los casos (Maldonado-Jimenez 1998). Los factores determinantes para ocasionar infección con el VHB son: a) la medida del inóculo, b) la vía de infección, c) la coinfección con otros agentes causantes de hepatitis, d) alteración de patogenicidad viral por medios físicos y químicos, e) interacciones inusuales entre virus-hospedero y f) la concurrente administración de anticuerpos específicos.

La fase prodrómica es corta y varía desde algunos días hasta semanas, y en la mitad de los pacientes se caracteriza por poca fiebre, fácilmente se fatigan, malestar, anorexia, mialgia, náusea, y vómito.

En fase de ictericia el paciente presenta una apariencia amarillenta, la orina presenta una coloración de dorada-café, las bilirrubinas se elevan, con deposiciones pálidas y las mucosas membranales presentarán decoloración (amarillentas). Esta etapa empieza diez días antes de iniciados los síntomas. La ictericia aparece clínicamente, cuando los niveles de bilirrubinas totales se encuentran entre los 2 – 4 mg/dL, la fiebre está presente y usualmente permanece los primeros días de ictericia. El examen físico del paciente con hepatitis aguda muestra dolor a la palpación o percusiones en el hígado. Ocasionalmente, durante la etapa aguda de la infección por VHB, ocurre una necrosis importante del hígado conduciendo a un daño severo en los procesos de síntesis hepática, función excretora y mecanismos de detoxificación; este daño hepático se conoce como hepatitis fulminante si ocurre durante las primeras 8 semanas de la enfermedad, es caracterizada por un inicio repentino de fiebres altas, un marcado dolor abdominal, vómito e ictericia, seguido del desarrollo de encefalopatía hepática asociada con un coma profundo y convulsiones, ascitis, diátesis hemorrágica, disfunción renal y rigidez conduciendo a la muerte en un 70 a 90 % de los pacientes (Fields y cols. 1996). Otros síntomas comunes son, el bajo deseo de tomar alcohol o fumar, malestar y ocasionalmente dolor de cabeza (Poo y cols 2001).



Hepatitis viral crónica. Algunos de los pacientes con infección crónica, pueden no tener evidencia clínica y bioquímica de enfermedad en hígado. Aunque frecuentemente son categorizados como portadores asintomáticos de hepatitis B o simplemente portadores de HBsAg, estos pacientes presentan **facilidad para fatigarse**, ansiedad, anorexia, malestar y se quejan notablemente. Los niveles de transaminasas, bilirrubinas y gammaglobulinas son marcadores que se elevan de forma lenta. Posteriormente puede haber una serie de remisiones y recaídas. Las remisiones pueden ser largas, de pocos meses a varios años. Durante una recaída, la aminotransferasa puede ser un marcador elevado así como las bilirrubinas y puede presentarse ictericia.

La predicción y progresión de cirrosis incluye descompensación hepática, con episodios repetidos de exacerbaciones agudas severas y/o elevados niveles de alfa-fetoproteínas (más de 100ng/mL), junto con liberación de HBeAg. La cirrosis se caracteriza anatómicamente por la presencia de nódulos en el hígado, combinado con fibrosis. Estos nódulos excesivos y fibrosis resultan en una distorsión de la arquitectura normal del hígado e interfiere con el fluido sanguíneo a través del hígado (Poo y cols. 2001).

Carcinoma Hepatocelular (HCC). Esta forma de enfermedad es adquirida después de un tiempo prolongado de infección con Hepatitis B crónica. Los eventos que desencadenan el desarrollo de esta enfermedad son actualmente desconocidos (Maldonado-Jimenez 1998, Enders y cols 1987, Urban y cols 1998).

## 2.2.5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

*Investigar es ver lo que otros ven, pero pensar lo que otros no piensan.*

*Hans Krebs*

Para el Diagnóstico de laboratorio de la Hepatitis B se analizan 3 aspectos.

- I. Evaluación Bioquímica.
- II. Marcadores Serológicos Virales
- III. Evaluación Histológica.

I. Evaluación bioquímica. En esta sección se incluyen estudios generales y estudios específicos del hígado, comúnmente conocidos como pruebas de función hepática.

### Estudios generales.

Incluyen por lo menos una biometría hemática, química sanguínea y examen general de orina, que permiten detectar padecimientos asociados como la anemia, diabetes, trastornos renales o infecciones, entre otros.

### Estudios específicos del hígado.

A. *Pruebas de función del Hígado.* Incluyen la determinación de bilirrubina, albúmina y el tiempo de protrombina. La primera evalúa la función o capacidad excretora del hígado. La bilirrubina esta dividida en directa e indirecta. Poniendo mayor interés en la directa la cual se eleva cuando hay obstrucción de los conductos biliares o inflamación y necrosis de células hepáticas, junto con la fosfatasa alcalina (Poo y cols. 2001). La bilirrubina ha sido utilizada como exploración colectiva en las epidemias de hepatitis (Henry 1993).

B. *Pruebas de inflamación.* Las aminotransferasas (transaminasas) son un indicador altamente sensible en el daño hepatocelular; la alanina aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotrasferasa (ASAT) o también llamadas glutámico pirúvica (TGP) y glutámico oxaloacética (TGO) respectivamente, enzimas del hígado que participan en procesos metabólicos fundamentales. En el caso de la hepatitis viral los niveles de ALAT son significativamente más altos que los de ASAT. ALAT se eleva bruscamente y suele bajar sin meseta a valores de 100 – 400 U/L, en cuyo margen de actividad fluctúa durante tiempos variables. Pueden también producirse subidas y bajadas en montaña rusa, en tanto persista el agente causal. Cuanto más tiempo permanezca elevada la ALAT, más probable es que se desarrolle la cronicidad (Henry 1993). Otras enzimas que pueden elevarse cuando hay destrucción de células son la gama glutamiltranspeptidasa (GGT) y la lactatodeshidrogenasa (LDH) (Poo y cols. 2001, Fields y cols. 1996, Maldonado-Jimnez 1998).

Los niveles de bilirrubina en suero y la actividad de ALAT, a demás de los marcadores virales, son las mejores guías en el laboratorio para seguir el curso de la enfermedad (Henry 1993).

C. *Pruebas de regeneración.* El estudio que indica el nivel de regeneración es la alfa-fetoproteína, producida por los tumores. Esta simple determinación puede ayudar a detectar en forma temprana un tumor hepático (Poo y cols. 2001), por lo que los portadores de HBsAg deben ser vigilados anualmente para su reconocimiento precoz (Henry 1993)

## II. Marcadores virales.

En esta sección se incluyen las pruebas serológicas capaces de detectar marcadores útiles, para la identificación del virus, estos marcadores pueden ser de 2 tipos:

- a) Indirectos: ejem. anticuerpos específicos, producidos por células inmunes en respuesta a la estimulación antigénica viral;
- b) Directos: ejem. Antígenos virales y genoma, componentes del virión o producidos durante la replicación.

Estas pruebas son necesarias para definir: si la infección está presente; en ese caso, si es aguda o crónica; en caso de ser crónica, si es replicativa o no replicativa; y finalmente, si no hay infección, si el anticuerpo protector existe o no.

### a) Marcadores Indirectos:

- **Anticuerpo anti-HBc.** Se trata del primer anticuerpo en aparecer en la enfermedad, siendo ya detectable con los primeros síntomas de la enfermedad en la fase aguda o en la crónica. La positividad de anticuerpos de la clase IgM frente a este marcador (anti-HBc IgM), se interpreta como indicador de infección aguda reciente. Hoy se sabe que no sólo existe IgM específica frente al "core" en las fases agudas sino que también es detectable en los casos de enfermedad crónica con replicación viral y lesión hepática, aunque la concentración de esta clase de anticuerpos es menor que la encontrada en las fases agudas.

Cuando se detecta IgM Anti-HBc con HBsAg negativo los resultados de esta prueba son inseguros porque puede ser que se trate de una infección en curso o una infección pasada, por lo que es recomendable la determinación del HBeAg y la carga viral (ADN-VHB) para un diagnóstico adecuado (Gerlich 1980).

- **Anticuerpo anti-HBe.** La aparición de anticuerpos anti-HBe en el curso de una infección aguda indica generalmente buena evolución y baja infectividad del paciente. En la mayoría de los casos son detectables poco antes de desaparecer el HBsAg, pudiendo encontrarlo positivo durante varios años después de la infección. En los casos de hepatitis crónica en los que coexiste con HBsAg suele indicar escasa actividad replicativa de la enfermedad viral, coincidiendo casi siempre con diagnósticos histológicos de hígado "normal" (portador asintomático) o hepatitis crónica persistente. (Maldonado-Jimenez 1998, Microbiología Clínica en la WWW. Virología.).
- **Anticuerpo anti-HBs.** Es el indicador de la recuperación de la enfermedad, último marcador en aparecer, haciéndolo generalmente a los tres meses de evolución de la enfermedad. Persiste durante mucho tiempo, neutralizando al virus y confiriendo protección. En los individuos vacunados es el único marcador presente (Maldonado-Jimenez 1998, Henry 1993).

#### b) Marcadores Directos:

- **HBsAg.** este antígeno se encuentra en el citoplasma del hepatocito y en la sangre durante el periodo de incubación, la fase aguda de la enfermedad y en el estadio crónico. Este marcador es la primera elección en el diagnóstico de la enfermedad por hepatitis B (Paulij y cols. 1999). El título de HBsAg va aumentando y llega generalmente a su máximo cuando comienzan a elevarse los niveles sericos de aminotransferasas. Al producirse la mejoría clínica y disminuir los niveles de aminotrasferasas, descienden los títulos de HBsAg, que mas tarde desaparecen. El título máximo de HBsAg determina aproximadamente el plazo en el que se halla presente el antígeno durante la fase de recuperación: si se alcanzan títulos elevados en un período temprano, el HBsAg persistirá durante más tiempo que si los títulos iniciales son bajos, ver Grafico 2.1 (Henry 1993). Si la evolución es favorable, desaparecerá a los 3 ó 6 meses de la enfermedad; por el contrario el mantenimiento de títulos elevados durante más de 6-8 semanas es indicio de mal pronóstico y de evolución a la cronicidad. La positividad de este marcador más allá del sexto mes de infección, define la situación clínica de hepatitis crónica (Heermann y cols. 1984).

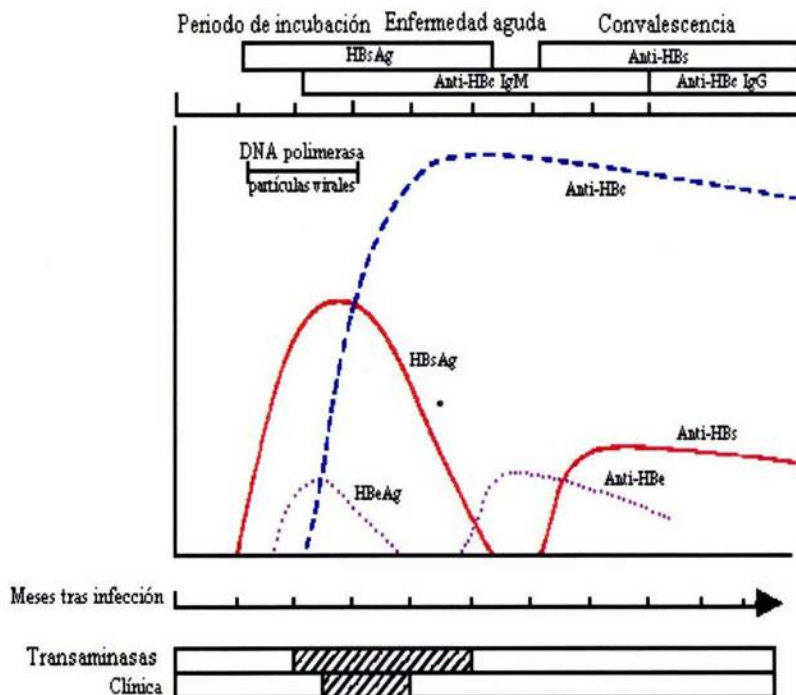
- **HBeAg.** este antígeno a diferencia de los otros se encuentra escondido en el interior del virión, su valor clínico se funda en su excelente correlación con la presencia de replicación viral y viremia. El HBeAg aparece poco después que el HBsAg, habitualmente antes de la elevación máxima de aminotrasferasas. La desaparición de HBeAg se produce pronto, en general antes que la del HBsAg, y va seguida de una seroconversión a anti-HBe; esta progresión suele indicar un buen pronóstico para que el paciente se recupere de la infección aguda. Los individuos que progresan desde la Hepatitis B aguda hacia el estado de portador crónico no experimentan la seroconversión de HBeAg a anti-HBe durante la fase aguda de la infección, ver Grafico 2.1 (Henry 1993). En algunas ocasiones este marcador debe ser manejado junto con anti-HBe y ADN-VHB para poder valorar la respuesta inmune frente a las proteínas del virus y la viremia ya que por si sólo no permite predecir con certeza la presencia o no de replicación viral (Heermann y cols. 1984, Microbiología Clínica en la WWW. Virología.).
- **HBcAg.** Es secretado a la sangre durante la replicación viral, este antígeno no se detecta en sangre durante la hepatitis aguda, pero el anticuerpo frente a este antígeno aparece poco después del HBsAg, aunque antes del comienzo de los síntomas y asciende rápidamente con el transcurso del tiempo. Este es un marcador serológico solo se presenta cuando existe partículas de Dane (Miyanojara y cols. 1986, Henry 1993).

#### Interpretación de los Marcadores Serológicos

El perfil de los marcadores serológicos en la infección aguda está claramente definido y permite seguir en cada paciente la evolución de la infección, ver Grafico 2.1. A las 6 semanas después de la infección viral se detectan HBsAg y marcadores de replicación viral activa (HBeAg y ADN HBV). Estos marcadores permanecen positivos durante toda la fase prodrómica y al inicio de la fase clínica.

A los 4-6 meses suele desaparecer HBsAg y aparece anti-HBs. Este anticuerpo se asocia con la recuperación de la infección por VHB y con la inmunidad a la reinfección por este virus. Igualmente anti-HBs puede no detectarse en algunos pacientes de manera inmediata tras la desaparición de HBsAg, existiendo un intervalo de varios meses hasta la aparición de anti-HBs.

HBeAg aparece durante todo periodo de replicación activa del HBV. Aparece simultáneamente o a los pocos días de aparecer HBsAg y declina en paralelo con HBsAg siendo reemplazado con un pico de anti-HBe al comienzo de la recuperación clínica. Estos anticuerpos, anti-HBe, persisten 1-2 años tras desaparecer la infección aguda por hepatitis B.



**GRAFICO 2.1. Perfil de los marcadores serológicos.** Aparición de los diferentes marcadores serológicos durante el curso de la enfermedad, relacionados con la presencia de los signos y síntomas y la elevación de las transaminasas. Los marcadores virales son detectables antes de que aparezcan los síntomas de la elevación de ALAT o ASAT; siendo los marcadores mas precozmente detectables el HBsAg, HBeAg y ADN VHB. La ALAT se eleva poco antes de la aparición de los síntomas prodrómicos. La IgM anti-HBc es detectable cuando el paciente es examinado por primera vez. El HBsAg es detectable de 1 a 15 semanas después de la iniciación de los síntomas. El HBeAg y el ADN VHB deben desaparecer poco tiempo después del punto máximo de actividad de ALAT. El anticuerpo contra HBsAg se hace mesurable tarde, en la convalecencia. (Henry 1993).

**TABLA 2.3. Marcadores serológicos de la hepatitis B en diferentes fases de la infección (Microbiología Clínica en la WWW. Virología.).**

Fase de la infección	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc		HBeAg	Anti-HBe
			IgG	IgM		
Periodo de incubación tardío	+	-	-	-	+/-	-
Hepatitis aguda	+	-	+	+	+	-
Hepatitis aguda HbsAg-negativa	-	-	+	+	-	-
Portador HbsAg sano	+	-	+++	-	-	+
Hepatitis B crónica replicativa	+	-	+++	+/-	+	-
Hepatitis crónica mínimamente replicativa	+	-	+++	-	-	+
Infección HBV pasada reciente	-	++	++	+/-	-	+
Infección VHB pasada distante	-	+/-	+/-	-	-	-
Vacunación reciente	-	++	-	-	-	-

- Viremia que es la presencia del virus en sangre periférica. En la practica, el material genético viral es usado para la evaluación de cantidades de virus en suero o plasma. La carga viral es la cantidad de virus circulante o número de copias del genoma viral por



volumen de suero o plasma, esta prueba es uno de los marcadores más fiables para el monitoreo de la infección y la evaluación de la respuesta a la terapia antiviral (Gerken y cols. 1998, Pawlotsky y cols. 2000) y juega un rol importante en la diferenciación del diagnóstico en combinación con marcadores serológicos específicos de VHB (Berger y cols. 1998).

- Datos recientes basados en un modelo matemático de dinámicas de replicación, han mostrado que la determinación de carga viral es una estimación exacta del índice de producción del virión en el hígado.

Esta prueba es de utilidad en dos tipos de pacientes: a) Portadores crónicos con HBsAg positivo y con un bajo grado de replicación viral o sin el y pruebas de funcionamiento hepático normales; b) Pacientes con hepatitis B crónica, replicación activa y enfermedad de hígado progresiva, con riesgo de cirrosis y HCC (Pawlotsky y cols. 2000, Chen y cols. 2000). El VHB puede estar presente en niveles muy elevados en sangre hasta de  $1 \times 10^{13}$  viriones por mililitro en pacientes con HBeAg positivo (Noppompanth y cols. 2003).

Los valores de carga viral son reportados en valores logarítmicos, ya que dichos cambios solo son significativos cuando existe un aumento o disminución de un logaritmo a otro. Este término matemático denota un cambio en el valor de lo que está siendo cuantificado por un factor de 10. Por ejemplo, si la carga viral inicial por PCR fue de 20,000 copias/mL de plasma, luego un aumento de 1 registro equivale a un aumento de 10 veces o 200.000 copias/mL de plasma. Cualquier cambio de menos de la mitad del registro se considera insignificante. Más sencillamente, si la carga viral no se ha triplicado o ha descendido a un tercio de su nivel anterior, la diferencia no es importante. Por ejemplo, si la primera carga viral fue de 20.000 copias, un aumento a 60.000 o una caída a 7.000 copias puede ser el resultado de cambios transitorios. Dos factores son los responsables de esta variabilidad: el primero es la variabilidad biológica natural diaria de la carga viral en una persona, la cual hace que los investigadores consideren tomar su decisión clínica basada en los cambios en

la carga viral deben basarse en muestras tomadas 2-3 semanas aparte. El segundo factor es la variabilidad intrínseca de las pruebas que normalmente tienen coeficientes de variación en el intervalo del 0.25 de un logaritmo.

Dos categorías de técnicas de amplificación de ADN, para conocer la carga viral en pacientes infectados con VHB, son las más utilizadas:

-Técnicas de amplificación de señal.

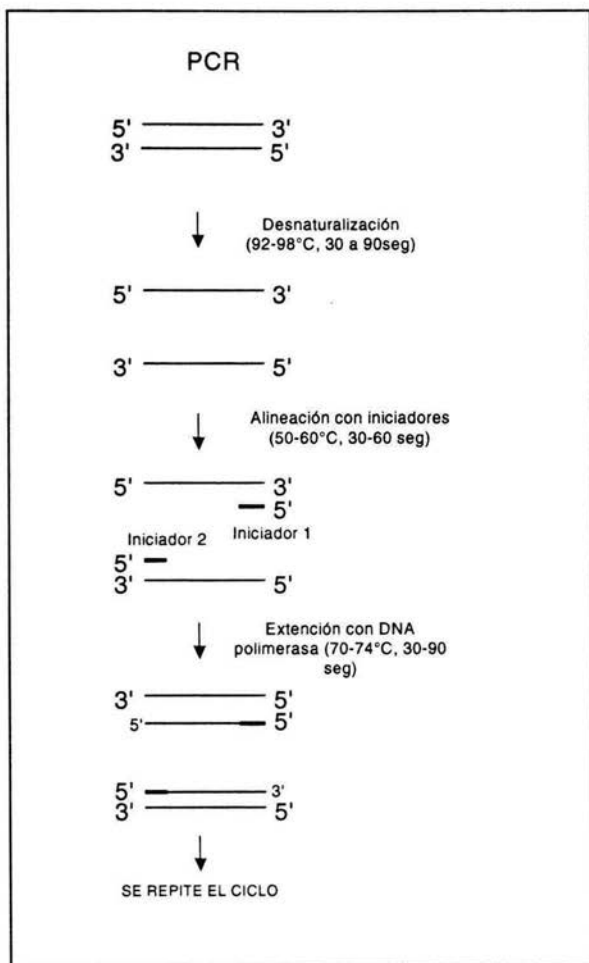
El genoma viral puede ser detectado y/o cuantificado en suero o plasma por medio de técnicas basadas en hibridación, como son la hibridación directa en membrana –Hibridación en dot-blot -, método de hibridación en fase líquida y el método de amplificación ADNc (Hwang y cols 1996, Chen y cols 2000, Gerken y cols 1998, Pawlotsky y cols. 2000), en la cual el genoma viral es capturado por sondas específicas y la presencia de híbridos genoma-sonda es revelado por una reacción enzimática calorimétrica o luminiscente, emitiendo una señal. En algunos casos, una amplificación adicional es necesaria para poder detectar y cuantificar muy pequeñas cantidades de genoma viral circulante. La cuantificación es realizada por comparación con una curva estándar establecida en cada corrimiento (Karp 1998, Tamarín 1996).

-Técnicas por amplificación del material genético.

En estos ensayos, un gran número de copias genómicas virales son sintetizadas químicamente en una reacción enzimática cíclica, las cuales después serán detectadas, para poder ser cuantificadas. La técnica mejor conocida es La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual amplifica un segmento de ADN flanqueado por dos regiones de secuencia conocida, requiriendo la presencia de un iniciador para copiar la cadena que le sirve de molde, y por medio de la enzima Taq DNA polimerasa realiza la síntesis de ADN. Este proceso tiene la capacidad de formar híbridos dependiendo de la temperatura: a altas

temperaturas el ADN se desnaturaliza permaneciendo en forma de cadena sencilla y al bajar la temperatura puede reasociarse formando híbridos (Hoelzel y cols. 1998, Karp 1998, Barrera y cols. 1993) ver Esquema 2.2. En la práctica suelen obtenerse entre 2 y 50 millones de copias a partir de 2 o 3 cadenas originales. Hoy en día, la cuantificación del genoma viral por PCR es "competitiva", basadas en comparación con una curva estándar establecida en cada corrimiento y para la cuantificación se conocen la cantidad de copias genómicas contenidas en el estándar (Hoelzel y cols. 1998). Existen métodos comerciales muy efectivos como es el caso de Roche Amplicor HBV Monitor™ (Gerken y cols. 1998, Nagata y cols. 1999, Lefrere y cols. 1999, Pawlotsky y cols. 2000), ver Tabla 2.4; pero con un costo muy alto. Para este proyecto se estandarizó el método de PCR cuantitativo-competitivo el cual pretende ser un método efectivo, rápido y con un bajo costo, para que pueda estar más al alcance de los pacientes, es recomendable realizarse esta prueba constantemente para poder monitorear el progreso de la enfermedad en el paciente infectado con VHB. Se reportan que una PCR competitiva es significativamente más sensible y ligeramente menos específica y reproducible en comparación con la hidridación por captura y ADNc (Pawlotsky 2000).

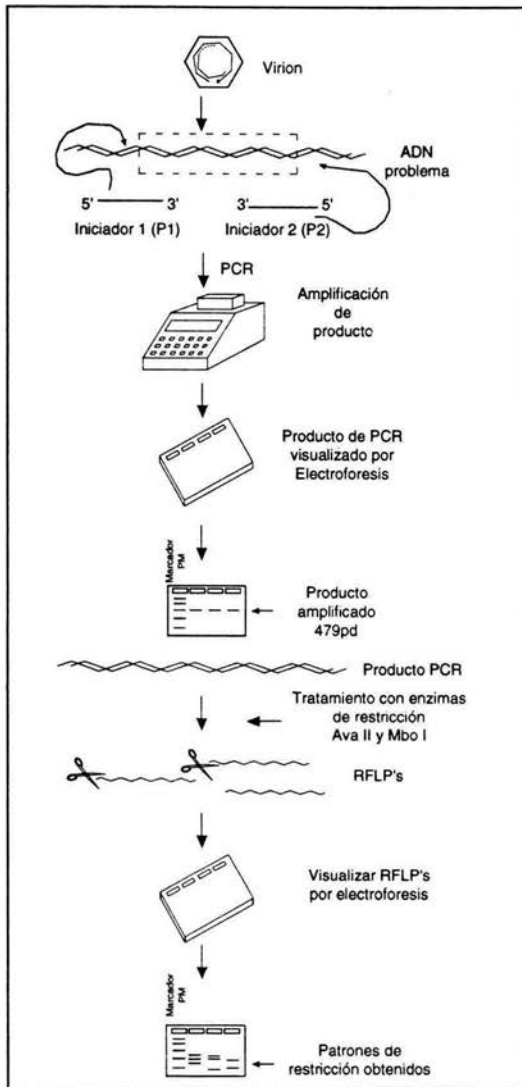
**ESQUEMA 2.2** Fundamento de Reacción en Cadena de la Polimerasa (Karp 1998, Barrera y cols 1993).



- Variabilidad Genética del Virus. Existen por lo menos seis genotipos del VHB (A, B, C, D, E, F), los más frecuentes en nuestro país son A y F. Las técnicas basadas en biología molecular útiles para identificar el genotipo, son la técnica de secuenciación de Sanger-Coulson –terminación de la cadena por incorporación de dideoxinucléotido-, como su nombre lo dice analiza la secuencia de una región determinada en el genoma viral, que será subsecuentemente clasificada mediante algoritmos predeterminados (Karp 1998, Flodgren y cols. 2000, Mbayed y cols. 1998. Westland y cols. 2002), ver Tabla 2.4; estos métodos de secuenciación requieren equipo muy caro por lo que son difíciles de realizar en un laboratorio con pocos recursos económicos. Pero existen otros métodos de tipificación molecular, por los cuales se puede obtener el genotipo del VHB, como son las técnicas basadas en PCR: como es el caso de PCR con iniciadores tipo específico en el cual se realiza una primera amplificación donde se obtendrá el fragmento requerido para la identificación del genotipo del VHB y una segunda amplificación (PCR anidada) con los iniciadores de tipo-específico con los cuales se obtendrán los fragmentos específicos dependiendo del genotipo que el virus presente (Naito y cols. 2001); otro método es el PCR-RFLP (Restricción Fragment Length Polymorphism), técnica utilizada en el proyecto, que se basa en la amplificación de un fragmento de 479pb de la región pre-S del genoma de el VHB, para posteriormente realizar los cortes con las enzimas de restricción Ava II y Dnp II, generando así diferentes patrones o fragmentos de ADN de restricción de varios tamaños, este polimorfismo es generado por rearrreglos en la secuencia del ADN, o cambios de bases dentro de las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción. Posteriormente estos fragmentos serán interpretados mediante algoritmos predeterminados, que nos permiten reconocer el genotipo del VHB presente (Lindh y cols. 1998), ver Esquema 2.3. El motivo por el cual se utiliza dicha técnica es por presentar un bajo costo, además de ser fácil y rápida de realizar, presentando buena efectividad.

**TABLA 2.4. Kits Comerciales más utilizados para el Diagnóstico y Tipificación del VHB.**

PRUEBA	MÉTODO	CARACTERÍSTICAS
Carga Viral para VHB	Amplicor HBV Monitor Roche <sup>TM</sup> , utilizada por: Gerken y cols en 1998, Nagata y cols en 1999, Lefrere y cols en 1999, Pawlotsky y cols en 2000	Sensibilidad de 400 copias/mL, 100% de especificidad (Nagata y cols. 1999, Lefrere y cols 1999). En comparación con el ensayo de Hybrid-capture y bADN, este método es más sensible (Pawlotsky y cols. 2000) Tiempo de reporte de resultados 2 semanas.
Genotipificación para VHB	Secuenciación, por la técnica de Sanger-Coulson, con análisis de secuencias por el Método de Clustal W algorithm, utilizadas por: Flodgren y cols en 2000, Mbayed y cols en 1998, Westland y cols en 2002)	El software que se utiliza para VHB es MegAlign (V5.0) (Westland y cols 2002). Este método inicia con el agrupamiento de dos o más cadenas homólogas, después adiciona cadenas para incrementar la variabilidad una por una. Como resultado se obtienen árboles filogenéticos que son finalmente visualizados con Drawtree (Flodgren y cols. 2000).

**ESQUEMA 2.3. Esquematización de Método de PCR-RFLP's (Persig y col 1993).**

III. Evaluación histológica. En pacientes con enfermedad crónica del hígado es fundamental conocer cual es el grado de daño tisular. Existen tres razones por las cuales es recomendable realizar la biopsia hepática: 1)cuantificar con precisión la intensidad del daño necrótico, inflamatorio y de fibrosis (cicatrización excesiva), de acuerdo a la escala de Knodell o la denominada escala METAVIR, que nos da el grado de fibrosis en numero dependiendo del daño al hígado; antes de iniciar un tratamiento; 2) calcular cuál es el pronóstico de la enfermedad a largo plazo, ya que no es lo mismo tener fibrosis leve que fibrosis extensa (lo cual no es posible precisar por ultrasonido); 3)conocer si el tratamiento ha logrado disminuir el daño tisular, repitiendo la biopsia 1 ó 2 años después de la primera (Poo y cols. 2001).

#### 2.2.6. TRATAMIENTO

*Las medicinas no son nada si no se utilizan con juicio, pero son como manos de los dioses, si se utilizan con prudencia.*

Herophilus, 300 A.C.

Se han estudiado varios agentes antivirales en la infección del VHB. Los análogos nucleosídicos como el ganciclovir y el famciclovir han demostrado tener una actividad anti-VHB. Se ha demostrado que la lamivudina, elimina el VHB en todos los pacientes con una dosis oral diaria, pero la recaída clínica es común al suspender la terapia. Sin embargo, la baja toxicidad de este fármaco hace posible su administración por períodos prolongados en pacientes resistentes al interferón (Méndez 1999).



El tratamiento con interferón alfa-2b recombinante, ha demostrado ser un método seguro y eficaz en el tratamiento de la hepatitis B. El mecanismo de acción del interferón alfa-2b en la hepatitis viral crónica no se entiende completamente, pero con base en los datos obtenidos in vitro, parece ser el resultado de su actividad antiviral e inmunomoduladora, interfiriendo en la replicación viral y reforzando la capacidad del sistema inmune para reconocer y atacar al virus (Méndez y cols. 1999).

**TABLA 2.5. Objetivos de la terapia con interferón alfa-2b en pacientes con hepatitis B crónica (Méndez y cols. 1999).**

Objetivo.	Implicación.
Disminución de HBeAg	Remisión virológica: *Reducción / erradicación de la replicación viral. *Disminución de potencial de infección.
Disminución de ADN-VHB	Supresión de la replicación viral. Se relaciona a la disminución de HBeAg.
Normalización de la concentración de ALT	Cese de la inflamación hepática e interrupción de la progresión de la lesión hepática.
Disminución de HBsAg.	Erradicación completa del VHB.

Lamivudina [(β-L- (-)-2'.3'-dideoxi-3'-tiacitidina, 3TC] es un análogo nucleosídico con potente actividad antiviral en contra del VHB y del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH). La lamivudina fosforilada intracelularmente, lamivudina-5'- trifosfatada tiene actividad metabólica como inhibidor de la DNA polimerasa dependiente de ARN viral (transcriptasa reversa) por actuar en la cadena de terminación y por competir con el sustrato natural dCTP. El mecanismo de replicación de los *hepadnavirus* y *retrovirus* es a través de una transcripción reversa y una parte en común de ambos

virus altamente conservada es YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) modificada en el dominio de catálisis de la polimerasa. Las pruebas clínicas para el tratamiento con lamivudina en pacientes con hepatitis B crónica tienen que mostrar rápidamente una reducción en suero de los niveles de ADN VHB, mejora en histología hepática y puede lograr la seroconversión HBeAg. En el trasplante de hígado, lamivudina ha sido afectivo en la prevención y tratamiento de la reinfección del aloinjerto con VHB. No obstante, en terapias con periodos cortos puede no eliminar el pool de ADNccc; actualmente la terapia antiviral es requerida en la mayoría de los pacientes para conservar la supresión de la replicación viral (Gutfreund y cols. 2000).

Con monoterapia prolongada de lamivudina la emergencia de virus VHB resistentes al fármaco, está empezando a incrementarse (Puchhammer-Stockl y cols. 2000, Gutfreund y cols. 2000); por lo que la terapia combinada recomendada para el tratamiento de la hepatitis B crónica es el alfa-interferon y lamivudina (Stuyver y cols. 2000).

### **2.2.7. PREVENCIÓN Y VACUNAS DISPONIBLES**

*Hay dos formas de vivir tu vida. Una es pensar que nada es un milagro. La otra es pensar que todo es un milagro.*

*Albert Einstein.*

Se dispone ya de la primera vacuna humana a base de ingeniería genética, que ofrece una esperanza para controlar la hepatitis B.

Esta vacuna recombinante llamada Recombivax, fue autorizada por la Administración de Drogas y Alimentos de E.U. (FDA). Esta se produce involucrando al ADN recombinante que codifica la secuencia de una proteína antigenica del virus (Maldonado-Jimenez 1998); esto se consigue al introducir a *Sccharomyces cerevisiae* (levadura del pan) un plasmido que contiene el gen S de

aproximadamente 150pb, algunos autores como Cheng y cols. describen que la región que debe ser utilizada es la pre-S1 o pre-S2 que también codifican para el HBsAg (Cheng y cols 1986), que es el determinante antigénico más utilizado para la producción de vacunas (Budkowska y cols. 1995, Torresi y cols. 2002, Paulij y cols. 1999). La ventaja de utilizar este antígeno es que no solo se encuentra en las partículas infecciosas de Dane, también se encuentra en las partículas esféricas y filamentosas –no infecciosas- lo que hace más fácil su producción (Heermann y cols. 1984, Cheng y cols. 1986); otra ventaja es que este antígeno es capaz de provocar la seroconversión (Anti-HBsAg) en un 95% de los pacientes que son vacunados (Torresi y cols. 2002).

El HBsAg se recolecta mediante el lisado de las células de la levadura y se separa de los componentes de ésta por interacción hidrofóbica y cromatografía con exclusión de tamaños. La proteína HBsAg purificada se somete a filtración estéril y a tratamiento con formol antes de su envasado. La vacuna se envasa de modo que contenga 10 µg de proteína HBsAg/mL, adsorbida con 0.5mg/mL de hidróxido de aluminio, se añade timerosal como conservador a una concentración de 1:20000.

La vacuna recombinante se administra en una serie de tres dosis en un período de 6 meses, la segunda dosis se administra 1 mes después de la primera y la tercera 5 meses después de la segunda. En los adultos y en los niños mayores de 10 años la dosis recomendada en cada una de las tres inoculaciones es de 10 µg (1mL) por vía intramuscular. Los niños menores de 10 años han de recibir dosis de 5 µg (0.5mL) con la misma pauta que en el caso anterior.

La respuesta es la secreción de citocinas, así como la inducción de células citotóxicas que responden igual a cuando se produce la infección en forma natural. La vacunación con la vacuna recombinante probablemente es lo más simple y seguro para inducir células T citotóxicas vía MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) clase I, la presencia del antígeno da como resultado la secreción de proteínas recombinantes secretadas de las células transfectadas.(Maldonado-Jimenez 1998).

Esta vacuna a base de ingeniería genética ofrece una verdadera esperanza. Si bien no existe un tratamiento eficaz en contra de la enfermedad, el arribo de la vacuna a base de ingeniería genética es la primera oportunidad real disponible para la prevención de la hepatitis B.

La ventaja de la vacuna recombinante es su fácil preparación y su estabilidad así como la facilidad de inyectarse en el tejido en forma intradérmica o intramuscular. Esta vacuna posee otras ventajas importantes entre las que destacan poder producirse en grandes cantidades, lo cual aumenta en forma importante su existencia y disponibilidad, a demás de permitir que el producto se venda a menor precio. Aunado a ello, la ingeniería genética proporciona además una vacuna segura; pura y eficaz, sin riesgo de otros contaminantes plasmáticos (Fields y cols. 1996).

### **3. OBJETIVOS.**

#### **OBJETIVO GENERAL.**

Estandarizar las técnicas de: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa competitiva (PCR) para carga viral y PCR-RFLP para la genotipificación del virus de la hepatitis B (VHB), para su aplicación en el área clínica.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Estandarizar el método de extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) para VHB.
- Realizar la búsqueda de los iniciadores que amplifiquen la región más conservada del VHB y estandarizar una PCR cualitativa para evaluar el método de extracción.
- Elaborar el control interno cuantitativo y estandarizar la técnica de PCR para determinación de la carga viral.
- Estandarizar la técnica de PCR con los iniciadores adecuados para la genotipificación del VHB.
- Realizar los ensayos con enzimas de restricción Ava II y Dpn II para la genotipificación de VHB, por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP).

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Se trabajaron 153 plasma de pacientes con Hepatitis B, 138 plasmas con HBsAg positivo y 15 plasmas con HBsAg negativos, los cuales fueron donados por El Centro Medico Nacional (CMN) "La Raza", Centro Medico Siglo XXI, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) Hospital "Gonzalo Castañeda", Hospital Infantil de México "Federico Gomez", todos del D.F. Los plasmas fueron recolectados en el Instituto de Referencia Epidemiologicas (InDRE), en el Departamento de Diagnostico y Caracterización Molecular, en el Laboratorio de Métodos Cuantitativos, entre los años 2000-2002, los cuales fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2. ESTANDARIZACIÓN DEL EXTRACCIÓN DE ADN DEL VHB.

#### 4.2.1. EXTRACCIÓN CON HIDRÓXIDO DE SODIO

La extracción de ADN se realizó con  $10\mu\text{L}$  de plasma al cual se agregaron  $2.5\mu\text{L}$  de NaOH 0.5M dando un ligero vórtex e incubado por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se centrifugo a 6000 rpm por 15 s. La muestra se neutralizó con  $2.5\mu\text{L}$  de HCl 0.5M. (Ver Apéndice de técnicas)(Kaneko y cols. 1989)

#### 4.2.2. EXTRACCIÓN CON PROTEINASA K/FENOL

Para esta extracción se mezclaron  $200\mu\text{L}$  de plasma con  $250\mu\text{L}$  de Tris-EDTA pH 7.8,  $12.5\mu\text{L}$  de SDS 10% y  $25\mu\text{L}$  de Proteinasa K (10mg/mL). Ya estandarizada la PCR cuantitativa competitiva también se adicionaron las diluciones del CIC agregando  $10\mu\text{L}$  de las diluciones del CIC  $10^{-4}$  ( $1 \times 10^7$  copias de CIC/ml) y  $1 \times 10^{-6}$  ( $1 \times 10^5$  copias de CIC/ml). Se incubo por 2

horas a 60 °C, posteriormente se agregaron 500µL de Fenol saturado pH 8.0 dando vórtex vigoroso y dejando reposar por 5 min y se extrajo con 500µL de cloroformo, dando vórtex vigoroso, se centrifugo a 10,000 rpm por 10 min; se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo con 500µL de cloroformo para extraer el ADN, se centrifugo a 10,000 rpm por 10 min, recuperando la fase acuosa, para precipitar con 400µL de isopropanol y 65µL de NaCl 5M, se dejo reposar a -20 °C por 30 min y se centrifugo a 10,000 rpm por 10 min. se decanto el sobrenadante y se lavo la pastilla de ADN con 1 mL de etanol al 70% se centrifugo a 10,000 rpm por 5 min, se decanto el sobrenadante y se dejo secar. El ADN se puede guardar a -20 °C hasta su uso. (Ver Apéndice de técnicas) (Klein y cols 1997).

### **4.3. ESTANDARIZACIÓN DE PCR PARA EL VHB**

#### **4.3.1. PCR CUALITATIVO PARA EL VHB CON INICIADORES HBV+ Y HBV-**

Para la estandarización de la técnica de PCR se realizó una reacción de 50µL. (por cada muestra), la cual contenía 5µL de buffer 10X para Taq ADN polimerasa -Tris-HCl (0.1M), Mg<sub>2</sub>Cl (0.015M) y KCl (0.5M) a pH=8.3-, 1µL de iniciador HBV+ (CAT TGA TCC TTA TAA AGA ATT TGG AGC), y 1µL de iniciador de HBV-(CCA GCA GAG AAT TGC TTG CCT GAG), que equivale a 50 picomolas respectivamente, 10µL de mezcla de los cuatro trifosfatos de deoxirribonucleósidos (1mM), 31µL de agua bidestilada, 0.3µL de Taq ADN polimerasa (5U) y se adicionaron 3µL del ADN obtenido de la extracción. La PCR consta de 35 ciclos con una incubación previa a 95 °C por 1 min, cada ciclo consiste en una desnaturalización a 95 °C por 15 s, una alineación a 60 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 30 s, seguidos de una extensión final de 7 min a 72 °C. (Ver Apéndice de técnicas.) (Hämmerle y cols. 1997).

El resultado cualitativo se observo con una electroforesis en geles de agarosa al 2%, tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observaron por fluorescencia. El peso molecular de la banda es de 181 pb.

#### 4.3.2. PCR CUALITATIVO PARA EL VHB CON INICIADORES HBV252 Y HBV428R

Para la estandarización de la técnica de PCR se realizó una reacción de 50 $\mu$ L. (por cada muestra), la cual contenía 5 $\mu$ L de buffer 10X para Taq ADN polimerasa -Tris-HCl (0.1M), Mg<sub>2</sub>Cl (0.015M) y KCl (0.5M) a pH=8.3-, 1 $\mu$ L de iniciador HBV252 (ACT CGT GGT GGA CTT CTC TCA) ,y 1 $\mu$ L de iniciador de HBV428R (TG AGG CAT AGC AGC AGG ATG), que equivale a 50 picomolas respectivamente, 10 $\mu$ L de mezcla de los cuatro trifosfatos de deoxirribonucleósidos (1mM), 31 $\mu$ L de agua bidestilada, 0.3 $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (5U) y se adicionaron 3 $\mu$ L del ADN obtenido de la extracción. La PCR consta de 35 ciclos con una incubación previa a 95 °C por 1 min, cada ciclo consiste en una desnaturalización a 94 °C por 30 s, una alineación a 62 °C por 1 min y una extensión a 72 °C por 30 s, seguidos de una extensión final de 7 min a 72 °C. (Ver Apéndice de técnicas.)

El resultado cualitativo se observó con una electroforesis en geles de agarosa al 2%, tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observaron por fluorescencia. PM de la banda es de 195 pb.

#### 4.3.3. CONSTRUCCIÓN DE CONTROL INTERNO CUANTITATIVO (CIC).

Para la construcción del control interno cuantitativo se realizó una PCR semianidada con una reacción de 50 $\mu$ L, ver tabla 4.1, la cual contenía 5 $\mu$ L de buffer 10X para la Taq ADN polimerasa -Tris-HCl (0.1M), Mg<sub>2</sub>Cl (0.015M) y KCl (0.5M) a pH=8.3-, 1 $\mu$ L de iniciador BV1D (CAT TGA TCC TTA TAA AGA ATT TGG AGC CCT TCT GAC TTC TTT CCT TC), y 1 $\mu$ L de iniciador de HBV-(CCA GCA GAG AAT TGC TTG CCT GAG), que equivale a 50 picomolas respectivamente, 10 $\mu$ L de mezcla de los cuatro trifosfatos de deoxirribonucleósidos (1mM), 31 $\mu$ L de agua bidestilada, 0.3 $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (5U) y se adicionaron 3 $\mu$ L del producto de 181pb que se obtuvo de PCR con iniciadores HBV+ y HBV-. La PCR consta de 3 ciclos con una incubación previa a 95 °C por 1 min, cada ciclo consiste en una desnaturalización



a 95 °C por 15 s, una alineación a 50 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 30 s, seguidos de 22 ciclos, los cuales constan de una desnaturalización a 95°C por 15 s, una alineación de 60°C por 30 s, y una extensión de 72°C por 30 s, terminando con una extensión final de 7 min a 72 °C.

El resultado se observó con una electroforesis en geles de agarosa al 2.5%, tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observaron por fluorescencia y se cuantificaron por videodensitometría. El peso molecular de la banda es de 156 pb.

**TABLA 4.1. Mezcla de reacción de PCR para elaboración del CIC, con volumen de 50µL.**

• Buffer 10X PCR	5.0 µL
• BVID dil 1:100	1.0 µL
• HBV- dil 1:40	1.0 µL
• dNTP's	10.0 µL
• H <sub>2</sub> O	30.0 µL
• Taq DNA polimerasa	0.3 µL
• Producto de PCR Cualitativo dil 1:100	3.0 µL

#### 4.3.4. PCR CUANTITATIVA COMPETITIVA PARA CARGA VIRAL DEL VHB

Para la estandarización de la técnica de PCR se realizó una reacción de 50µL. (por cada muestra), la cual contenía 5µL de buffer 10X para la Taq ADN polimerasa -Tris-HCl (0.1M), Mg<sub>2</sub>Cl (0.015M) y KCl (0.5M) a pH=8.3-, 1µL de iniciador HBV+ (CAT TGA TCC TTA TAA AGA ATT TGG AGC), y 1µL de iniciador de HBV-(CCA GCA GAG AAT TGC TTG CCT GAG), que equivale a 50 picomolas respectivamente, 10µL de mezcla de los cuatro trifosfatos de deoxirribonucleósidos (1mM), 31µL de agua bidestilada, 0.3µL de Taq ADN polimerasa (5U) y

se adicionaron 3µL del ADN obtenido de la extracción proteinasa K/Fenol –con los controles respectivos-. La PCR consta de 35 ciclos con una incubación previa a 95 °C por 1 min, cada ciclo consiste en una desnaturalización a 95 °C por 15 s, una alineación a 60 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 30 s, seguidos de una extensión final de 7 min a 72 °C. (Ver Apéndice de técnicas.)

El resultado cuantitativo se observa por electroforesis en geles de acrilamida 12%, tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observarán por fluorescencia. Observando una banda de 181pb y otra de 156pb.

#### **Cuantificación.**

La imagen de los geles de acrilamida al 12% se capturo en el Eagle eye, y con la ayuda del programa llamado TotalLab v 1.10, se cuantificaron las bandas mediante videodensitometría (que compara la fluorescencia del producto de amplificación del virus, con la fluorescencia del producto de amplificación de un control interno con un número conocido de moléculas).

Se observaron dos bandas de diferente peso molecular en el mismo carril (una banda de 181 pb producto de amplificación del VHB y otra banda de 156 producto de amplificación del control interno).

Los datos de adsorbancia obtenidos se pasaron a una hoja de excel para realizar los cálculos siguientes:

$$\text{Densidad de la muestra} / \text{Densidad del control} \times \text{moléculas del control/ mL} = \text{Moléculas o copias de ADN/mL de plasma.}$$

Cada una de las muestras se proceso por duplicado con dos diluciones diferentes de control –dil 1X10<sup>-4</sup> y 1X10<sup>-6</sup> por cada 10mL ( 1X10<sup>7</sup> y 1X10<sup>5</sup> copias de DNA respectivamente), por lo tanto se obtuvo un resultado similar en ambas reacciones de donde se saco el promedio en números absolutos y en LOG base 10 de moléculas o copias de ADN por mililitro de plasma. Las muestras que no se amplificaron en esta prueba se consideraron como menor a 125 copias/mL (límite mínimo de detección) y se reportaron como No Detectable.

#### 4.4. GENOTIPIFICACIÓN DEL VHB POR PCR-RFLP

##### 4.4.1 PCR PARA GENOTIPIFICACIÓN POR PCR-RFLP PARA VHB.

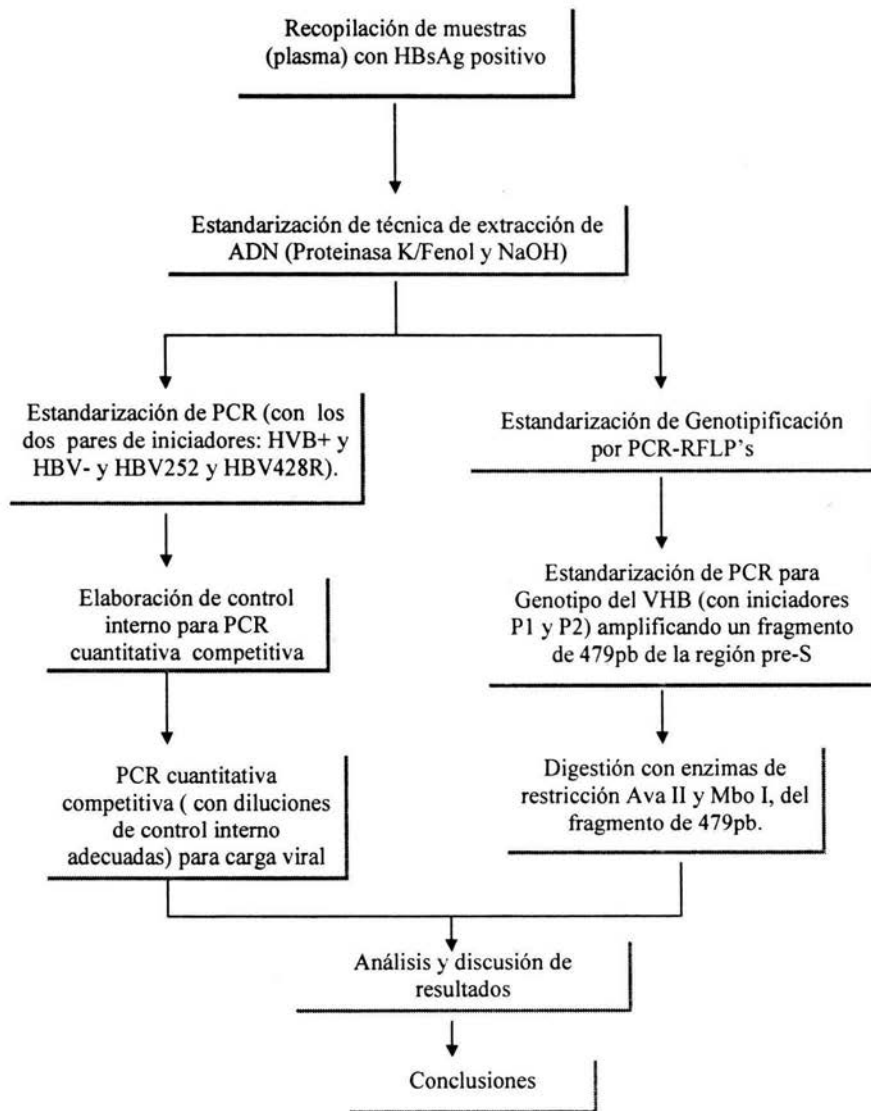
Se realizó una PCR para una reacción de 50 $\mu$ L., la cual contenía 5 $\mu$ L de buffer 10X para la Taq ADN polimerasa -Tris-HCl (0.1M), Mg<sub>2</sub>Cl (0.015M) y KCl (0.5M) a pH=8.3-, 1 $\mu$ L de iniciador P1 (TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA), y 1 $\mu$ L de iniciador P2 (TTC CTG AAC TGG AGC CAC CA) que equivale a 50 picomolas respectivamente, 10 $\mu$ L de mezcla de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos (1mM), 31 $\mu$ L de agua bidestilada, 0.3 $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (5U) y se adicionaron 3 $\mu$ L del ADN obtenido de la extracción con proteinasa K/Fenol. La PCR consta de 40 ciclos con una incubación previa a 94 °C por 3 min, cada ciclo consiste en una desnaturalización a 94 °C por 45 s, una alineación a 53 °C por 1 min y una extensión a 72 °C por 90 s, seguidos de una extensión final de 7 min a 72 °C. (Ver Apéndice de técnicas.) (Lindh y cols. 1998).

El resultado se observa con una electroforesis en geles de agarosa al 2%, tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observaron por fluorescencia. El peso molecular de la banda es de 479 pb.

##### 4.4.2 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN AVA II Y MBO I

Para una reacción de 20 $\mu$ L con enzimas de restricción se requirió de 6 $\mu$ L del producto (479pb) de PCR con iniciadores P1 y P2, el cual se mezcló con un coctel que contenía 2.0  $\mu$ L de buffer de la enzima -ver apéndice de reactivos-, 11.8 $\mu$ L de agua bidestilada y 0.2 $\mu$ L de enzima de restricción Ava II (5U). Para la enzima de restricción Mbo I (5U) se utilizó un volumen de 1.0  $\mu$ L con un coctel parecido al anterior. Las reacciones se incubaron a 37°C por 3h. (Ver apéndice de técnicas) (Lindh y cols. 1998).

Los productos de reacción se corrieron en un gel de acrilamida 12%. El resultado de la electroforesis se observó tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observaron por fluorescencia. El bandeo de cada muestra se comparó con el algoritmo de genotipificación del VHB, descrito por Lindh y cols.

**DIAGRAMA DE FLUJO**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL VHB.

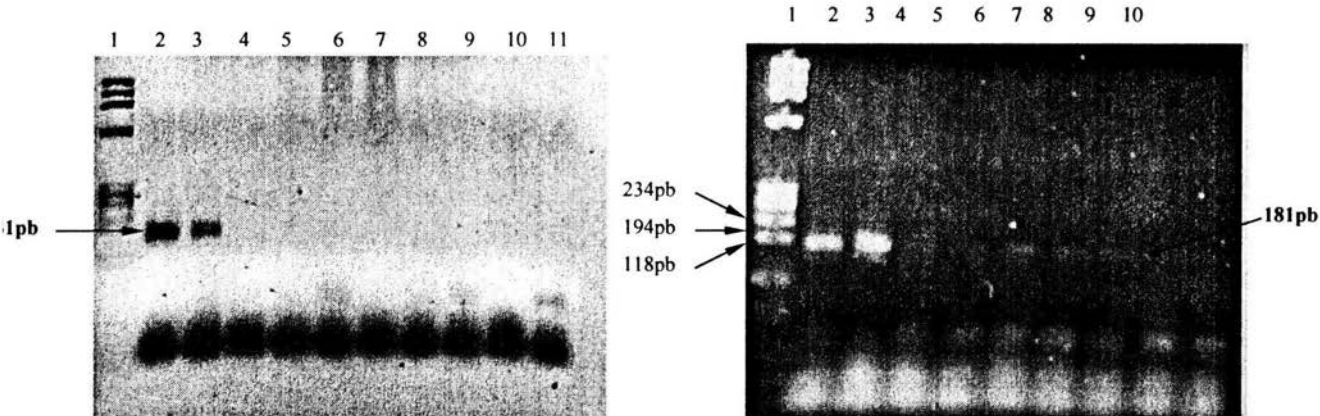
Se analizaron 68 plasmas de pacientes con HBsAg positivo, realizando la extracción de ADN del VHB por los métodos de Proteínasa K/Fenol y NaOH (Ver Material y Métodos), el ADN viral obtenido se amplificó por PCR con los iniciadores HBV+ y HBV- , los cuales reconocen una secuencia específica del ADN del VHB, los productos de esta amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. El fragmento amplificado se observó como una banda fluorescente de ADN de 181 pb. Los resultados se observan en la Figura 5.1.

En la Figura 5.1 se observa la efectividad de ambas técnicas de extracción; cuando las cantidades de ADN viral son altas los resultados fueron similares, mientras que con cantidades bajas de ADN viral los resultados de extracción difieren como se observa en las líneas 4 a 10 de ambas imágenes.

Se realizó una comparación entre el método de Proteínasa K/Fenol y el método comercial PUREGENE (Genomic DNA Purification Estuche). Las extracciones se realizaron al mismo tiempo y con plasmas de los mismos pacientes, los resultados se observaron igual que en el caso anterior con una PCR y se mostraron las bandas del fragmento de ADN –181pb- en geles de agarosa al 2% por fluorescencia.

Los resultados se muestran en la Figura 5.2, donde se observa que estos métodos son efectivos cuando la cantidad de ADN es alta, pero no así cuando la cantidad de ADN es baja, ya que el estuche no recupero bajas cantidades del mismo.

**FIGURA 5.1. Comparación de las Técnicas de Extracción.** Imagen A Extracción con NaOH, Imagen B extracción con Proteinasa K-Fenol, utilizando las mismas muestras para las dos extracciones. Cuando las cantidades de ADN viral son altas los resultados son similares, líneas 2 y 3 de las dos imágenes; mientras que con cantidades bajas de ADN viral los resultados de extracción no coinciden, como se observa en líneas 4 a 10 de ambas imágenes –mismas muestras–.



**Imagen A. Extracción con NaOH.**

1: Marcador de PM ΦX 174.  
 1, 2: muestras con altas cantidades de ADN viral.  
 4 a 10: muestras con bajas cantidades de ADN viral.  
 11: blanco de reacción –todos los reactivos menos muestras–.

**Imagen B. Extracción con Proteinasa K-Fenol.**

1: marcador PM.  
 1, 2: muestras con altas cantidades de ADN viral.  
 4 a 10: muestras con bajas cantidades de ADN viral.

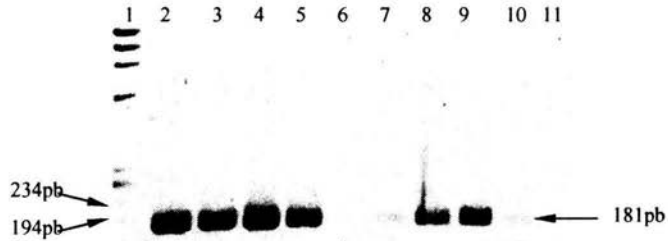
## 5.2 ESTANDARIZACIÓN DE PCR CUALITATIVA PARA EL VHB CON LOS INICIADORES HBV + Y HBV - .

Para la estandarización de la PCR para el VHB, se probaron dos métodos. El primer método de PCR probado para la amplificación y detección del ADN del VHB en plasma, fue el descrito por Hammerle y cols., quienes amplificaron una región altamente conservada en el genoma del VHB que codifica para la proteína de core, utilizando los iniciadores HBV+ (CAT TGA TCC TTA TAA AGA ATT TGG AGC) y HBV- (CCA GCA GAG AAT TGC TTG CCT GAG); proporcionando un fragmento de 181pb, el cual se tomo como banda diagnostica para la detección del VHB, ya que al realizar el análisis de estos iniciadores en el Gene Bank del NCBI. Ver Esquema 5.1 –mostrado adelante, no mostró homología con secuencias de otros virus o genomas conocidos.

**TABLA 5.1. Estandarización de la PCR cualitativa con los Iniciadores HBV+ y HBV-**  
Condiciones optimas de la PCR para la amplificación del fragmento diagnóstico (181pb) del VHB.

	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	1'	
Desnaturalización	95°C	15"	} 35 ciclos
Alineamiento	60°C	30"	
Extensión	72°C	30"	
Extensión final	72°C	7'	

**FIGURA 5.2. Comparación del método de Proteínasa K/Fenol con el método comercial PUREGENE (Genomic DNA Purification Kit).** Se observa que ambos métodos son efectivos cuando la cantidad de ADN es alta (Lineas 3,4 y 8,9 respectivamente), mientras que con cantidades de ADN bajas (Lineas 7 y 10 ), la efectividad no es la misma.



- 1: Marcador de PM  $\Phi$ X 174.
- 2 y 5: muestras extraídas con Proteínasa K/Fenol.
- 6: control negativo de extracción.
- 7 a 10: extracción con el Kit PUREGENE
- 11: control negativo de extracción.



Se analizaron 68 plasmas de pacientes las cuales presentaban, basándonos en sus historias clínicas, HBsAg positivo por serología (ELISA); las condiciones de la PCR ya estandarizada son las que se muestran en la Tabla 5.1

Para la estandarización de la PCR no se presentaron muchas dificultades solo se probaron diferentes concentraciones de los iniciadores para obtener amplificaciones consistentes y no mostraran productos de amplificación inespecíficos.

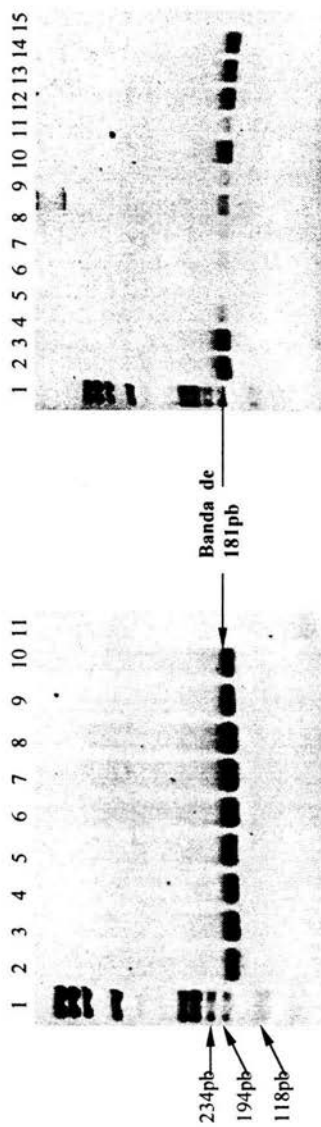
Como se muestra en la Figura 5.3. el par de iniciadores (HBV+ y HBV-) amplificó un fragmento del genoma del VHB el cual proporcione una banda de ADN de 181 pb, la cual se observó por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

El par de iniciadores (HBV+ y HBV-) no amplificó otras regiones del VHB o del genoma humano que pudieran causar alguna interferencia en la PCR. Los controles negativos, de plasmas de pacientes sanos, no presentaron ninguna amplificación por lo cual se descarta una inespecificidad causante de falsos positivos –datos no mostrados-.

### **5.3 ESTANDARIZACIÓN DE PCR CUALITATIVA PARA EL VHB CON LOS INICIADORES HBV252 Y HBV 428R.**

El segundo método de PCR cualitativa probado, fue con los iniciadores HBV252 (ACT CGT GGT GGA CTT CTC TCA) y HBV428R (TG AGG CAT AGC AGC AGG ATG), los cuales amplifican una región que codifica para el gen S del VHB; las secuencias fueron obtenidas al analizar el genoma del VHB en el Gene Bank de NCBI permitiendo localizar la región más conservada del virus. Ver Esquema 5.1 –mostrado adelante-.

**FIGURA 5.3. Estandarización de PCR cuantitativa con iniciadores HBV+ y HBV-.** Imágenes de gels de agarosa al 2% donde se observa el producto de amplificación de un fragmento del genoma viral, con los iniciadores HBV+ y HBV- proporcionando una banda de DNA de 181 pb.



1: Marcador de PM  $\Phi$ X 174.  
2 a 10: producto de amplificación de 181 pb.  
11: blanco de reacción.

1: Marcador de PM  $\Phi$ X 174.  
2 a 14: producto de amplificación de 181 pb.  
15: blanco de reacción.

Se analizaron 15 plasmas de pacientes con HBsAg positivo; obteniendo un fragmento esperado de 195 pb, y otro fragmento no esperado, con un peso molecular de aproximadamente 315 pb. Para eliminar ese fragmento no esperado se realizaron algunas modificaciones al procedimiento, como fue: el tiempo de alineación, sin ningún resultado; también se probó con diferentes diluciones de los iniciadores, pero tampoco se logró evitar la amplificación de la banda de 315pb, por lo que se

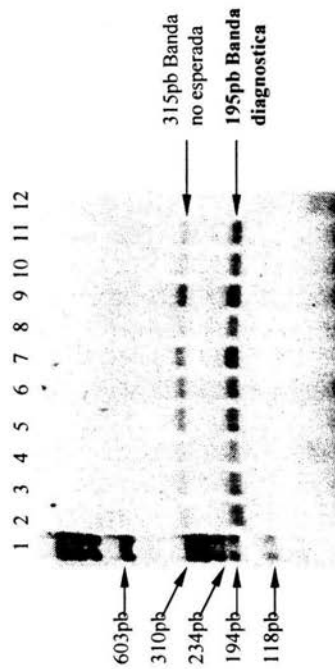
recurrió a modificar la concentración de Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ ), realizando curvas de  $MgCl_2$  de 0.1M a 1.5M a diferentes volúmenes, sin embargo en todas las concentraciones se siguió amplificando la banda de 315pb. Ver Figura 5.4. Para el caso de los plasmas negativos tampoco causaron ninguna amplificación por lo que no existe inespecificidad causante de falsos positivos.

#### **5.4 ELABORACIÓN DEL CONTROL INTERNO CUANTITATIVO (CIC) PARA PCR CUANTITATIVA COMPETITIVA DEL VHB.**

Se construyó un CIC, para la PCR cuantitativa competitiva, el cual presenta una secuencia homóloga a la secuencia del fragmento diagnóstico de 181 pb amplificado por la PCR cualitativa estandarizada anteriormente, donde los iniciadores que amplifican este fragmento diagnóstico, también amplificaron el fragmento del CIC, siendo así una reacción competitiva.

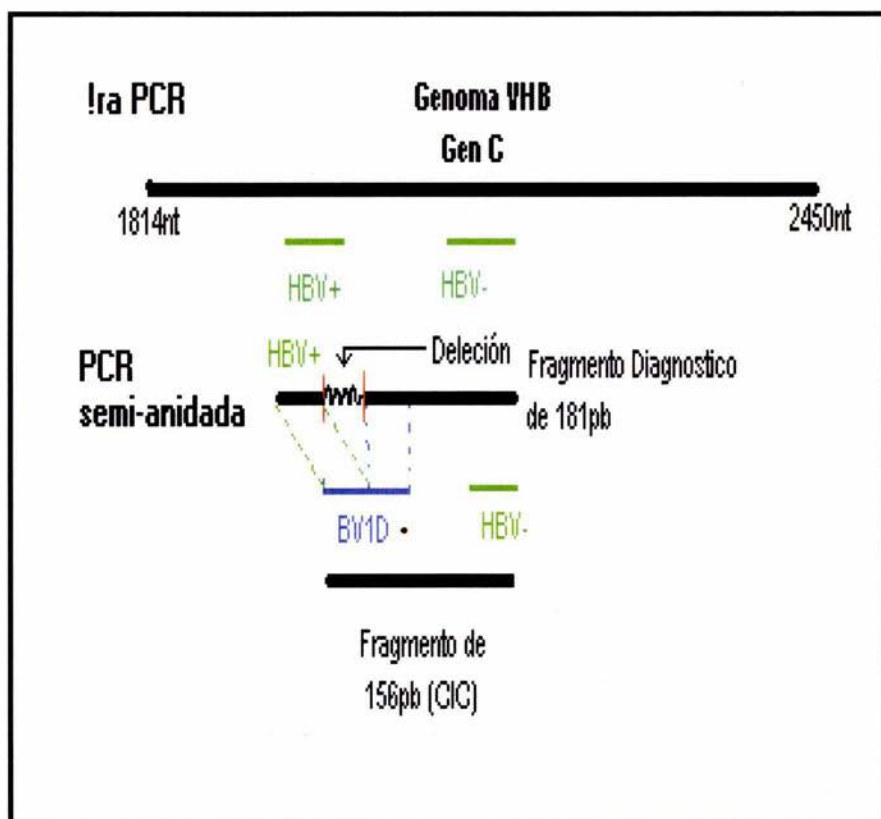
El fragmento del CIC se construyó con una delección de 25 pb, la cual se explica a continuación en el Esquema 5.1. y 5.2., obteniendo un producto de 156 pb, y se pudieron distinguir perfectamente las bandas de ADN de cada fragmento, por electroforesis en geles de acrilamida 12%. Ver Figura 5.5

**FIGURA 5.4. Curva de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>) para la PCR con iniciadores HBV252 y HBV428R. Amplificación de un fragmento de ADN de 195 pb (fragmento diagnóstico), y otro fragmento no esperado, con un peso molecular de aproximadamente 315 pb.**



- 1: Marcador de PM ΦX 174.
- 2 a 11: diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>
- 12: blanco de reacción.

**ESQUEMA 5.2. Esquema de Construcción del CIC.** Como primer paso se realizó, por PCR con iniciadores HBV+ y HBV-, obteniendo un fragmento de 181pb, el cual posteriormente se ocupó para realizar la PCR semi-anidada con los iniciadores: BV1D, iniciador que hizo la delección de 25pb –ver Esquema 5.1-, y el iniciador HBV-, obteniendo un fragmento de 156pb, el Control Interno Cuantitativo (CIC).



**ESQUEMA 5.3. Secuencia del genoma VHB, del Genotipo F.** Letras mayúsculas subrayadas y negritas son los iniciadores P1 y P2, que amplifican el segmento de 479 pb para genotipo. Nucleótidos marcados y subrayados con rojo, sitios de corte de enzima de restricción Mbo I; nucleótidos marcados y subrayados con azul, sitios de corte de enzima de restricción Ava II.

ORIGEN

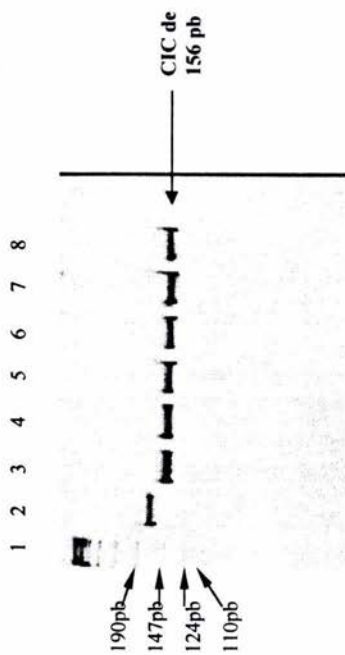
1 gaactcaacc cagttccacc aggtctctgtt **gatcc**cgagg gtaagggtc tgtactttcc **tgctggtggc tccagttcag agacacagaa** cctgtctccg  
101 actattgccc ctctccacc atcaattctt **tgaa**gactg ggggcccctg tatgaacctg gacaacatca catcaggact ctaggaccg cctgcctgtg  
201 tacaggcgtt ggtttttttg ttgacaataa tctccacaat accacagat ctagactcgt gttgacttc tctcaattt ctagggggaa caccagggtg  
301 tccctggcaa aatctcagtt ccccaacct caatcaactta ccaacctctt gctctccaa tgtctctggc tatgcctgga tgtgtctgag cggttttatc  
401 atctctctct tcatctcgt gctatcctc atctctctgt tggttctctt ggcatacaa ggtatgttgc cggtttggcc tctacttcca ggatccacga  
501 ccacagcac gggaccatgc aaaaacttgc caactcttgc taaaggaacc tctatgttcc cctcctgctt cgtttcaaaa cctctggagc gaaactgcac  
601 ttgatctcc atcccacat ctctggcttt agaaaatac ctatggagt gggccttctc tggctcagtt tactagtca atttgttcc  
701 tggctgtag ggttttccc cactgttttg cttttagtt tatggatgat ctggtattgg gggccaaatc tgtgacgat ctgagttccc ttataccgc  
801 tgttaccat tttctgtat ctgtgggat ccatttaat acccttaaaa cgaagaagt gggctatact ctaaatcca tgggatatgt tattggcagt  
901 tggggtatc taccacaaga tcaacttga caaaaaatca agccttatt tctgtaaacct cctgtaaacct gccctattga tggaaagt tctcaacgca  
1001 tttgggtct tttgggttt gccgccat ttacacaatg tggttatct gctctcagc ctctgtatgc ctgtataact gctaaagcagg ctttggttt  
1101 ttgcgcaact tacaaggct tctatgtca acaatacatg cactttacc cgttctctg gcaacggcca ggcctgtgc aagtgttgc tgaacgcaacc  
1201 ccaactggtt gggccttggc cattggccat cagcgtatg ttggaacctt tgtggctct ctccatagga agtacacct ctcccattg cgtctggttgc  
1301 ctgcagcag gcttggagc aactcatc gacacagaaa ctctgttgc ctctctagga agtacacct ctcccattg cgtctggttgc tggctgcca  
1401 ctggatcctg cgcgggacgt ccttgttta cgtcccctg gcctgaaat cgcggaacga tcccctctgg gctcgttgg gctctgatat cccccttc  
1501 cgtctcgt tccagcaac gacggctgc acctcttt acggggctc cctgtctgt ccttctatc tgcggaccg tgtgacctc gcttcaacct  
1601 tgcactcgc atggagacca cctgtaacgc cctcgaagc ttgccacag tttacataa gcggactctt ggaactcag gacgtgcaat gacctggatc  
1701 gaagactaca tcaagactg tgtatttaag gactgggagg agctggggga ggagatcagg ttaaagttct tgtatttag agctgtagg cataaattgg  
1801 tctgttacc agcaccatg aacttttca cctctgccta atcatcttt gttcatgct tactgttcaa cctccaagc tgtcccctgg gttgctttgg  
1901 gcatggaca ttgacctta taaagaattt ggagttctg tggaaatct ccttttttg ccttctgatt tctcccgc agttcgggac ctactcgaca  
2001 ccttaccg ccttaccgg gatcctttag aatcaccaga acattgcaca ctaaccata cgcctctcag gaaactata ttgtctggg gtagtataat  
2101 gactttgct tctgggttg gaaataattt ggaagatcct ccaactaggg actaactata taactatgtt aactataata tgggctaaa aatlagacaa  
2201 tacttgggt tcaacattc ctgcctact ttggaaag aacagttct tgaattttg tgtcttttg gagtgtggat tgcgactct cctgctata  
2301 gaccacaaa tggccctatc tatabacac tccggaaaac tactgttgt agacgacgag gaggctctc tgsaaagaaga actcccctgc ctgcagagc  
2401 aggttctca tggcggctc gcagaagat tcaatctca ccttcccaat gttagtatc ctggactca taagttggga aactttacgg gactctatc  
2501 ctactgtt cctactttha atctgactg gtaactcct tctttctctg atttacttt acatcaagat tgtatacaca aatgtgaaca atttgttagc  
2601 ctctataca aaaaatgatt gagaagatta aatltggtta tgcctcag attttctc aaggttacca aatatttcc tatggaaag ggaatgaaac  
2701 cctattatc tgataacgt gtaatacatt attttaagc cagacactat ttgcatact tatgaaaggc aggcattcta tataagagag aatcccacc  
2801 tagcgcctca tttttgggtt **CACCAATTC TTGGAAACA** gagctacagc atgggacac ctctatcac gacacaaagg gcatctggac agaattctc  
2901 tgtaccat cctctggat ttttccaga cctcctctat **gatcc**ctctat tcaagggcaa tcccagcat cccgactggg acttcaaca aacaacag  
3001 aattggcaca tggcaacaa gtaggagtg gtaggatac **gtc**ctgggtt cacaccoca cagctggcc tcttggggg gagcccac gacagggg  
3101 tgettacaac attgccagca **gatc**cgctc ctgcttccc caatcggcgg **tc**cgggagaa acccaacccc agtctctcca cctctaagag acactcatc  
3201 acagggccatg cagt

**ESQUEMA 5.1 Secuencia completa del genoma VHB.** Letras mayúsculas subrayadas con negritas y cursiva son los sitios donde se pegan los Iniciadores HBV+ y HBV-, para obtener un fragmento de 181pb. Letras mayúsculas subrayadas son los iniciadores HBV252 y HBV428R que amplifican una banda de 195pb. Letras color azul nos indican el sitio donde se pega el iniciador BV1D-, para llevar a cabo la deleición, del fragmento de 181pb (fragmento diagnóstico) y obtener un fragmento de 156pb, obteniendo así el CIC. Las letras marcadas con negritas y cursiva son los sitios de inicio y fin de los codones. Sitios de codones de inicio: preS1:2848, preS2 :3172, S:155, P:2307, C:1814,X:1374 Codones de fin: S:833, P:1621, C:2450, X:1836 (Preisler-Adams 1993)

ORIGEN

1 ctccacaacc tccaccacaaa cctctgcaaga tcccagagtg agagccctgt atttccctgc tgggtgctcc agttcaggaag cagtaaaacc tgttcccgact  
101 actgctctc acatctctc aatctctcg aggtatggg accctggct gaac**atggag** acatctcag caggattcct aggaccctc ctcggttacc  
201 aggggggggt tttcttggtg acaagaatcc tcaaaatacc gcagagtcta **gACTCGTGGT GGACTTCCT CA**attttcta gggggaacta ccgctgtctc  
301 tggccaaaat tgcagctccc caactccaa tcactcaaca accctctgtc ctcaacttg tctgggttat cgtctgatg tctcggcg tttatcctc  
401 tctctctca cctgtctgct atgctCATC **TCTTGTTGG TCTTCCTGga** ctatacaagt agttgcccg ttgtctctc aattccagga tcttcaacca  
501 ccagcagca accctgcaga actctgcaga cctctcaga agaaacctc atgtacctc atgtctctc taccaaacct tccgacggaa atgcagga  
601 tattcccatc ccatcatcct gggctttcgg aaaaattcta tggagatggg cctcagccc ttctctcgg ctcagtttac tagtccatt tgttcagtgg  
701 tctgtagggc tttcccacc tgtttggctt tcaattat tggatgatgt gttatgggg ccaagactgt acagactgt gactctctt ttaccgctgt  
801 taccaaattt cttttgctc tgggtataca **tttaaacct** agtaaaacc aagaatggg ttactctta catttcatgg gactctctt tggatgttat  
901 gggtaatttc caaagatca catcacacag aaaaataag atgtttcag aaaaacctc tttaacagc ctattgatg gaaagctgt caagctattg  
1001 tgggtctttt gggttttgct gcccattta caaatgtgg ttactcgtc ttaatgctc tgbatgatg tatteaatc aageagcctt tcactttctc  
1101 gccaaactac aaggcctttc tgtgtaaca atacctgaac cttaaccocg ttgcccggca acggcccagt ctatgcaag tgttctga cgcaacccc  
1201 actggctggg ctttggctat gggccatcag cgcattcgtg gaectttcc ggtcctctg ccgatccata ctgcccagt cctagccgt tgtttgctc  
1301 gcagccggtc tggagaaac attctc<sup>5</sup>gga cggataactc tgttttctc tcccgaaat atacatgct tcc**atggct** ctaggctgt ctgccaact  
1401 gatcctggc gggagctcct tgttttaagt cccgtcggc ctgaaatccc cggagacc ttctcgggg ccgttggag tctctgctc ccttccctg  
1501 ctgccgttc gaccgaccac tctctttacg cggactccc tctctgctc tetcatctgc cggaccgtgt gcactctgct tcaactctgc  
1601 acgtcgcag gagaccacc tgaactcttg ccaactctg ccaaggtct tacacaagag gactgttga ctctctgtaa tgcacaagac gaacttgag  
1701 gcatactca agactattt gtttaaggac tgggagagt tggggagga gattagttta aaggtctttg tactaggag ctgtaggcat aaattggtct  
1801 gcgcaaccg ac**atg**caac ttttcaact ctgcca**atc** atctctgtt catgtctac tgbtcaagc tccaagctgt gccttgggtg gctttagggc  
1901 atgga**CATTG ATCCTTATAA AGAATTTGGA GCT**actgtgg agttactctc gtttttgcct **tctgactct tccctcagt** acgagatctt ctgataaccg  
2001 cctcagctt atactgggaa cctctagagt cctctgaga tgtttcaact caccatctg ca**CTCAGGCA AGCAATTCCT TGC**TGGgggg aactaatgac  
2101 tctagccacc tgggtgggtg gtaatttga agatccaa tccagggacc tagtagtcag ttratgttaac actaatatgg gcctaaagt caggcaacta  
2201 tgtggttcc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cggctataga gtaatttggg tcttttcggag tgtggattcg cactctcca gcttataggc  
2301 cacc**aatgc** ccttatctta tcaaacctc cggagacttg tgttgttaga cgcagggca ggtcccctag aagaagact cctctccctc gcagacgaag  
2401 tctcaatcg cgcgtcga gaagatctca atctcgggga tctcaatgt **agt**tattctt ggaactataa tgggaaaac ttacggggc tttatcttcc  
2501 tactctctc gcttttaacc cctattgaa acccccctt tctcaata tcaatttaca caaagacta atcaaaaaa gtgaacaatt tgtagggcca  
2601 ctacagta atgagaaaag agactgcaa tigtatctg ctgctagggt ttatccaaat gttaccaaat atttaccatt ggtatagggt attaaacctt  
2701 attatccaga acatctagt aatcattact tccaaaccag acattattha cacacttat ggaagcggg tatattat aagagagaaa caacacgtag  
2801 gctctcatt tgtgggtcac caatattctt ggaacaag ctacag**ctg** gggcagaatc ttctccacag caactctctt ggatcttcc ccgaccaca  
2901 tgtgatcca gccctcagc caaacccg aaatccagat tgggacttca atcccacac ggaacctcgg caactctcgg gactgtttg agctggagca  
3001 tctgggttg gatcaccoc accgcacgga ggccttttgg ggtgagccc tcaagctcag ggcatactac aaacttgc acaaaatcc cctctgctt  
3101 ctaccaatcg ccagtcagga aggcagccta cccctctgtc tccactttg agaaacactc atctctcaggc **catg**caagtgg aa

**FIGURA 5.5. Amplificación del CIC con iniciadores HBV+ y HBV-. Se observa el fragmento de 156 pb del CIC, mostrado en un gel de acrilamida 12%.**



- 1: Marcador de PM VIII.
- 2: Banda diagnóstica de 181pb.
- 3 a 8: producto de amplificación de 156 pb del CIC amplificado con iniciadores HBV+ y HBV-. El cual fue elaborado con iniciadores BV1D y HBV-.

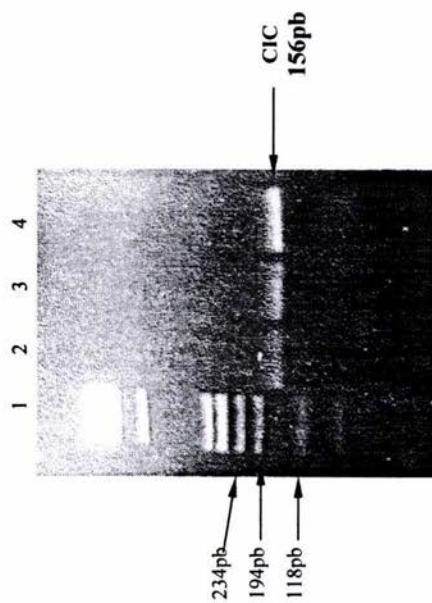


Para la construcción del CIC se ocupó un iniciador BV1D (CAT TGA TCC TTA TAA AGA ATT TGG AGC CCT TCT GAC TTC TTT CCT TC) que permitió realizar la delección, ver Esquema 5.1 , de 25 pb. Para la elaboración del CIC se realizó una PCR semi-anidada, ocupando como ADN un producto de amplificación de la PCR cualitativa (con iniciadores HBV+ y HBV-), los iniciadores utilizados fueron: BV1D –que generó la delección- y el HBV- -iniciador de PCR cualitativa-. La reacción de PCR siguió los siguientes pasos, ver Tabla 5.2.

<b>TABLA 5.2. Condiciones adecuadas de la PCR para la Construcción de CIC</b>			
	TEMP	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	1'	
Desnaturalización	95°C	15"	} 3 ciclos
Alineación	50°C	30"	
Extensión	72°C	30"	
seguido de...			
Desnaturalización	95°C	15"	} 22 ciclos
Alineación	60°C	30"	
Extensión	72°C	30"	
Extensión final	72°C	7'	

El CIC obtenido se presenta en la Figura 5.6. en la cual se observa una banda de ADN de 156pb en un gel de agarosa al 2.5% por fluorescencia. Para conocer el número de moléculas que tenía el CIC, se realizó un corrimiento electroforetico en un gel de agarosa al 2.5%, donde se corrió un volumen conocido del marcador de ADN para pesos moleculares  $\Phi$ X 174RF DNA/Hae III fragments y diferentes volúmenes -1, 3 y 10  $\mu$ L- de una dilución 1:5 del producto de PCR-CIC obtenido;

**FIGURA 5.6. Cuantificación del Control Interno Cuantitativo (CIC).** Gel de agarosa al 2.5% donde se muestra el CIC (banda de ADN de 156pb), gel de donde se obtuvieron las densidades ópticas, por fluorescencia, para conocer posteriormente el número de moléculas de ADN/ml que presentó el CIC .



- 1: Marcador de DNA para pesos moleculares  $\Phi$ X 174 RF DNA/Hae III fragments con volumen conocido.
- 2: 1.0  $\mu$ L de dilución 1:5 de CIC.
- 3: 3.0  $\mu$ L de dilución 1:5 de CIC.
- 4: 10.0  $\mu$ L de dilución 1:5 de CIC.

conociendo el peso molecular de cada una de las bandas del marcador, los nanogramos totales y su densidad óptica del marcador, así como la densidad óptica de la banda del CIC, ver Figura 5.6; se procedió a realizar los cálculos que se presentan en la siguiente tabla:

<b>TABLA 5.3 Cálculos para obtener la concentración del CIC</b>	
Estudiamos una dilución 1:5 al cuantificarla obtenemos	
2.08 nanogramos de DNA control por microlitro	
Entonces 1 uL contiene	2.08E-09 gr de DNA
1 par de bases = 660 Daltones	
el control mide 156 bases	
el control pesa $156 \times 660 =$	102960 daltones
dividiendo la cantidad en gramos	
entre el peso molecular obtenemos:	2.01632E-14 moles/ uL
en un mol hay :	6.02E+23 moléculas
dividiendo entre el numero de moles por	
microlitro tenemos en un uL de dilución:	1.21E+10 moléculas
en un uL del original hay:	6.07E+10 moléculas

El número de moléculas de ADN/mL que se obtuvieron del Control Interno Cuantitativo se presenta en la Tabla 5.4.

<b>TABLA 5.4. Número de moléculas de CIC obtenidas.</b>	
en 1 $\mu$ L de dilución 1:5 :	1.21X10 <sup>10</sup> de moléculas de ADN
en 1 $\mu$ L del original :	6.07X10 <sup>10</sup> de moléculas de ADN

Posteriormente conociendo el número de moléculas de ADN/mL se probaron diferentes diluciones del CIC elaborado, para encontrar diluciones con los cuales se pudieran cuantificar muestras con muy baja carga viral (entre 100 y 1000 copias o moléculas de ADN por mililitro) y con carga viral alta (mas de 10,000,000 de copias o moléculas de ADN/mL), es decir que abarcaran un intervalo de LOG (logaritmos) de 2 a 8, por lo que se utilizaron dos diluciones, una con un número bajo de copias de ADN y otra con un número alto de copias de ADN. Esta diluciones se adicionaron en la técnica de

Extracción con Proteinasa K/Fenol en un volumen de 10 $\mu$ L –Ver Apéndice de Técnicas-, se corrió posteriormente la PCR con los iniciadores HBV+ y HBV-, encontrando las diluciones adecuadas de: 1X10<sup>-6</sup> (1X10<sup>5</sup> copias de CIC/ 10 $\mu$ L) y 1X10<sup>-4</sup> (1X10<sup>7</sup> copias de CIC/10 $\mu$ L), diluciones obtenidas de la dilución 1:5 del CIC, con lo cual se aseguro la amplificación del ADN viral de las muestras, sin ningún problema en cuanto a competición de sustrato, ver Figura 5.7.

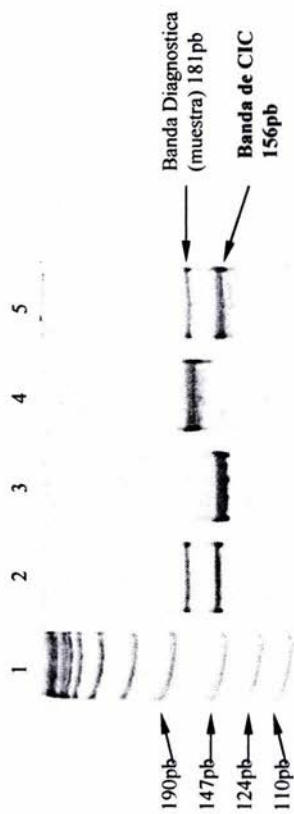
### **5.5 ESTANDARIZACIÓN DE PCR CUANTITATIVA COMPETITIVA PARA CARGA VIRAL DEL VHB.**

Se analizaron 68 plasmas, con HBsAg positivo y con resultado positivo para PCR cualitativa. El ADN de las muestras fue extraído por el método de Proteinasa K/Fenol, con la adición del CIC en diluciones 1X10<sup>-6</sup> y 1X10<sup>-4</sup> respectivamente, y posteriormente se realizó la PCR con los iniciadores HBV+ y HBV-. Los productos de amplificación se observaron por fluorescencia en geles de acrilamida al 12% teñidos con bromuro de etidio, ver Figura 5.8., la imagen del gel se capturó en Eagle eye II con formato PDF. Para poder conocer la densidad óptica de los diferentes fragmentos de ADN –del virus y del CIC- se utilizó un programa llamado TotalLab v1.10, el cual nos permitió realizar la cuantificación del virus –en la muestra- comparando la densidad óptica del producto de amplificación del VHB (banda de 181 pb) con la densidad óptica del producto de amplificación del CIC (banda de 156 pb); con estos datos de densidad óptica y conociendo el número de moléculas–según la dilución que se utilizó, con la ayuda de la siguiente formula, se pudo conocer el número de moléculas o copias de ADN del VHB / mL de plasma:

$$(\text{D.O de la muestra} / \text{D.O. del control}) \text{ moléculas del control/ mL} =$$

**Moléculas o copias de ADN del VHB / mL de plasma.**

**FIGURA 5.7. Diluciones de trabajo de CIC para Carga Viral del VHB.**



1: Marcador de pesos moleculares VIII.  
 2 y 3: Control bajo de  $1 \times 10^6$  ( $1 \times 10^5$  copias de CIC/mL), banda de 156pb y muestra, banda de 181pb.  
 5 y 6: Control alto de  $1 \times 10^4$  ( $1 \times 10^7$  copias de CIC/mL), banda de 156pb y muestra, banda de 181pb.

Debido a que las muestras se procesaron con dos diluciones diferentes, para las que presentaron valores de carga viral entre 10,000 y 1,000,000 se obtuvieron 2 resultados de copias de ADN del VHB y éste fue similar en ambas reacciones, por lo que se manejó el promedio de estos valores en números absolutos y en LOG base 10 de copias de ADN del VHB por mililitro de plasma. Para las muestras con valores mayores a  $10^6$  ó menores a  $10^4$  se tomó solamente el valor generado por el control mas cercano.

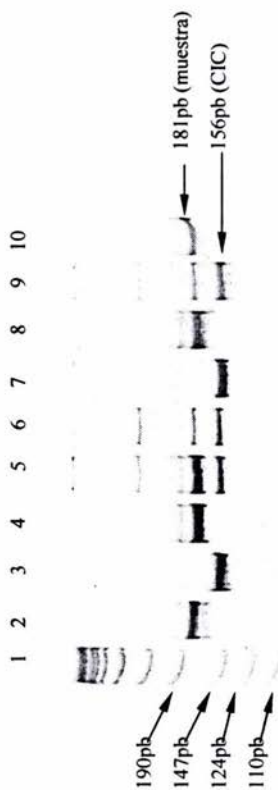
Para la estandarización del método y antes de aplicarlo a las muestras clínicas fue necesario estudiar su linealidad y variabilidad así como el límite inferior de detección.

Para conocer la linealidad, se analizó un plasma del cual se sabía que presentaba elevados niveles de carga viral de donde se realizaron diluciones seriadas 1:5, las cuales fueron procesadas con las 2 diluciones del CIC, desde la extracción hasta la PCR cuantitativa competitiva, ver Tabla 5.5; los resultados se cuantificaron y graficaron en forma Logarítmica, el análisis por mínimos cuadrados mostró un Coeficiente de correlación de **0.9269**, como se observa en el Gráfico 5.1; el cual nos indicó la linealidad del proceso analítico para la detección de copias de ADN VHB/ mL plasma así como una ligera tendencia a dar valores sobrevaluados para las muestras que presentan cargas virales mas bajas, Figura 5.9.

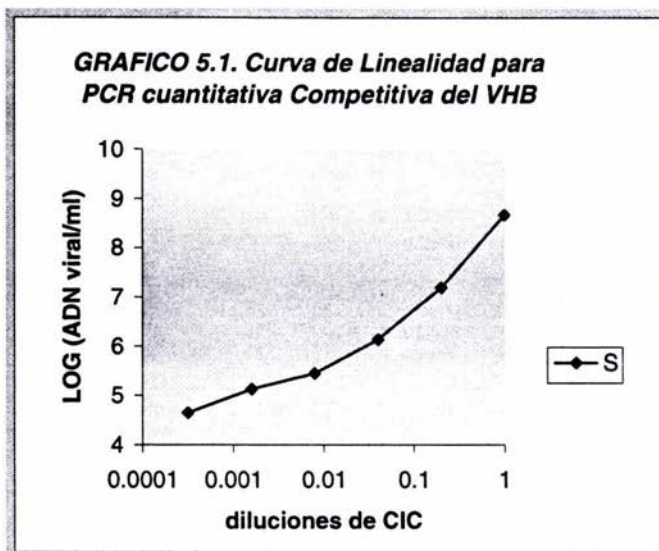
<b>TABLA 5.5 Linealidad del Método de PCR cuantitativa competitiva. Diluciones trabajadas para la obtención de linealidad del método.</b>		
Diluciones de stock positivo (con ADN del VHB)	Concentración de diluciones	LOG promedio*
	1	8.67
1:5	0.2	7.19
1:25	0.04	6.12
1:125	0.008	5.45
1:625	0.0016	5.12
1:3125	0.00032	4.65

\*Log promedio obtenido por valores de carga viral de las diluciones con los dos controles ( $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-4}$ ).

**FIGURA 5.8 PCR cuantitativa competitiva para Carga Viral del VHB.** Se muestran los productos de amplificación en gels de acrilamida al 12% por fluorescencia, para poder conocer la densidad optica de los diferentes fragmentos de ADN -del virus y del CIC-, que posteriormente nos servira para realizar la cuantificación del VHB en la muestra.



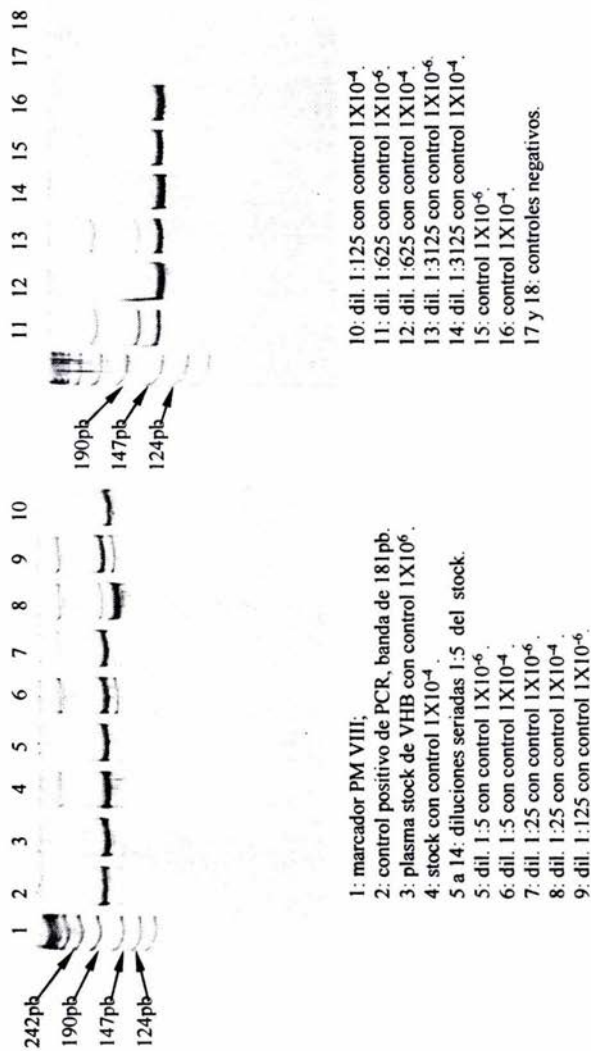
- 1.- Marcador VII
- 2.- Banda de muestra de 181pb
- 3, 5, 7 y 9.- Muestra, banda de 181pb con CIC bajo de  $1 \times 10^{-6}$  ( $1 \times 10^5$  copias de CIC/mL), banda de 156pb.
- 4, 6, 8 y 10.- Muestra, banda de 181pb, Control alto de  $1 \times 10^{-4}$  ( $1 \times 10^7$  copias de CIC/mL), banda de 156pb.



Para poder conocer la reproducibilidad de los resultados generados fue necesario conocer la Desviación Estandar (DE) y el Coeficiente de Varianza (C.V.) del método. Datos que se obtuvieron de la siguiente manera, de la dilución 1:125 de plasma positivo (con ADN del VHB), que se ocupó para la curva de linealidad, se realizaron repeticiones del método –entendiendo por método: la extracción con Proteinasa K/Fenol y la PCR cuantitativa competitiva- con las dos diluciones del CIC, después de realizar la cuantificación los datos obtenidos se analizaron estadísticamente, obteniendo un coeficiente de varianza para el CIC alto ( $1 \times 10^6$  copias de CIC) de 23.9% y de 11.7% para el CIC bajo ( $1 \times 10^4$  copias de CIC), los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 5.6. Es importante recalcar que los métodos comerciales reportan que los valores de CV menores a 25 son aceptables, ver Figura 5.10.



**FIGURA 5.9. Curva de linealidad del Método de PCR cuantitativa competitiva.** Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9269, el cual nos permitió realizar adecuadamente la detección de copias de ADN VHB/mL plasma en pacientes con Hepatitis B.



**TABLA 5.6 Determinaciones estadísticas del Método de PCR cuantitativa competitiva. Datos con los que se pudo conocer la precisión del CIC.**

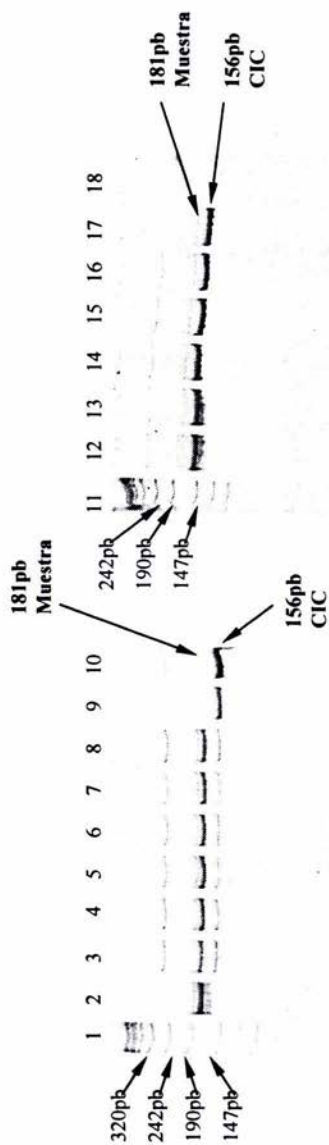
	Dil 1X10 <sup>5</sup>	Dil 1X10 <sup>7</sup>
Promedio	2.97E+05	9.97E+05
DE	70922.6692	116644.419
CV (%)	23.9	11.7

El límite mínimo de detección del método, se obtuvo realizando diluciones seriadas de la dilución del CIC 1X10<sup>-6</sup>; las cuales se muestran en la Tabla 5.7. procesadas por el método estandarizado (entiéndase por método extracción con Proteinasa K/Fenol y PCR cuantitativa competitiva), obteniendo un límite mínimo de detección de 125 copias de ADN/mL de plasma, las muestras que caigan por debajo de este límite se reportaron como *No Detectable*, ver Figura 5.11.

**TABLA 5.7. Límite inferior de detección del Método de PCR cuantitativa competitiva para carga viral.**

Dilución de CIC 1x10 <sup>-6</sup>	Número de copias (copias/mL)
1x10 <sup>-6</sup>	10,000
1:10	1,000
1:20	500
1:40	250
1:80	125*
1:160	No detectable

**FIGURA 5.10. Determinación del Coeficiente de Varianza del Método de PCR cuantitativa competitiva.** El procedimiento es el siguiente: de la dilución 1:125 obtenida del plasma stock de ADN de VHB se realizaron seis repeticiones del método, con el control  $1 \times 10^{-6}$  y seis más con el control  $1 \times 10^{-4}$ ; obteniendo los resultados que se muestran a continuación.



1: marcador de PM VIII.

3 a 8: repeticiones de dilución 1:125 con control  $1 \times 10^{-6}$ .

10 a 16: repeticiones de dilución 1:125 con control  $1 \times 10^{-4}$ .

18: control negativo.

2: control positivo de PCR.

9: solo control  $1 \times 10^{-6}$ .

17: solo control  $1 \times 10^{-4}$ .

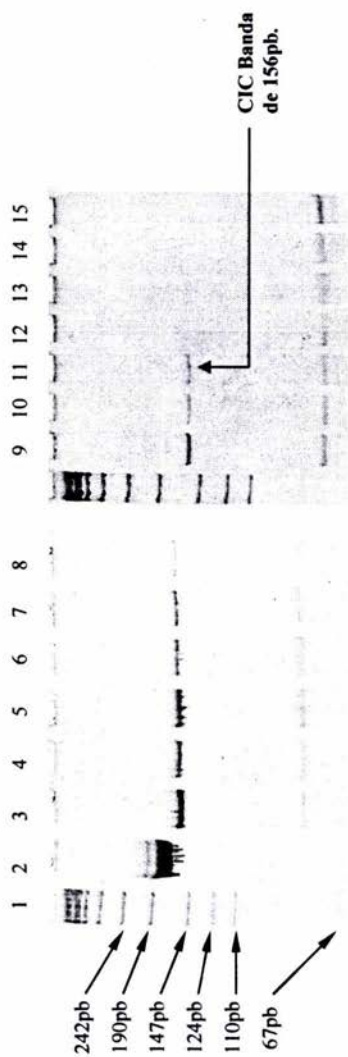
Los resultados obtenidos para carga viral se muestran en la Tabla 5.8. y en la Tabla 5.9. se observa una frecuencia alta de niveles de carga viral elevados entre Log de 5 ( $1 \times 10^5$  copias de ADN/mL) a 7 ( $1 \times 10^7$  copias de ADN/mL).

**TABLA 5.8. Carga Viral de muestras procesadas**

<i>Muestra</i>	<i>Cuantificación (Copias de ADN/mL plasma)</i>	<i>Log</i>
B1 004	27,041,247	7.43
B1 005	106,781,553	8.03
B1 006	No detectable	
B1 008	No detectable	
B1 010	No detectable	
B1 011	No detectable	
B1 019	2,083,285	6.32
B1 020	4,714	3.67
B1 021	4,166,570	6.62
B1 022	No detectable	
B1 023	37,322	4.57
B1 024	4,834	3.68
B1 025	76,431	4.88
B1 038	76,413	4.88
B1 041	38,430	4.58
B1 044	1,061	3.03
B1 056	31,997,302	7.50
B1 067	214,764,114	8.33
B1 069	28,635,799	7.46
B1 071	184,438	5.27
B1 079	3,919	3.59
B1 080	444,929	5.65
B1 093	289,403	5.46
B1 121	836,820	5.92
B1 131	4,151,154	6.62
B1 132	No detectable	
B1 134	No detectable	
B1 135	No detectable	
B1 136	No detectable	
B1 137	No detectable	
B1 138	No detectable	
B1 139	No detectable	
B1 141	48,224	4.68
B1 142	103,826,339	8.02

**FIGURA 5.11. Obtención de Límite mínimo detectable del Método de PCR cuantitativa competitiva.**

Se realizó con la ayuda del control  $1 \times 10^{-6}$  del cual se realizaron diluciones dobles seriadas; ya que conociendo el número de moléculas que tenía el control, pudimos saber cual es la cantidad mínima de moléculas que detecta el método



- 1: marcador de PM VIII.
- 2: control positivo de PCR, banda de 181pb
- 3: CIC dilución  $1 \times 10^{-6}$ .
- 4 y 5: dilución 1:10 del control (CIC).
- 6 a 13: se realizaron diluciones dobles seriadas de la dilución 1:10 del control  $1 \times 10^{-6}$ .
- 6 y 7: dilución 1:2.
- 8 y 9: dilución 1:4.
- 10 y 11: dilución 1:8
- 12 y 13: dilución 1:16.
- 14: controles negativos.

<b>Muestra</b>	<b>Cuantificación</b>	
	<b>(Copias de ADN/mL plasma)</b>	<b>Log</b>
B1 144	8,094,328	6.91
B1 145	23,448,892	7.37
B1 146	44,686,907	7.65
B1 147	5,403,617	6.73
B1 148	16,862,329	7.23
B1 149	890,269	5.95
B1 150	84,147,797	7.92
B1 151	983,547,523	8.99
B1 152	16,979,186	7.23
B1 153	28,458,347	7.45
B1 155	No detectable	
B1 157	52,644,666	7.72
B1 161	852	2.93
B1 163	115,025,000	8.06
B1 166	9,209,358	6.96
B1 167	119,192	5.08
B2 006	101,091	5.00
B2 007	442,517	5.65
B2 008	210,492	5.32
B2 016	194,953,083	8.29
B2 017	43,797,541	7.64
B2 053	14,390,755	7.16
B2 071	156,571,358	8.19
B2 077	16,116,349	7.21
B2 078	44,020	4.64
B2 080	4,069,413	6.61
B2 081	3,151,359	6.50
B2 082	14,801,869	7.17
B2 083	55,612,573	7.74
B2 084	arriba de	
B2 085	59,520,553	7.77
B2 087	22,720,377	7.36
B2 088	No detectable	
B2 089	143,682	5.16

**TABLA 5.9. Valores de Frecuencia para Carga Viral del VHB.**

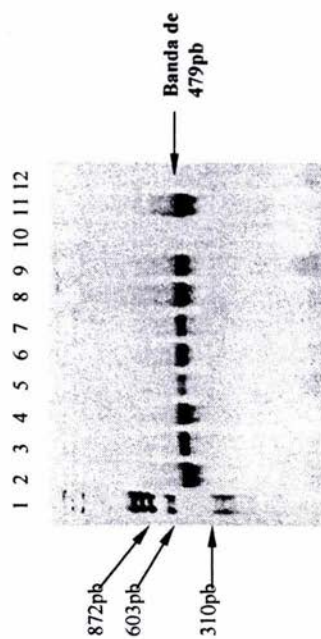
Intervalos de LOG (copias de ADN/mL)	Frecuencia
No detectables	14
2.0-2.9	1
3.0-3.9	4
4.0-4.9	6
5.0-5.9	10
6.0-6.9	8
7.0-7.9	17
8.0-8.9	7

## 5.6 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE PCR-RFLP'S PARA EL GENOTIPO DEL VHB

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los mejores métodos para la realización de la genotipificación del VHB, que se adaptarán mejor a nuestras necesidades, entre los cuales se encontraron: el método de PCR-RFLP's, Secuenciación, PCR-multiplex y PFGE. La sensibilidad y especificidad de estos métodos, es igualmente buena para todos, con la diferencia que el método de PCR-RFLP's, es el más económico y fácil de procesar, por lo que decidimos utilizarlo en este estudio.

Se analizaron 51 ADN virales, extraídos por el método de Proteinasa K/Fenol, los cuales también fueron cuantificados por PCR cuantitativa competitiva; para la identificación de su genotipo por el método de PCR-RFLP's, se inicio con una PCR utilizando los iniciadores P1 (TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA) y P2 (TTC CTG AAC TGG AGC CAC CA), ver Esquema 5.3, los cuales amplificaron la región pre-S obteniendo un fragmento de 479 pb; esta secuencia ha sido reportada como altamente conservada en relación con los genotipos del VHB, ver Figura 5.12.

**FIGURA 5.12. PCR para genotipificación por RFLP's, utilizando los iniciadores P1 y P2.**  
Se muestra un gel de agarosa 2% donde se observó un una banda de ADN de 479 pb, fragmento obtenido de la amplificación de la región pre-S.



1: Marcador de PM  $\Phi$ X 174.  
2 a 12: productos de amplificación con un peso molecular de 479pb.



Posteriormente se realizó la digestión del producto de PCR con las enzimas Ava II –que reconoce GGWCC W= A o T- y Mbo I –que reconoce GATC-, Ver Apéndice de Técnicas, inicialmente la enzima que se iba a utilizar era Dpn II (reconoce GATC) en lugar de Mbo I, pero por su elevado costo se sustituyó por éste isoesquizómero -endonucleasas de restricción que reconocen la misma secuencia diana y la cortan de la misma forma-, ver Esquema 5.3. Los patrones de restricción obtenidos se visualizaron en geles de acrilamida al 12%, teñidos con Bromuro de etidio, detectando los fragmentos de restricción por fluorescencia.

**Tabla 5.11 Resultados de Genotipo obtenidos de muestras con VHB**

MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO
HB002	F1	B1148	F1
HB009	F2	B1149	X
HB013	F1	B1150	F1
HB023	F2	B1151	X
HB024	F2	B1152	F1
HB025	F2	B1153	F1
HB027	F2	B1157	F1
HB039	F1	B1163	F1
B1004	F1	B1165	F1
B1005	F1	B1166	F1
B1019	F1	B1167	F1
B1021	F1	B2006	F1
B1054	F2	B2007	F1
B1056	F1	B2016	X
B1057	F1	B2017	X
B1067	X	B2071	F1
B1069	X	B2077	F1
B1071	F1	B2078	F1
B1080	X	B2080	X
B1131	F1	B2081	F2
B1142	X	B2082	F2
B1144	F1	B2083	X
B1145	F1	B2084	X
B1146	F1	B2085	X
B1147	F1	B2087	X

La Figura 5.13. muestra los tres patrones de restricción obtenidos de la digestión del fragmento de ADN (de 479 pb) con las enzimas de restricción Ava II y Mbo I; los patrones mostrados pertenecen a los genotipos F1, F2 y un patrón diferente a los patrones reportados por Lindh, al cual se le llamo "X". En la tabla 5.11 se presentan los resultados obtenidos de las muestras procesadas para el Genotipo.

Los PM de los patrones de restricción obtenidos se calcularon con el programa TotalLab v1.10, utilizando como estandar el marcador para ADN de pesos moleculares VIII pUCBM21 / HpaII / DraI plus Hind III. ver Figura 5.13; los diferentes PM de los fragmentos de restricción obtenidos por los cortes con las enzimas de restricción utilizadas, nos permiten conocer el genotipo presente en cada muestra, al compararlos con el algoritmo que Lindh y cols reportan ver Tabla 5.10.

La prevalencia de los genotipos obtenida en este trabajo fue de 58.8 % para el genotipo F1, 25.4% para el genotipo X y 15.6% para el genotipo F2 ver Tabla 5.12. de frecuencias.

**TABLA 5.12. Valores de Frecuencia de los Genotipos encontrados por PCR-RFLP's**

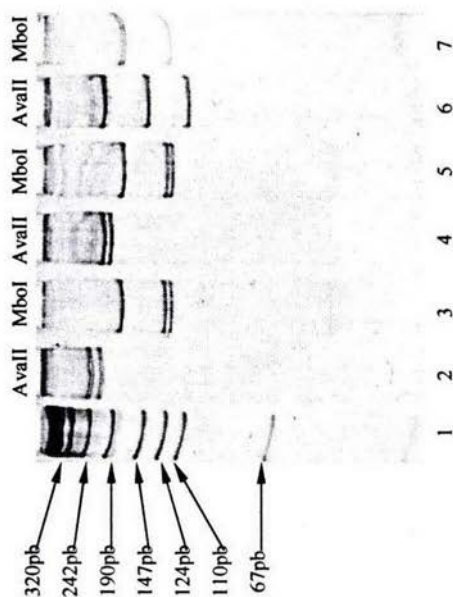
Genotipo	Frecuencias %
F1	58.8 (30)
F2	15.6 (8)
X	25.4 (13)
Total de muestras trabajadas: 51	

**TABLA 5.10 RFLP's del segmento entre el nucleotido 2823 y 80 de la Región pre-S del VHB, generados por la acción de las enzimas Ava II y Mbo I (Lindh 1998). \***

Genotipo	Ava II	2864	2871	2943	2982	3000	3043	3152	43	PM de Mbo I fragmentos generados (pb)	Sitio de restricción	2843	2931	2943	2962	3000	3035	3043	3124	28	PM de RFLP's de fragmentos generados (pb)	de RFLP's pre-S (combinan do ambas pruebas de enzimas)
F	Sitio de restricción										Sitio de restricción											
Fragmento de PCR de 479 pb.		X																				
							X			258, 221.				X							180, 126, 121, 52.	F1
								X		221,149, 109.				X							180, 126, 121, 52.	F2

\*Solo se muestran los RFLP's del genotipo F, por ser el único genotipo encontrado en este trabajo.

**FIGURA 5.13. RFLP's obtenidos de un segmento de la región pre-S del VHB.** Patrones de restricción obtenidos de la digestión del fragmento de ADN (de 479 pb) con las enzimas de restricción Ava II y Mbo I. Obteniendo los genotipos F1 (líneas 2 y 3), F2 (líneas 5 y 6) y un patrón diferente a los patrones reportados por Lindh, al cual se le llamo "X" (líneas 4 y 7).



- 1: marcador de PM VIII.
- 2: bandas de 258 y 221 pb, obtenidas con enzima de restricción (ER) AvaII.
- 3: bandas de 180, 126, 121 y 52 pb, obtenidas con ER MboI.
- 4: bandas de 209, 190 y 44 pb, obtenidas con ER AvaII.
- 5: bandas de 180, 126, 121 y 52 pb, obtenidas con ER MboI.
- 6: bandas de 221, 149 y 109 pb, obtenidas con ER AvaII.
- 7: bandas 183, 178 y 124 pb, obtenidas con ER MboI.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se estandarizó el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa competitiva (PCR) para la cuantificación del VHB; así como el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) para la genotipificación del mismo, utilizando muestras de pacientes con HBsAg positivo por el método de ELISA.

El método de extracción de ADN viral de elección fue el método de Proteinasa K/Fenol el cual se comparó con el método de NaOH, y un método comercial GENE PURE.

Con el método de Proteinasa K/Fenol se logró una extracción y purificación de ADN mejor que con el método de NaOH y el Estuche GENEPURE. Con el método de NaOH no se obtuvo ADN viral en muestras con cantidades bajas de este, ver Figura 5.1 –figura mostrada en resultados-, donde se observa la amplificación de muestras con bajas cantidades de ADN obtenidas con el método de Proteinasa K/Fenol y no así con el método de NaOH; esto pudo deberse a varios factores, como son, el volumen de la muestra que se ocupa para la extracción con NaOH, el cual es de 10 $\mu$ L, en comparación con el volumen de 200 $\mu$ L utilizado para el método de Proteinasa K/Fenol, pues resulta lógico recuperar más ADN viral si se utiliza un volumen más grande; otro factor importante es la obtención del ADN viral relativamente crudo con el método de NaOH, es decir se libera el ADN del virus, pero este no está totalmente purificado, debido a que puede contener proteínas y sales pudiendo causar interferencias o incluso la inhibición de la PCR, mientras que con Proteinasa K/Fenol se obtiene un ADN puro, con menor riesgo de presentar interferencias con alguna sustancia o compuesto que contenga el suero del paciente, además el ADN se puede almacenar y volver a utilizar, cosa que no sucede con el método de NaOH.

Con el Estuche comercial GENE PURE se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por el método de NaOH; pero con una ventaja que no presenta el método de NaOH, con este método el ADN viral obtenido es puro y se puede volver a reutilizar, como con el método de Proteinasa K/Fenol, pero la desventaja del estuche PUREGENE es su costo.

Como se puede observar aunque el método de Proteinasa K/Fenol es un método que presenta algunos inconvenientes como son: requerir de varias horas para su procesamiento, y la toxicidad del fenol; fue el método más sensible, obteniendo cantidades más bajas de ADN del VHB, en comparación con los otros métodos.

Para la estandarización de la PCR para el VHB se probaron dos pares de iniciadores, los cuales en la bibliografía muestran resultados óptimos con buena sensibilidad y especificidad; estos iniciadores amplifican regiones altamente conservadas por lo cual con muestras de pacientes sanos no causaron falsos positivos.

El par de iniciadores HBV 252 y HBV 428R, amplificaron una región de 195 pb que codifica para el gen S del VHB, secuencia obtenida al analizar el genoma del VHB en el Gene Bank de NCBI y encontrar la región más conservada del virus; también amplificaron otra región la cual solo se observó en plasmias positivos, por lo que se consideró que es causada por la unión de los iniciadores con otra región del VHB; aunque para fines diagnósticos no afecta la especificidad de la prueba para la PCR cuantitativa competitiva no se podrían utilizar, ya que se tendría un fenómeno de competencia múltiple.

Por este motivo se decidió utilizar los iniciadores HBV+ y HBV-, los cuales amplifican un fragmento del gen C (1814nt – 2450nt) de 181pb, que codifica para la proteína de core, los cuales presentaron una buena sensibilidad y especificidad, no presentaron amplificaciones inespecíficas con otras regiones del VHB, así como tampoco hubo amplificaciones en muestras de pacientes sanos; por lo tanto fueron los iniciadores más apropiados para el desarrollo de la técnica de PCR cuantitativa competitiva.

Con los marcadores serológicos HBsAg y HBeAg reportados en las historias clínicas de los pacientes y los resultados de PCR cualitativa se pudo realizar una tabla comparativa entre estos marcadores serológicos y al ADN viral, Ver Tabla 6.1

**TABLA 6.1 Comparación entre la serología de los pacientes  
y los resultados de ADN viral.**

	HBsAg		HBeAg	
	+	-	+	-
AND-VHB Positivo	26/48	0/48	13/16	0/16
ADN -VHB Negativo	16/48	6/48	2/16	1/16

El análisis de la tabla 6.1 muestra distintos perfiles que presentan los pacientes con infección por el VHB:

1. No se observaron resultados positivos de ADN-VHB en pacientes con HBsAg y HBeAg negativos, lo que nos muestra un perfil común de la infección.
2. Se observaron 16 casos de pacientes positivos al antígeno de superficie y negativos al ADN-VHB, esto puede explicarse por el hecho de que existen partículas no infecciosas como las circulares y filamentosas presentes en circulación, las cuales solo contienen al HBsAg; Este perfil también se presenta en individuos vacunados.

3. Otro caso relevante es la presencia de HBeAg sin ADN viral. El HBeAg tiene una excelente relación con la presencia de replicación viral y siempre debe de ser manejada junto con los marcadores anti-HBe y ADN viral; este perfil solo se presenta en un caso, esto puede deberse a reacciones cruzadas o por el tiempo que transcurrió desde la prueba de HBeAg hasta la detección del ADN viral, en el cual pudo ocurrir una seroconversión a anti-HBe, por lo cual el virus ya no se replicó y por lo tanto no se observó la presencia del ADN viral. Se sabe que en el transcurso de 2 meses aproximadamente, el HBeAg puede desaparecer, dando lugar al período de convalecencia, el cual podría ser corroborado con la determinación de Anti-HBe. Esta es una de las razones por las cuales es indispensable que los pacientes a los que se les realice PCR para la detección del ADN viral, tengan un estudio serológico completo.

La cuantificación del ADN del VHB tiene una relevancia clínica importante en el monitoreo de la terapia antiviral, la determinación de la infecciosidad y para la resolución inusual o las discrepancias de los perfiles serológicos (Berger, 1998), es por eso que se decidió estandarizar el método de PCR cuantitativa competitiva para carga viral del VHB, el cual nos proporcionó el número de moléculas de ADN/ mL de plasma de pacientes infectados.

El método de PCR cuantitativa competitiva requiere de un Control Interno Cuantitativo (CIC), el cual permite cuantificar el número de moléculas de ADN/mL que presenta una muestra, y también indica la existencia de inhibición en las muestras procesadas.

El CIC tiene una secuencia homóloga a la secuencia del fragmento diagnóstico (181pb), pero con una deleción de 25pb, resultando un fragmento de 156pb, el cual se amplifica con los mismos iniciadores con los que se amplifica el fragmento diagnóstico, por lo tanto al observar las amplificaciones en la electroforesis, se observan dos bandas con diferentes PM las cuales presentan una densidad óptica con la cual se cuantificaron las muestras.



Para la cuantificación del VHB se tuvieron que manejar dos diluciones de CIC: un CIC bajo de  $1 \times 10^4$  copias de ADN/mL, con el cual se pudieron cuantificar muestras con carga viral baja, entre 100 y 1000 copias ADN/mL; y un CIC alto de  $1 \times 10^6$  copias ADN/mL, con el cual se cuantificaron muestras con carga viral alta, de más de 10,000,000 copias ADN/mL, asegurando con estas dos diluciones la competición de los iniciadores por el ADN viral y el ADN del CIC. El motivo por el cual se trabajó con estas dos diluciones fue debido a que los valores de carga viral de VHB manejan un intervalo muy amplio de 2 – 8 Logaritmos, y sería imposible cuantificar carga virales muy altas o bajas con un solo control.

La reproducibilidad del método de PCR cuantitativa competitiva es buena, al obtener un coeficiente de varianza para el CIC alto ( $1 \times 10^6$  copias de CIC) de 23.9% y de 11.7% para el CIC bajo ( $1 \times 10^4$  copias de CIC), tomando en cuenta que los métodos comerciales reportan que los valores de CV menores 25% son aceptables. El método mostró una linealidad a lo largo de 6 logaritmos (2-8 Log) obteniendo una correlación de 0.9269. El límite de detección del método es de 125 copias de ADN/mL de plasma o 2.0 log de copias de ADN/mL de plasma, con estos datos estadísticos podemos decir que el método está estandarizado y puede utilizarse como prueba diagnóstica.

Con base en los resultados obtenidos se puede decir que el VHB presenta niveles de cargas virales elevados entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^9$  de copias de ADN/mL de plasma, característica propia de este tipo de infección, y que representa un gran problema de salud pública por ser un foco de infección.

El genotipo del VHB es importante para la evaluación etiológica y de relevancia clínica, estudiando el impacto de la variabilidad genética en el curso de la infección o para rutinas de investigación, por lo que el método utilizado PCR-RFLP's es un sistema de genotipificación fácil de interpretar y económico (Mizokami, 1999).

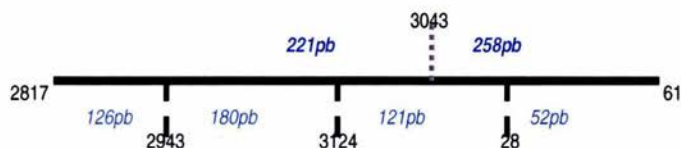
Para el estudio del genotipo se amplificó un fragmento de 479 pb de la región pre-S ( 2823nt – 80nt) del VHB, el cual fue digerido con las endonucleasas Ava II y Mbo I.

Para poder analizar los genotipos obtenidos por PCR-RFLP's, es necesario recordar que en el Continente Americano solo han sido reportados los genotipos D y F (Lindh 1998); y en este estudio solo identificamos el genotipo F que es el que prevalece en el centro y sub-América.

Continuando con este análisis es necesario construir los diagramas correspondientes a los RFLP's, por lo que se realizaron los siguientes esquemas.

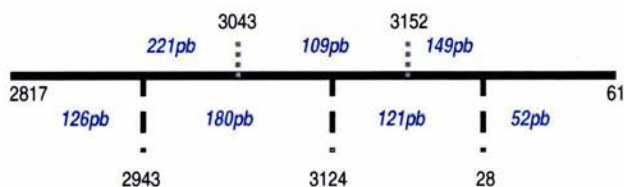
En el Esquema 6.1 se observa el mapa de restricción del genotipo F1. La enzima de restricción (ER) Ava II corta en un solo sitio en todo el fragmento amplificado (479pb), en la posición 3043pb del ADN del VHB dando dos grandes fragmentos de 221 y 258pb; y la ER Mbo I corta en tres sitios del fragmento, en 28, 3124 y 2943 pb generando cuatro fragmentos de 121, 52, 180 y 126 pb. Los RFLP's generados por el corte con Mbo I no son específicos de F1, ya que Mbo I corta en la misma posición en todos los subgenotipos F, por lo tanto Mbo I solo nos indica de que genotipo se trata, mientras que Ava II nos proporciona el sub-genotipo, ya que esta enzima corta en diferentes sitios en el genotipo F1 y F2. Ver Figura 5.13 –figura mostrada en resultados-.

**ESQUEMA 6.1. Mapa de restricción del genotipo F1 para las enzimas de restricción Ava II y MboI.** Línea negra fragmento de 479pb obtenido de amplificación con los iniciadores P1 y P2; línea punteada, sitio de corte de Ava II; líneas discontinuas sitios de corte de Mbo I. Números con azul fragmentos obtenidos.



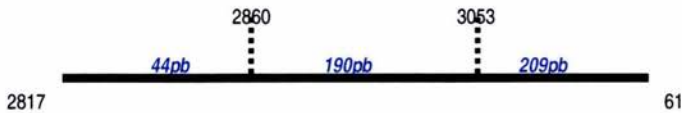
En el Esquema 6.2. se muestra el mapa de restricción del genotipo F2. El primer patrón que se observa es el que se obtiene con la ER Ava II, la cual corto dos sitios en la posición 3152 y 3043 pb obteniendo tres fragmentos de restricción (149, 109 y 221) que son específicos para el genotipo F2; mientras que Mbo I corta tres sitios en 28 – 3124 -2943pb obteniendo cuatro fragmentos iguales a los del genotipo F1. Ver Figura 5.13 –figura mostrada en resultados-.

**ESQUEMA 6.2. Mapa de restricción del genotipo F2 para las enzimas de restricción Ava II y Mbo I.** Línea negra fragmento de 479pb obtenido de amplificación con los iniciadores P1 y P2; líneas punteadas, sitios de corte de Ava II; líneas discontinuas sitios de corte de Mbo I. Números con azul fragmentos obtenidos.



Como se observa en la Figura 5.12 (figura mostrada en resultados), se encontró un patrón de RFLP's diferente a los reportados en la literatura (Lindh 1998), lo cual fue confirmado con las dos enzimas de restricción; obteniendo este patrón en varias muestras, ver Tabla 5.12. (tabla mostrada en resultados). Los sitios que corto la ER Ava II están en la posición 3053 y 2860pb dando tres fragmentos de 209, 190 y 44 pb; la ER Mbo I corto dos sitios a largo del fragmento de 479pb del ADN viral, dando tres fragmentos de restricción de 183, 178 y 124 pb. Ver Esquema 6.3.

**ESQUEMA 6.3. Mapa de restricción del genotipo X, con la enzima de restricción *Ava* II.** Para la enzima *Mbol* no se encontraron los sitios de corte en el fragmento de 479pb amplificado –según el mapa genómico del VHB reportado en el Gene Bank del NCBI-. Línea negra fragmento de 479pb obtenido de amplificación con los iniciadores P1 y P2; líneas punteadas, sitios de corte de *Ava* II. Números con azul fragmentos obtenidos.



Estos RFLP's fueron comparados con la secuencia de un nuevo genotipo (genotipo H), reportado por Arauz-Ruiz y cols, con el cual tampoco coincide, ya que no se encontraron los sitios de corte de las enzimas en las posiciones antes mencionadas. Hasta este momento con la investigación realizada en este proyecto no podemos decir que se trata de un nuevo genotipo, ya que sería necesario secuenciar el ADN viral, de las muestras con el patrón denominado X.

En base a los resultados obtenidos por PCR-RFLP podemos observar que el genotipo F1 predomina con un 58.8%, siguiendo de el patrón de restricción desconocido con un 25.4% y en ultimo lugar el genotipo F2 con un 15.6%, solo en el D.F., estos datos pueden ser de utilidad en estudios epidemiológicos y en el monitoreo de la terapia antiviral.

Estos métodos serán de gran utilidad en el área clínica. PCR cuantitativa competitiva para carga viral del VHB, como prueba diagnostica, que en combinación con los marcadores serologicos es útil para la resolución de perfiles inusuales y para el seguimiento de la terapia antiviral. El método de PCR-RFLP's para el genotipo del VHB, es de utilidad a nivel epidemiológico, pues se conocerá el estado actual de la población y se podría predecir las consecuencias de esta enfermedad –cirrosis y cáncer– además de ser un método fácil de procesar y económico.

Estos métodos pueden ser empleados en instituciones de Salud Pública, debido a su bajo costo en material y equipo, beneficiando a un alto número de pacientes que padecen esta enfermedad, los cuales tienen que realizarse periódicamente estas pruebas para el seguimiento de su tratamiento.

## 7. CONCLUSIONES

- Se cumplió con los objetivos planteados al establecer un método completo para la cuantificación y genotipificación del VHB, método que será de gran utilidad en el diagnóstico, en el seguimiento de la terapia antiviral y en estudios epidemiológicos.
- El método de Proteinasa K/Fenol es el método estandarizado para la extracción y purificación del ADN del VHB, al presentar una mejor sensibilidad en comparación con otros métodos.
- Los iniciadores idóneos para la estandarización de la PCR cualitativa del VHB son HBV+ y HBV-, los cuales amplifican una región conservada de 181 pb, del gen C del virus y no amplifican regiones inespecíficas del virus.
- Se construyó un CIC (156pb), semejante al fragmento diagnóstico (181pb), útil para cuantificación del ADN viral, por medio de una PCR cuantitativa competitiva; para determinar la carga viral del VHB presente en el plasma de pacientes infectados.
- El método de PCR cuantitativa competitiva requirió de dos diluciones de CIC (un CIC bajo de  $1 \times 10^4$  copias de ADN/mL y un CIC alto de  $1 \times 10^6$  copias ADN/mL) para la adecuada cuantificación del VHB.
- El método de PCR cuantitativa competitiva mostró una linealidad a lo largo de 6 logaritmos (2-8 Log) y un límite de detección de 125 copias de ADN/mL.
- Un parámetro característico del VHB es que en la mayoría de los casos, la carga viral de los pacientes infectados, presentan cargas virales muy elevadas que oscilan entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^9$  copias ADN/mL.

- Los iniciadores idóneos para la estandarización de la PCR para el genotipo del VHB, son P1 y P2, los cuales amplifican una región del gen pre-S del virus, de 479 pb.
- La estandarización del método de RFLP se realizó con las enzimas de restricción Ava II y Mbo I, obteniendo tres patrones diferentes; F1, F2 y un patrón desconocido.
- El patrón de restricción desconocido no puede considerarse como un nuevo genotipo, hasta no realizar estudios subsecuentes.
- Con base en los resultados obtenidos en este estudio, de las muestras obtenidas del 2000-2002 de pacientes con HBAGs (+) del D.F., podemos concluir que la mayoría de los pacientes infectados con VHB presentan cargas virales elevadas que oscilan entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^9$  copias de ADN/mL, así como el predominio del genotipo F.

## 8. REFERENCIAS.

1. Arauz-Ruiz P, et. al. GENOTYPE H: A NEW AMERINDIAN GENOTYPE OF HEPATITIS B VIRUS REVEALED IN CENTRAL AMERICA. Journal Genetic Virology. Agosto, 2002. 83(Pt 8). Pag 2059-2073
2. Arauz-Ruiz et.al. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS B VIRUS IN CENTRAL AMERICA REFLECTED IN THE GENETIC VARIABILITY OF THE SMALL S GENE. Journal of Infectious diseases, núm 176, noviembre 1997 pág. 851-858.
3. Barrera Saldaña, Ortiz López, Rojas Martínez, Resendez Perez. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA. Ciencia Y Desarrollo. 1993. pag. 50-60.
4. Berger A., Braner J., Wilhelm H., Weber B.. QUANTIFICATION OF VIRAL LOAD: CLINICAL RELEVANCE FOR HUMAN INMUNODEFICIENCY VIRUS, HEPATITIS B VIRUS AND HEPATITIS C VIRUS INFECTION. Intervirology. 1998. 41. pag24-34.
5. Birnbaum F., Nassal M. HEPATITIS B VIRUS NUCLEOCAPSID ASSEMBLY: PRIMARY STRUCTURE REQUIREMENTS IN THE CORE PROTEIN. Journal of Virology. Vol 64. Num. 7. 1990. pag 3319-3330.
6. Bruss V., Gerlich W. FORMATION OF TRANSMEMBRANEOUS HEPATITIS B e- ANTIGEN BY COTRANSLATIONAL IN VITRO PROCESSING OF VIRAL PRECORE PROTEIN. Virology, 163. 1988. p 268-275.
7. Budkowska A., Bedossa P., Groh F., Louuise A., Pillop J. FIBRONECTIN OF HUMAN LIVER SINUSOIDS BINDS HEPATITIS B VIRUS: IDENTIFICACIÓN BY AN ANTI-IDIOTYPIE ANTIBODY BEARING THE INTERNAL IMAGE OF THE PRE-S2 DOMAIN. Journal of Virology. Vol. 64 Num 2. 1995. p 840-848.
8. Carretero M., Gómez M., Lara E., Benedicto I., Aramburu J., Martínez S., Redondo J., López M. THE HEPATITIS B VIRUS X PROTEIN BINDS TO AND ACTIVATES THE NH<sub>2</sub>-TERMINAL trans-ACTIVATION DOMAIN OF NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T CELLS-1. Virology. Vol 299. 2002. p 288-300.
9. Chan Henry L. Y., Hussain M. and Lok S.F. DIFFERENT HEPATITIS B VIRUS GENOTYPE ARE ASSOCIATED WITH DIFFERENT MUTATIONS IN THE CORE PROMOTER AND PRECORE REGIONS DURING HEPATITIS B E ANTIGEN SEROCONVERSION. Hepatology 1999, vol 29. pag. 976-984.
10. Ding, et. al. HEPATITIS B VIRUS GENOTYPE DISTRIBUTION AMONG CHRONIC HEPATITIS B VIRUS CARRIERS IN SHANGHAI, CHINA. Intervirology. 2001. 44. pag 43-47.
11. Chen T., Luk J., Cheung S., Yu W., Fan S. EVALUATION OF QUANTITATIVE PCR AND BRANCHED-CHAIN DNA ASSAY FOR DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS DNA IN SERA FROM HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND LIVER TRANSPLANT PATIENTS. Journal of Clinical Microbiology. Vol 38 Num 5. 2000. p 1977-1980.
12. Cheng Chi K., Smith G., Moss Bernard. HEPATITIS B VIRUS LARGE SURFACE PROTEIN IS NOT SECRETED BUT IS IMMUNOGENIC WHEN SELECTIVELY EXPRESSED BY RECOMBINANT VACCINIA VIRUS. Journal of Virology. Vol 60. Num 2. 1986. p 337-344.
13. Enders G., Ganem D., Varmus H. 5'-TERMINAL SEQUENCES INFLUENCE THE SEGREGATION OF GROUND SQUIRREL HEPATITIS VIRUS RNAs INTO POLYRIBOSOMES AND VIRAL CORE PARTICLES. Journal of Virology. Vol. 61. 1987. pag. 35-41.
14. Epidemiología. SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA. Hepatitis viral tipo B, núm 24, vol. 18 semana 24, pag 1-3



15. Fields B. N., DM Knipe. VIROLOGY. Philadelphia.1996. pag. 2739-2761.
16. Flodgren Erik, Bengtsson S., Knutsson M., Strebkova A.E., Kidd H. A., Alexeyev A. O. and Kidd-Ljunggren K. RECENT HIGH INCIDENCE OF FULMINANT HEPATITIS IN SAMARA, RUSSIA: MOLECULAR ANALYSIS OF PREVAILING HEPATITIS B AND D VIRUS STRAINS. Journal of Clinical Microbiology. Vol 38 No. 9. 2000 Sept. pag. 3311-3316.
17. Gerken, J. Gomes, et. al. CLINICAL EVALUATION AND APPLICATIONS OF THE AMPLICOR VHB MONITOR TEST. A QUANTITATIVE VHB AND PCR ASSAY. Journal of Virological Methods. Vol. 74. mayo 1998. pág. 155-165.
18. Gerlich W., Luer W., Thomssen R. DIAGNOSIS OF ACUTE AND INAPPARENT HEPATITIS B VIRUS INFECTIONS BY MEASUREMENT OF IgM ANTIBODY TO HEPATITIS B CORE ANTIGEN. Journal Infectious Diseases. Vol 142. num 1. 1980. p 95-101.
19. Gyoo S., Oe S., Jung G. BINDING SITE ANALYSIS OF HUMAN HBV FOR MOLECULAR CHAPERONIN, Hsp60. Virology 298. 2002. pag.116-123.
20. Gutfreund Klaus S., et. al. GENOTIPIIC SUCCESSION OF MUTATIONS OF THE HEPATITIS VIRUS POLYMERASE ASSOCIATED WITH LAMIVUDINE RESISTANCE. Journal of Hepatology. Vol. 33. February 2000. pag. 469-475.
21. Hämmerle T., M. Himmelspach. et al. A sensitive PCR assay system for the quantitation of viral genome equivalents: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and hepatitis B virus (HBV). Archives of Virology. 1997. Vol 142. pag 1297-1306.
22. Heinz Fraenkel Conrat, Paul C, Kimball. VIROLOGY. 2da. Edición. Prentice may
23. Henry J. DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO CLINICOS POR EL LABORATORIO. 9 edición. Salvat. México 1993. pag 250-254, 942-945.
24. Heermann K., Goldmann U., Schwartz W., Seyffart T., Baumgarten H., Gerlich W. LARGE SURFACE PROTEINS OF HEPATITIS B VIRUS CONTAINING THE PRE-S SEQUENCE. Journal of Virology. Vol 52. Num 2. 1984. p 396-402.
25. Hirsch R., Lavine J., Chang L., Varmus H., Gamen D. POLYMERASE GENE PRODUCTS OF HEPATITIS B VIRUSES ARE REQUIRED FOR GENOMIC RNA PACKAGING AS WENN AS FOR REVERSE TRANSCRIPTION. Nature. Vol 344. 1990. p 552-555.
26. Hoelzel A. R. MOLECULAR GENETIC ANÁLISIS OF POPULATIONS. 2da. Edición. The Prectical Approach Series (PAS) 1998.
27. Hwang S., Lee S., Lu R., Chan C., Lai L., Co R., Tong M. COMPARISON OF THREE DIFFERENT HYBRIDIZATION ASSAYS IN THE QUANTITATIVE MEASUREMENT OF SERUM HEPATITIS B VIRUS DNA. Journal of Virological Methods. Vol 62. 1996. p 123-129.
28. Instituto de Biotecnología CICB/INTA. BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA A LA TUBERCULOSIS. Primer curso internacional UNV/BIOAC. Octubre, 1996
29. Kaneko Shiuchi, Stephen M. Feinstone. Rapid and Sensitive Method for the Detection of Serum Hepatitis B virus ADN Using the Polymerase Chain Reacyon Techique. J. Clinical Microbiology. Vol 27 No. 9. 1989. p 1930-1933.
30. Karp Gerald. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR. 2da. Edición. Mc Graw-Hill Interamericana. México D.F. 1998. pag 434-463.
31. Klein Athalia, Rima Barsuk, Shlomo Dagan. COMPARACIÓN OF METHODS FOR EXTRACTION OF NUCLEIC ACID FROM HEMOLYTIC SERUM FOR PCR AMPLIFICATION OF HEPATITIS B VIRUS ADN SEQUENCES. J. Clinical Microbiology. July 1997. vol.34 no.12 p3085-309.

32. Kock J., Schlicht H. ANALYSIS OF THE EARLIEST STEPS OF HEPADNAVIRUS REPLICATION: GENOME REPAIR AFTER INFECTIOUS ENTRY INTO HEPATOCYTES DOES NOT DEPEND ON VIRAL POLYMERASE ACTIVITY. Journal of Virology. Vol. 67. Num. 8. 1993. pag. 4867-4874.
33. Lefrere Jean-Jacques, Cantaloube J., Defer C., Mercier B, Loiseau P., Vignon D., Pawlowsky J., Biagini P., Lerable J., Rouger P., Roudot-Thoraval F., Ferec C. SCREENING FOR HBV, HCV ABD HIV GENOMES IN BLOOD DONATIONS: SHORTCOMINGS OF POOLING REVEALED BY MULTICENTRE STUDY SIMULATING REAL-TIME TESTING. Journal of Virological Methods. Vol 80, 1999. pag. 33-44.
34. Lien J., Aldrich C., Mason W. EVIDENCE THAT A CAPPED OLIGORIBONUCLEOTIDE IS THE PRIMER FOR DUCK HEPATITIS B VIRUS PLUS-STRAND DNA SYNTHESIS. Journal of Virology, Vol. 57 Num. 1. 1986. pag. 229-236.
35. Lindh Magnus, et al. Genotyping of Hepatitis B Virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. Journal of Virological Methods. 1998. Vol 72. pag.163-174.
36. MacDonald D., Holmes E.; Lewis J., Simmonds P. DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS INFECTION IN WILD-BORN CHIMPANZEES (*Pan troglodytes verus*): PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS WITH HUMAN AND OTHER PRIMATE GENOTYPES. Journal of Virology. Vol. 74. Num 9. 2000. p 4253-4257.
37. Maldonado-Jimenez. BIOLOGIA MOLECULAR EN MEDICINA. UTEHA. Noriega Editores. 1998.
38. Mendl H., Kaplan M., Yasar A., Yang X., Bayer R., Sutherland K., Peepues M. HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN BINDS TO APOLIPOPROTEIN H. Journal Of Virology. 1994. Vol. 68. Num. 4 pag 2415-2424.
39. Mendl H., Yang X., Peepues M. AN ALTERED FORM OF APOLIPOPROTEIN H BINDS HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN MOST EFFICIENTLY. Journal of Virology. vol. 217. 1996. pag. 58-66.
40. Méndez Sánchez N. et al. Prevalencia de la Hepatitis B y C en donadores de sangre en el Hospital de tercer nivel de la Ciudad de México. Salud Pública de México. 1999, pag, 3-24.
41. Mbayen V.A., et.al., DISTRIBUTION OF HEPATITIS B VIRUS GENOTYPES IN TWO DIFFERENT PEDIATRIC POPULATIONS FROM ARGENTINA. Journal of clinical microbiology, vol.36, núm. 11, noviembre 1998, pag. 3362-3365.
42. Microbiología Clínica en la WWW. Virología. Diagnóstico serológico de Hepatitis B.
43. Mizokami, et. al. HEPATITIS B VIRUS GENOTYPE ASSIGNMENT USING RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM PATTERNS. FEBS Letters. 1999. num.450. pag 66-71.
44. Miyahara A., Imamura t., Araki m., Sugawara K., Ohtomo N., Matsubara K. EXPRESIÓN OF HEPATITIS B VIRUS CORE ANTIGEN GENE IN *Saccharomyces cerevisiae*: SYNTHESIS OF TWO POLYPEPTIDES TRANSLATED FROM DIFFERENT INITIATION CODONS. Journal of Virology. Vol. 59. 1986. p 176-180.
45. Naito Hideo, et. al. RAPID AND SPECIFIC GENOTYPING SYSTEM FOR HEPATITIS B VIRUS TO SIX MAJOR GENOTYPES BY PCR USING TYPE-SPECIFIC PRIMERS. Journal of Microbiology. Vol 39. no.1. Jan 2001. pag. 362-364.
46. Nagata Ikuo, Colucci G., Gregorio V. G., Cheeseman P., Williams R., Mieli-Vergani G. and Vergani D. THE ROLE OF HBV DNA QUANTITATIVE PCR IN MONITORING THE RESPONSE TO INTERFERON TREATMENT IN CHRONIC HEPATITIS B VIRUS INFECTION. Journal Hepatology, 1999 Jun, 30(6). Pag. 965-969.
47. Noppompanth S., Haagmans B., Bhallarakosol P., ratanakom P., Niesters H., Osterhus A., Poovorawan Y. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF GIBBON HEPATITIS B VIRUS TRANSMISSION. Journal General Virology. Vol. 84. 2003. pag. 147-154.

48. Norder Helene, et. al. TYPING OF HEPATITIS B VIRUS GENOMES BY A SIMPLIFIED POLYMERASE CHAIN REACTION. Journal of Medical Virology. 1990. num.31. pag 215-221.
49. Paulij W., Wit P., Sunnen C., Roosmalen M., Ettekooven A., Cooreman M., Heijtkink R. LOCALIZATION OF A UNIQUE HEPATITIS B VIRUS EPTOPE SHEDS NEW LIGHT ON THE STRUCTURE OF HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN. Journal General Virology. Vol 80. 1999. p 2121-2126.
50. Pawlotsky Jean-Michel, Bastie A., Hézode C., Lonjon I., Darthuy F., Rémiré J., Dhumeaux D. ROUTINE DETECTION AND QUANTIFICATION OF HEPATITIS B VIRUS DNA IN CLINICAL LABORATORIES: PERFORMANCE OF THREE COMMERCIAL ASSAYS. Journal of Virological Methods. Vol. 85, 2000, pag. 11-21.
51. Persing David y cols. DIAGNOSTIC MOLECULAR MICROBIOLOGY PRINCIPIES Y APPLICATIONS. Tomo II. American Society for Microbiology. 1993. p 26-39.
52. Pollack J., Ganem D. SITE-SPECIFIC RNA BINDING BY A HEPATITIS B VIRUS REVERSE TRANSCRIPTASE INITIATES TWO DISTINCT REACTIONS: RNA PACKAGING AND DNA SYNTHESIS. Journal of Virology. Vol. 68. Num 9. 1994. p 5579-5587.
53. Pontisso P., Grazia M., Gerlich W., Heermenn K., Bardini R., Alberti A. IDENTIFICATION OF AN ATTACHMENT SITE FOR HUMAN LIVER PLASMA MEMBRANES ON HEPATITIS B VIRUS PARTICLES. Journal General Virology. Vol. 173.1989. p 522-530.
54. Poo Jorge Luis, Sánchez, Uribe. TODO SOBRE LA HEPATITIS C. Lomsa Comunicación, México, D.F. 2001.
55. Preisler-Adams Sabine, et. al. SEQUENSE ANALISIS OF HEPATITIS B VIRUS DNA IN IMMUNOLOGICALLY NEGATIVE INFECTION. Archives Virology. 1993. Num.33. pag 385-396.
56. Puchhammer-Stockl, et. al. MONITORING THE VIRUS LOAD CAN PREDICT THE EMERGENCE OF DRUG-RESISTANT HEPATITIS B VIRUS STRAINS IN RENAL TRANSPLANTATION PATIENRS DURING LAMIVUDINE THERAPY. Journal of Infection Diseases. Vol. 181. mayo 2000. pag. 2063-2066.
57. Radziwill G., Tucker W., Schaller H. MUTATIONAL ANALYSIS OF THE HEPATITIS B VIRUS P GENE PRODUCT: DOMAIN STRUCTURE AND RNASE H ACTIVITY. Journal of Virology. Vol. 64. Num. 2. 1990. pag. 613-620.
58. Reifenberg K., Nusser P., Lohler J., Spindler G., Kuhn C., Weizsacker F., Kock J. VIRUS REPLICATION EXPORT IN X-DEFICIENT HEPATITIS B VIRUS TRASGENIC MICE. Journal General Virology. Vol 83. 2002. pag. 991-996.
59. Repp Reinald, Sabine Rhiel. Et al. Genotyping by Multiplex Polymerase Chaine Reaction for Detection of Endemic Hepatitis B Virus Transmission. Journal of Clinical Microbiology. Mayo, 1993. Vol 31 num. 5. pag.1095-1102.
60. Roossinck M., Siddiqu A. IN VIVO PHOSPHORYLATION AND PROTEIN ANALYSIS OF HEPATITIS B VIRUS CORE ANTIGEN. Journal of Virology. Vol 61. Num 4. 1987. p- 955-961.
61. Ryu C. y cols. AN 80-KILODALTON PROTEIN THAT BINDS TO THE PRE-S1 DOMAIN OF HEPATITIS B VIRUS. Journal of Virology. Vol. 74. 2000 pag 110-116.
62. Seeger C., Ganem D., Varmus H. BIOCHEMICAL AND GENETIC EVIDENCE FOR THE HEPATITIS B VIRUS REPLICATION STRATEGY. Science. Vol.232. 1986. p 477-485.
63. Simpson P.R., X.H. Yu, et. al. QUANTIFICATION OF HEPATITIS B VIRUS ADN USIG COMPETITIVE PCR AND ASCINTILLATION PROXIMITY ASSAY. Journal of Virological Methods. Vol.69. sept.1997. pag. 197-208.

64. Stuyver Lieven, et.al. LINE PROBE ASSAY FOR MONITORING DRUG RESISTANCE IN HEPATITIS B VIRUS-INFECTED PATIENTS DURING ANTIVIRAL THERAPY., Journal of clinical microbiology, vol. 38, núm. 2, febrero 2000, pág. 702-707.
65. Su F., Lal C., Huang J., Lin L., Yauk Y., Chang C., Lo S., Han S. HEPATITIS B VIRUS TRANSCRIPT PRODUCED BY RNA SPLICING. Journal of Virology. Vol. 63. Num 9. 1989. p 4011-4018.
66. Tamarin R. PRINCIPIOS DE GENETICA. Reverté S.A. de C.V. 1996.
67. Tavis J., Massey B., Gong Y. THE DUCK HEPATITIS B VIRUS POLYMERASE IS ACTIVATED BY ITS RNA PACKAGING SIGNAL. Journal of Virology. Vol. 72. num 7. 1998. p 5789-5796.
68. Tavis J., Perre S., Ganem D. HEPADNAVIRUS REVERSE TRANSCRIPTION INITIATES WITHIN THE STEM-LOOP OF THE RNA PACKAGING SIGNAL AND EMPLOYS A NOVEL STRAND TRANSFER. Virology. Vol. 68. Num. 5. 1994. pag. 3535-3543.
69. Terre S., Tetit M., Brechot C. DEFECTIVE HEPATITIS B VIRUS PARTICLES ARE GENERATED BY PACKAGING AND REVERSE TRANSCRIPTION OF SPLICED VIRAL RNAs IN VIVO. Journal of Virology. Vol. 65. Num. 10. 1991. p 5539-5543.
70. Torresi J., Earnest-Silveira L., Deliyannis G., Edgton K., Zhuang H., Locarnini S., Fyfe T., Jackson D. REDUCED ANTIGENICITY OF THE HEPATITIS B VIRUS HBsAg PROTEIN ARISING AS A CONSEQUENCE OF SEQUENCE CHANGES IN THE OVERLAPPING POLYMERASE GENE THAT ARE SELECTED BY LAMIVUDINE THERAPY. Virology. Vol 293. 2002. p 305-313.
71. Tutteeman J., Pugh J., Summers J. IN VITRO EXPERIMENTAL OF PRIMARY DUCK HEPATOCYTE CULTURES WITH DUCK HEPATITIS B VIRUS. Journal of Virology. Vol 58. 1986. pag 17-25.
72. Urban M., McMillan D., Canning G., Newll A., Brown E., Millss J., Jupp R. IN VITRO ACTIVITY OF HEPATITIS B VIRUS POLYMERASE: REQUIREMENT FOR DISTINCT METAL IONS AND THE VIRAL EPSILON STEM-LOOP. Journal Genral Virology. Vol. 79. 1998. p 1121-1131
73. Wasenauer G., Kock J., Schlicht H. A CYSTEINE AND A HYDROPHOBIC SEQUENCE IN THE NONCLEAVED PORTION OF THE PRE-C LEADER PEPTIDE DETERMINE THE BIOPHYSICAL PROPERTIES OF THE SECRETORY CORE PROTEIN (Hbe PROTEIN) OF HEPATITIS B VIRUS. Journal of Virology. Vol. 66. Num 9. 1992. p 5338-5346.
74. Westland Chis, et. al. DISTRIBUTION AND CLINICAL RESPONSE OF HBV GENOTYPES IN PHASE III STUDIES OF ADEFOVIR DIPIVOXIL. The European Association for the Study of The Liver, Madrid, April 17-21. 2002. Poster num.273.
75. Will H., Reiser W., Weimer T., Pfaff E., Buscher M., Sprengel R., Cattaneo R., Schaller H. REPLICATION STRATEGY OF HUMAN HEPATITIS B VIRUS. Journal of Virology, Vol 61. Num 3. 1987. p 904-911.
76. Wu H., Chen P., Tu S., Lin M., Lal M., Chen D. CHARACTERIZATION AND GENETIC ANALYSIS OF ALTERNATIVELY SPLICED TRANSCRIPTS OF HEPATITIS B VIRUS IN INFECTED HUMAN LIVER TISSUES AND TRANSFECTED HepG2 CELL. Journal of Virology. Vol 65. Num 4. 1991. p 1680-1686.
77. Young J., Young E., Jin H., Lee C., Sung Y., Lib K. DUAL EFFECTS OF HEPATITIS B VIRUS X PROTEIN ON THE REGULATION OF CELL-CYCLE CONTROL DEPENDING ON THE STATUS OF CELLULAR p53. Journal of Virology. Vol. 83. 2002. pag. 2765-2772.

## 8.1 LISTA DE ABREVIATURAS.

- ADN: Acido desoxirribonucleico
- ALT: Alanina Amino Transferasa
- Anti-HBc: Anticuerpo de core del VHB
- Anti-Hbe: Anticuerpo e del VHB
- Anti-HBs: Anticuerpo de superficie del VHB
- BM: Biología Molecular
- CIC: Control interno cuantitativo
- CV: Coeficiente de varianza
- DO: Densidad óptica
- DS: Desviación estandar
- ELISA: Enzyme linked inmunoabsorbent assay
- ER: Enzima de restricción
- HBcAg: Antigenos de core del VHB
- HBeAg: Antígeno e del VHB
- HBsAg: Antígeno de superficie del VHB
- m.o: Microorganismo
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- nm: Nanómetro
- ORF's: Marcos de lectura abiertos
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- RFLP's: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos
- PEGE: Electroforesis de Campo Pulsado
- VHB: Virus de la hepatitis B

## 8.2 APENDICE DE REACTIVOS

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

1. NaOH 0.5M  
Para preparar 50 mL. Pesar 1.012g de NaOH y aforar a 50mL con agua bidestilada. Almacenar a temperatura ambiente.
2. HCl 0.5M  
Para preparar 50mL. Agregar 2.45mL. de HCl concentrado y aforar a 50mL con agua bidestilada. Almacenar a temperatura ambiente.
3. Buffer TE (Tris 25mM – EDTA 2.5mM) pH 7.8.  
Para preparar 200mL. pesar Tris-base (12.5mM) 0.30gr.; Tris HCL (12.5mM) 0.39gr. ; Acido tetrácetico etilendiamina (EDTA) (2.5mM) 0.184g; disolver con agitación en un vaso de precipitado con 100mL. de agua bidestilada y aforar a 200mL. con agua bidestilada. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.
4. SDS (lauril sulfato de sodio) al 10%.  
Para preparar 200mL, pesar 20g de SDS y disolver por agitación con 100mL. de agua bidestilada aforar a 200mL. con agua bidestilada y esterilizar por filtración. Almacenar a temperatura ambiente.
5. Proteinasa K (10mg/mL).  
Para preparar 5mL. pesar 50mg de proteinasa K y aforar a 5mL. con agua bidestilada. Alicuotar y mantener a  $-20^{\circ}\text{C}$  por más de un año
6. NaCl 5M.  
Para preparar 100mL, pesar 29.39g de NaCl y disolver 60mL de agua bidestilada poco a poco con agitación y calor, ya que este disuelto aforar a 100mL Esterilizar con vapor humedo. Almacenar a temperatura ambiente.
7. Etanol al 70%.  
Para preparar 100mL agregar 70mL de etanol y llevar a 100mL con agua bidestilada.

## 8. Solución de Tris a pH 8.0.

Para preparar 2000mL, se pesa:

\*157.64g de Tris-HCl (1M)

\*121.14g de Tris-base (1M)

Disolver con agitación en 1400mL. de agua bidestilada, ajustar el pH 8.0 con ácido clorhídrico concentrado, aforar a 2000mL. Esterilización por filtración y autoclave.

## 9. Fenol saturado (pH 8.0).

- Descongelar el fenol (grado biología molecular) en baño maria a 65 °C.
- Realizar lavados con agitación con la solución de tris pH 8.0 (cada lavado se efectúa con aproximadamente 250mL). Durante el primer lavado se agita por 15 min y los subsecuentes por 5 min
- En cada lavado esperar que las fases se separen por completo (favoreciendo esta separación metiendo el frasco de fenol al refrigerador).
- Ya separadas las fases, eliminar el Tris .
- En el quinto lavado se mide el pH del Tris extraído (esperar el tiempo necesario a que el pH de la solución se estabilice), debe alcanzar un pH mínimo de 7.8, (considerando el ideal como un pH de 8.0).
- Para evitar la oxidación del fenol es necesario dejar una capa de Tris pH 8.0 y adicionar 0.5 g de 8-hidroxiquinoleína, dando una última agitación.

NOTA: ALMACENAR EL FENOL SATURADO EN REFRIGERACIÓN A 4 °C.

## 10. Amortiguador 10X para la Taq DNA polimerasa.

Disolver 1.57g de Tris-HCl (0.1M), 0.30g de MgCl (0.015M) y 3.7g KCl (0.5M) en 100mL de agua bidestilada , y calibrar a pH=8.3.

## 11. Bromuro de etidio 10 mg/mL.

Disolver 100mg de bromuro de etidio en 10 mL de agua bidestilada estéril, usando guantes, guardar protegido de la luz.

## 12. Buffer TBE 10X

Disolver en agua bidestilada 108g de tris-base, 27.5g de ácido bórico y 6.8g de EDTA. Aforar a un litro, calibrar solución a pH= 8.3. Para preparar buffer TBE 1X adicionar de un volumen de buffer TBE 10X con nueve volúmenes de agua bidestilada. Para prepara buffer 0.5X adicionar 0.5 volumen de TBE 10X con 9.5 volúmenes de agua bidestilada.

13. Colorante para electroforesis.

Preparar una solución al 0.25% de azul de bromocresol y 0.25% de xilen-cianol en sacarosa al 40% en agua destilada (alternativamente se puede utilizar glicerol al 35% en lugar de sacarosa al 40%).

14. Acrilamida 38:2

Utilizando guantes, pesar 38g de acrilamida y 2g de bis-acrilamida y disolver en 70mL de agua bidestilada estéril, aforar a 100mL y guardar en frasco ambar. Algunos lotes de acrilamida no se disuelven totalmente, en ese caso es necesario filtrar papel Whatman antes de guardarla.

15. Persulfato de amonio 10%

Pesar 1 g de persulfato de amonio y disolver en agua bidestilada hasta 10mL. Guardar a 4°C.



### 8.3. APÉNDICE DE TÉCNICAS.

#### EXTRACCIÓN CON HIDRÓXIDO DE SODIO

**OBJETIVO.** Extraer el ADN viral (HBV) contenido en una muestra clínica (suero o plasma) por medio de una extracción alcalina con Hidróxido de sodio (NaOH) con fines de diagnóstico.

**FUNDAMENTO.** Este método se basa en la capacidad que tiene el NaOH de degradar los lípidos de la envoltura del HBV, actuando como detergente, favoreciendo la reacción con un período de incubación a 37 °C por una hora; seguido de una centrifugación que favorecerá la sedimentación de los lípidos, dejando libre el ADN viral, que al momento de ser neutralizado con Acido clorhídrico (HCl), separará a las proteínas virales de los ácidos nucleicos.

#### MATERIAL Y EQUIPO

- Refrigerador a 4 °C
- campana de bioseguridad clase II de flujo vertical
- vórtex
- microcentrifuga(Hermle)
- incubadora a 37 °C
- micropipeta (Gilson P10)
- puntas estériles de 10µL con filtro
- tubos de polipropileno de 500µL
- gradilla

#### REACTIVOS

- Hidróxido de sodio 0.5M
- Acido clorhídrico 0.5M

#### DESARROLLO.

1. Enumerar los tubos de polipropileno de 500µL
2. Descongelar las muestras
3. Agregar 10µL de suero en los tubos de 500µL
4. Agregar 2.5µL de NaOH 0.5M
5. Dar un ligero vórtex e incubar por 1 h a 37 °C
6. Centrifugar a 6000 rpm por 15 s
7. Neutralizar con 2.5µL de HCl 0.5M

## EXTRACCIÓN CON PROTEINASA K/FENOL

**OBJETIVO:** Extraer el ADN del virus de la Hepatitis B (HBV) contenido en una muestra clínica (suero o plasma) con fines de diagnóstico.

**FUNDAMENTO:** Este método se basa en el enfrentamiento del HBV con un detergente (dodecil sulfato de sodio) SDS, que tiene la capacidad de degradar la envoltura del virus; y con una enzima (Proteinasa K), que romperá la conformación estable de los capsómeros del virus, en donde la reacción se verá favorecida con una incubación a 60 °C (temperatura ideal a la que actúa la enzima), por dos horas. Para que se tenga una extracción de ácidos nucleicos intactos se utiliza Fenol saturado a pH 8.0, el cual liberará el ADN de las proteínas de la cápside. Posteriormente el ADN es precipitado con isopropanol, para asegurar la separación de las proteínas virales del material genético se adiciona cloruro de sodio.

### MATERIAL Y EQUIPO:

- Refrigerador a 4 °C
- campana de bioseguridad clase II flujo vertical
- vórtex
- incubadora con vacío (60 °C)
- microcentrifuga refrigerada (Hermle)
- balanza digital (Chyo)
- agitador magnético
- magneto
- potenciómetro
- bomba de vacío
- micropipetas (Gilson P200, P1000, P20)
- puntas estériles con filtro (1000, 50, 200µL)
- tubos de polipropileno de 1.5 mL
- Gradilla de polipropileno
- vaso de precipitado de 2000mL
- matraz aforado de 2000mL
- espátula
- vasos de precipitado de 50mL
- pipetas serológicas desechables (1 mL, 5mL)
- perilla
- membranas de 47 mm de diámetro con poro de 45µm
- matraz Kitazato de 1000mL
- embudo de filtración
- guantes de látex

**REACTIVOS:**

1. Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%
2. Proteinasa K 10mg/mL.
3. Tris-HCl
4. Tris-base
5. NaCl 5M
6. Etanol absoluto grado Biología molecular
7. Cloroformo grado Biología molecular
8. Isopropanol grado Biología molecular
9. Fenol saturado grado Biología molecular pH:8.0
10. EDTA
11. Agua Bidestilada
12. 8-hidroxiquinoleína

**DESARROLLO:**

1. Enumerar los tubos de polipropileno de 1.5mL
2. Descongelar las muestras
3. Agregar a cada tubo 250µL de Tris-EDTA pH 7.8
4. Agregar 100µL de muestra
5. Añadir 12.5µL de SDS 10% a cada tubo y añadir 25µL de Proteinasa K
6. **Añadir 10µl de las diluciones del CIC  $10^{-4}$  (  $1 \times 10^7$  copias de CIC/mL) y  $1 \times 10^{-6}$  (  $1 \times 10^5$  copias de CIC/mL) – solo para PCR cuantitativa competitiva-.**
7. Incubar los tubos por 2 horas a 60 °C
8. Agregar 500µL de Fenol saturado pH 8.0 dar vórtex vigoroso y dejar reposar por 5 min
9. Extraer con 500µL de cloroformo, dar vórtex vigoroso
10. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min
11. Transferir el sobrenadante a otro tubo, (desechar la fase orgánica en el frasco de residuos fenólicos) y agregar 500µL de cloroformo
12. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min
13. Transferir el sobrenadante (desechar la fase orgánica en el frasco de residuos fenólicos) a otro tubo y agregar 400µL de isopropanol y 65µL de NaCl 5M a cada tubo
14. Dejar reposar a -20 °C por 30 min Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min
15. Decantar el sobrenadante (en el frasco de desechos alcohólicos)
16. Lavar la pastilla de ADN con 1 mL de etanol al 70% y centrifugar a 10,000 rpm por 5 min
17. Decantar el sobrenadante (en el frasco de los desechos alcohólicos), dejar secar y guardar a -20 °C hasta su uso.

## PCR CUALITATIVO PARA EL VHB CON INICIADORES HBV+ Y HBV-

**OBJETIVO:** Amplificación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) del virus de la hepatitis B (HBV) para demostrar que el virus está en circulación, en pacientes con serología positiva.

**FUNDAMENTO:** La base fundamental de este método es que cada agente infeccioso causante de una enfermedad posee una secuencia característica propia en la composición de su genoma, por medio del cual puede ser identificado. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método que se basa en el uso de oligonucleótidos sintetizados artificialmente que hibridan las hebras opuestas y flanquean la región de interés del ADN blanco. Una serie de ciclos repetidos, que involucran la desnaturalización del molde, la hibridación de los iniciadores con una de las cadenas del molde y la extensión de los iniciadores hibridados, por la enzima ADN polimerasa, resultando una acumulación potencial de un fragmento específico.

### MATERIAL:

- EQUIPO:
  - \*termociclador Perkin Elmer GENE AMP 2400
  - \*congelador a -20 °C
  - \*cámara de electroforesis
  - \*transluminador de UV
  - \*fuente de poder (BioRad)
  
- INSTRUMENTOS:
  - \*Micropipetas (Labsystem 0.5-10, 10-100, 20-200, 200-1000µL)
  - \*Puntas estériles con filtro (10, 2-50, 20-200 y 200-1000µL)
  - \*Tubos de polipropileno para PCR de 500 y 200µL
  - \*Gradilla para tubos de PCR
  - \*Gasas estériles
  - \*Guantes libres de talco
  
- REACTIVOS:
  - \*Amortiguador 10X para la Taq ADN polimerasa.
  - \*Iniciadores HBV+ (CAT TGA TCC TTA TAA AGA ATT TGG AGC),  
HBV- (CCA GCA GAG AAT TGC TTG CCT GAG).
  - \* Mezcla de Deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP' s) (1mM)
  - \*Taq ADN polimerasa (1.5 U)
  - \*Agua inyectable.

**PATRONES DE REFERENCIA:**

No se cuenta con patrones de referencia certificados, por lo que se utilizan muestras positivas para HbsAg.

**DESARROLLO:**

Para una reacción de 50µL. se realiza lo siguiente:.

1. Enumerar los tubos que se utilicen en la prueba
2. Preparar un coctel de reacción (dependiendo del numero de muestras)
  - Adicionar 5µL de buffer 10X
  - 1µL de iniciador HBV+ y 1µL de iniciador de HBV- (50 picomolas)
  - 10µL de mezcla de dNTP's (1mM)
  - 31µL de agua bidestilada
  - 0.3µL de Taq ADN polimerasa (1.5U)
3. Dar vórtex al coctel
4. Adicionar 47µL del coctel a cada tubo, manteniéndolos en baño de hielo
5. Dar vórtex al ADN de la muestra
6. Adicionar 3µL del ADN de la muestra a los tubos con el coctel
7. Colocar las muestras en el termociclador cuando tenga una temperatura de 94 °C.

Realización de la PCR, bajo las condiciones específicas de cada termociclador.

- Termociclador Perkin Elmer GENE AMP 2400 Núm. 1 y 2

Para la realización de la PCR se utiliza el programa hb-2. Es necesario una previa incubación a 95 °C por 1 min. La PCR consta de 35 ciclos los cuales constan de 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, seguido de una extensión final de 7 min a 72 °C.

Es importante siempre tener como control interno negativo un blanco de reacción (sin ADN) y un control interno positivo una muestra que se conoce es positiva para PCR.

El resultado cualitativo se observa con una electroforesis en geles de agarosa al 2%, tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observarán por fluorescencia. PM de la banda diagnóstica: 181 pb.

**PCR CUALITATIVO PARA EL VHB CON INICIADORES HBV252 Y HBV428R**

**OBJETIVO:** Amplificación del Acido desoxirribonucleico (ADN) del virus de la hepatitis B (HBV) para demostrar que el virus está en circulación, en pacientes con serología positiva.

**FUNDAMENTO:** La base fundamental de este método es que cada agente infeccioso causante de una enfermedad posee una secuencia característica propia en la composición de su genoma, por medio del cual puede ser identificado. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método que se basa en el uso de oligonucleótidos sintetizados artificialmente que hibridan las hebras opuestas y flanquean la región de interés del ADN blanco. Una serie de ciclos repetidos, que involucran la desnaturalización del molde, la hibridación de los iniciadores con una de las cadenas del molde y la extensión de los iniciadores hibridados, por la enzima ADN polimerasa, resultando una acumulación potencial de un fragmento específico.

**MATERIAL:**

- **EQUIPO:**
  - \*termociclador Perkin Elmer GENE AMP 2400
  - \*congelador a -20 °C
  - \*cámara de electroforesis
  - \*transluminador de UV
  - \*fuente de poder (BioRad)
  
- **INSTRUMENTOS:**
  - \*Micropipetas (Labsystem 0.5-10, 10-100, 20-200, 200-1000µL)
  - \*Puntas estériles con filtro (10, 2-50, 20-200 y 200-1000µL)
  - \*Tubos de polipropileno para PCR de 500 y 200µL
  - \*Gradilla para tubos de PCR
  - \*Gasas estériles
  - \*Guantes libres de talco
  
- **REACTIVOS:**
  - \*Amortiguador 10X para la Taq ADN polimerasa.
  - \*Iniciadores HBV252 (ACT CGT GGT GGA CTT CTC TCA) y HBV428R (TG AGG CAT AGC AGC AGG ATG).
  - \* Mezcla de Deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP' s) (1mM)
  - \*Taq ADN polimerasa (1.5 U)
  - \*Agua inyectable.

**PATRONES DE REFERENCIA:**

No se cuenta con patrones de referencia certificados, por lo que se utilizan muestras positivas para HbsAg.

**DESARROLLO:**

Para una reacción de 50µL. se realiza lo siguiente.:

3. Enumerar los tubos que se utilicen en la prueba
4. Preparar un coctel de reacción (dependiendo del numero de muestras)
  - Adicionar 5µL de buffer 10X
  - 1µL de iniciador HBV252 y 1µL de iniciador de HBV428R(50 picomolas)
  - 10µL de mezcla de dNTP's (1mM)
  - 31µL de agua bidestilada
  - 0.3µL de Taq ADN polimerasa (1.5U)
    3. Dar vórtex al coctel
    4. Adicionar 47µL del coctel a cada tubo, manteniéndolos en baño de hielo
    5. Dar vórtex al ADN de la muestra
    6. Adicionar 3µL del ADN de la muestra a los tubos con el coctel
    7. Colocar las muestras en el termociclador cuando tenga una temperatura de 94 °C.

Realización de la PCR, bajo las condiciones específicas de cada termociclador.

- Termociclador Perkin Elmer GENE AMP 2400

Para la realización de la PCR se utiliza el programa hb-4. Es necesario una previa incubación a 94 °C por 1 min. La PCR consta de 35 ciclos los cuales constan de 94 °C 30 s, 62 °C 1 min, 72 °C 30 s, seguido de una extensión final de 7 min a 72 °C.

Es importante siempre tener como control interno negativo un blanco de reacción (sin ADN) y un control interno positivo una muestra que se conoce es positiva para PCR.

El resultado cualitativo se observa con una electroforesis en geles de agarosa al 2%, tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observarán por fluorescencia. PM de la banda diagnóstica: 195 pb.

**PCR CUANTITATIVA COMPETITIVA PARA EL VHB**

**OBJETIVO:** Cuantificación del VHB en circulación sanguínea, por medio de la PCR cuantitativa competitiva, para conocer la carga viral de los pacientes con hepatitis B.

**FUNDAMENTO:** Este método se basa en una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que utiliza un control cuantitativo interno con un numero conocido de moléculas de DNA, de tal manera que en el mismo tubo de reacción se amplifican dos fragmentos de distinto tamaño (fragmento del VHB y fragmento del control interno), y mediante videodensitometría se puede calcular el numero de partículas de una muestra problema.

**MATERIAL:**

- EQUIPO:
  - \*termociclador Perkin Elmer GENE AMP 2400
  - \*congelador a -20 °C
  - \*cámara de electroforesis
  - \*transluminador de UV
  - \*fuente de poder (BioRad)
  
- INSTRUMENTOS:
  - \*Micropipetas (Labsystem 0.5-10, 10-100, 20-200, 200-1000µL)
  - \*Puntas estériles con filtro (10, 2-50, 20-200 y 200-1000µL)
  - \*Tubos de polipropileno para PCR de 500 y 200µL
  - \*Gradilla para tubos de PCR
  - \*Guantes libres de talco
  
- REACTIVOS:
  - \*Amortiguador 10X para la Taq ADN polimerasa.
  - \*Iniciadores HBV+ (CAT TGA TCC TTA TAA AGA ATT TGG AGC),  
HBV- (CCA GCA GAG AAT TGC TTG CCT GAG).
  - \* Mezcla de Deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP<sup>s</sup>) (1mM)
  - \*Taq ADN polimerasa (1.5 U)
  - \*Agua inyectable.
  - \*Controles 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-4</sup>

**PATRONES DE REFERENCIA:**

- control interno negativo, blanco de reacción (sin ADN)
- control interno cuantitativo, sintetizado previamente.

**DESARROLLO:**

Para una reacción de 50µL. se realiza lo siguiente:.

5. Enumerar los tubos que se utilicen en la prueba
6. Preparar un coctel de reacción (dependiendo del numero de muestras)
  - Adicionar 5µL de buffer 10X
  - 1µL de iniciador HBV+ y 1µL de iniciador de HBV- (50 picomolas)
  - 10µL de dNTP's
  - 31µL de agua bidestilada



- 0.3 $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (1.5U)
  3. Dar vórtex al coctel
  4. Adicionar 47 $\mu$ L del coctel a cada tubo, manteniéndolos en baño de hielo
  5. Dar vórtex al ADN de la muestra
  6. Adicionar 3 $\mu$ L del ADN de la muestra a los tubos con el coctel
  7. Colocar las muestras en el termociclador cuando tenga una temperatura de 94 °C.

Realización de la PCR, bajo las condiciones específicas de cada termociclador.

- Termociclador Perkin Elmer GENE AMP 2400 Núm. 1 y 2

Para la realización de la PCR se utiliza el programa hb-2. Es necesario una previa incubación a 95 °C por 1 min. La PCR consta de 35 ciclos los cuales constan de 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, seguido de una extensión final de 7 min a 72 °C.

El resultado cuantitativo se observa con una electroforesis en gel de acrilamida 12%, tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observarán por fluorescencia.

#### Cuantificación.

- Capturar imagen en el Eagle eye, del gel de acrilamida al 12%.
- Abrir la imagen en el programa llamado TotalLab v 1.10, que cuantifica mediante videodensitometría (que compara la fluorescencia del producto de amplificación del virus, con la fluorescencia del producto de amplificación de un control interno con un número conocido de moléculas).
- Se observan dos bandas de diferente peso molecular en el mismo carril (una banda de 181 pb producto de amplificación del VHB y otra banda de 156 producto de amplificación del control interno).
- El programa hace la cuantificación de la densidad de cada una de las bandas que hay en el carril, estos datos se pasan a una hoja de excel para realizar los cálculos.

#### Cálculos

Densidad de la muestra / Densidad del control X moléculas del control/ mL =  
Moléculas/mL de plasma.

### Interpretación de resultados.

Cada una de las muestras se procesa por duplicado con dos diluciones diferentes de control –dil 1X10<sup>-4</sup> y 1X10<sup>-6</sup>. ( 1X10<sup>7</sup> y 1X10<sup>5</sup> copias de DNA respectivamente), por lo tanto se debe obtener un resultado similar en ambas reacciones y se reportará el promedio en números absolutos y en LOG base 10 las partículas virales por mililitro de plasma.

Una muestra que no amplifique en esta prueba se considera como menor a 125 copias/mL (límite mínimo de detección) y se reporta como No Detectable.

### GENOTIPIFICACIÓN POR PCR-RFLP PARA EL VHB

**OBJETIVO:** Realizar la genotipificación del VHB, por el método de PCR-RFLP, con fines de importancia clínica, así como epidemiológicos.

**FUNDAMENTO:** El método se basa en la capacidad de amplificar el segmento de la región pre-S, para posteriormente cortar con las enzimas de restricción Ava II, la cual reconoce la secuencia GGWCC (W= A o T) y Dpn II, la cual reconoce la secuencia GATC, generando así fragmentos de restricción, que nos permitan reconocer el genotipo del VHB, que se encuentra presente.

#### MATERIAL:

- REACTIVOS
  - \*Iniciadores (50 picomoles)
    - P1 TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA
    - P2 TTC CTG AAC TGG AGC CAC CA
  - \*Taq DNA polimerasa (1.5U)
  - \*Mezcla DE dNTP's (1mM)
  - \*Agua bidestilada
  - \*Buffer 10X
  - \*Ava II (5U)
  - \*Dpn II (5U)
  - \*Acrilamida
- EQUIPO:
  - \*termociclador Perkin Elmer GENE AMP 2400
  - \*incubadora 37°C
  - \*congelador a -20 °C
  - \*cámara de electroforesis
  - \*transluminador de UV
  - \*fuente de poder (BioRad)
  - \*Multi-block

- INSTRUMENTOS:

- \*Micropipetas (Labsystem 0.5-10, 10-100, 20-200, 200-1000 $\mu$ L)
- \*Puntas estériles con filtro (10, 2-50, 20-200 y 200-1000 $\mu$ L)
- \*Tubos de polipropileno para PCR de 500 y 200 $\mu$ L
- \*Gradilla para tubos de PCR
- \*Guantes libres de talco

DESARROLLO:

1. Realizar extracción del ADN viral de la muestra con Proteinasa K/Fenol
2. Adicionar 3 $\mu$ L de ADN en la mezcla de reacción.
3. Para una reacción de 50 $\mu$ L. se realiza lo siguiente:  
Preparar un coctel de reacción (dependiendo del numero de muestras)
  - Adicionar 5 $\mu$ L de buffer 10X
  - 1 $\mu$ L de iniciador PI y 1 $\mu$ L de iniciador de P2 (50 picomolas)
  - 10 $\mu$ L de dNTP's (de una mezcla 1mM)
  - 31 $\mu$ L de agua bidestilada
  - 0.3 $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (1.5U)Dar vórtex al coctel  
Adicionar 47 $\mu$ L del coctel a cada tubo, manteniéndolos en baño de hielo  
NOTA Colocar las muestras en el termociclador cuando tenga una temperatura de 94 °C.
4. Realización de la PCR, bajo las condiciones específicas, en el termociclador.  
Incubación previa a 94 °C por 3 min. La PCR consta de 40 ciclos los cuales son de 94 °C 45 s, 53 °C 60 s, 72 °C 90 s, seguido de una extensión final de 7 min a 72 °C.
5. 6 $\mu$ L del producto de PCR es mezclado con el coctel que contiene 2.0  $\mu$ L de buffer 10X, 11.8 $\mu$ L de agua bidestilada y 2U de Ava II y 2U de Dpn II , respectivamente en un volumen total de ración de 20  $\mu$ L (realizando reacciones por duplicado).
6. Incubar las reacciones a 37°C por 3h.
7. Los productos de reacción se corren en un gel de acrilamida 12% por 1:30hr. Al mismo tiempo se corre un blanco que debe contener 10  $\mu$ L del producto de PCR.
8. El resultado de la electroforesis se observa tiñendo las bandas con bromuro de etidio, las cuales se observarán por fluorescencia.
9. El bande de cada muestra debe ser comparada con los algoritmos respectivos del VHB.

## PREPARACIÓN DE GELES

### 1. Preparación de Gel de Agarosa 2%. Para fragmentos grandes de DNA.

- Para preparar un gel al 2% de agarosa de 10 por 6 cm, se necesitan 0.6g de agarosa en 30mL de buffer TBE 1X.
- Hervir la mezcla en horno de microondas o en una parrilla eléctrica, hasta que se haya disuelto completamente.
- Añadir 2µl de solución de bromuro de etidio 10mg/mL.
- Sellar los extremos de la charola para el gel con cinta adhesiva resistente al calor, poner la charola en una superficie nivelada y colocar el peine procurando que quede cuando menos a 0.5mm entre los dientes y el fondo de la charola.
- Vertir la mezcla en la charola evitando hacer burbujas y dejar solidificar el gel a temperatura ambiente.
- Retirar la cinta adhesiva y el peine y colocar el gel en la cámara de electroforesis la cual deberá contener la misma solución amortiguadora usada para hacer el gel.
- El gel deberá quedar ligeramente sumergido en la solución y orientado de tal manera que los pozos queden del lado del electrodo negativo (negro).
- Sobre un pedazo de parafilm limpio, poner gotitas de 1µL de colorante de electroforesis.
- Tomar con una micropipeta automática 10µl de DNA que se va a analizar, mezclarlo con el colorante en el papel parafilm y poner la muestra en uno de los pozos del gel. Colocar, también marcador de DNA para pesos moleculares ΦX 174 RF DNA/Hae III fragments, realizando los mismos pasos (el marcador esta diluido 1:5 con colorante).
- Aplicar corriente de 120V, y correr por 30 min.
- Sacar el gel de la cámara, cuidando de no romperlo. Si la charola donde se formó el gel es transparente a la luz UV, tómesese la charola completa.
- Capturar imagen en el Eagle eye con formato PDF.

2. Preparación de Gel de Acrilamida 12%. Para analizar fragmento pequeños de 35 a 1500 pb podemos usar geles de acrilamida.

- Montar los cristales de la cámara de electroforesis vertical. Los cristales ensamblados no deben tener fugas.
- Para un gel de acrilamida al 12% se mezcla en un matraz, los siguientes reactivos:

*agua	6.5mL
*buffer TBE 10X	0.5mL
*acrilamida:Bis 38:2	3.0mL
*TEMED	5 µL
(N,N,N,N tetrametilendiamina)	
*persulfato de sodio 10%	100 µL

- Agitar perfectamente la muestra y con una pipeta de 10mL vaciar la solución entre los cristales, cuidando que no se derrame.
- Se inserta con cuidado el peine entre los cristales.
- Esperar a que la mezcla se polimerice (aprox. 10min.)
- Retirar el peine con cuidado para no romper los pozos, poner el gel en la cámara y llenar los depositos con buffer TBE 0.5X.
- Preparar la muestra igual que en los geles de agarosa. Cargar los pozos, cuidando que no se mezclen las muestras, utilizar un marcador de pesos moleculares VIII pUCBM21 / HpaII / DraI plus Hind III.
- Conectar los electrodos a una fuente de poder y correr el gel a 150V por 2 horas.
- Sacar el gel de la cámara, desmontar los vidrios y transferir el gel con cuidado a un recipiente conteniendo cinco veces el volumen del gel de TBE 0.5X al que se le añaden 5µl de solución de bromuro de etidio 10 mg/mL.
- Teñir por 5min por cada mL de espesor del gel.

Capturar imagen en el Eagle eye con formato PDF.