



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UNA PRUEBA CUANTITATIVA: CARGA
VIRAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C POR RT-PCR EN TIEMPO REAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

LILIA GARCIA GARCIA

ASESORAS: M. en C. MINERVA MATA ROCHA

Dra. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2009



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.

A g r a d e c i m i e n t o s

A **DIOS** por permitirme pertenecer a una familia maravillosa

A mis padres por darme la vida

Te agradezco especialmente a ti **MAMÁ** por todo el apoyo que me brindaste en todos estos años, gracias por ser siempre mi ejemplo de fortaleza y lucha constante, *te admiro y te quiero mucho.*

A mis hermanos: Irma, Jorge, Mauricio y Arturo, gracias por su apoyo en todo momento.

A mi hermoso sobrino Leonardo, gracias por llegar a mi vida.

A mis siempre amigos: Mine muchas gracias por todos estos años de amistad y por tu gran ayuda en la elaboración de mi tesis; Vero gracias por haber estado conmigo siempre que lo necesite; Pedro agradezco todas tus palabras de aliento que me regalaste en momentos difíciles de mi vida; Jair, Alma, Rebe gracias por su amistad.

Y a todas aquellas personitas que me impulsaban a terminar mi tesis: Magda, Gaby, Anita y Norma, gracias por su apoyo.

A mis asesoras de Tesis: gracias por todo su apoyo.

A mis sinodales: gracias por sus recomendaciones en la elaboración de mi Tesis.

A mis profesores: gracias por sus enseñanzas.

D e d i c a t o r i a

Este trabajo te lo dedico a tí: **MAMÁ**

ÍNDICE DE CONTENIDO	Página
I. INDICE	1
II. INDICE DE FIGURAS	4
III. INDICE DE TABLAS	6
IV. ABREVIATURAS	7
V. RESUMEN	9
VI. INTRODUCCION	10
1. Virus de la Hepatitis C	10
1.1 Generalidades	10
1.2 Historia de la Hepatitis C	11
1.2.1 Descubrimiento del agente causal de la Hepatitis C	12
1.3 Características estructurales del Virus de la Hepatitis C	12
1.3.1 Core	14
1.3.2 Proteínas E1 y E2	14
1.3.3 Proteínas NS2, NS3, NS4a	15
1.3.4 Proteína NS4b	15
1.3.5 Proteína NS5a	15
1.3.6 Proteína NS5b	15
1.3.7 Región 3´terminal	16
1.4 Replicación viral	16
1.5 Diversidad Genética del Virus de la Hepatitis C	18
1.6 Tratamiento frente al Virus de la Hepatitis C	19
1.7 Inmunología de la Hepatitis C	23
1.7.1 Respuesta inmune humoral	23
1.7.2 Respuesta inmune celular	24
1.7.3 Células T cooperadoras	24
1.7.4 Linfocitos T citotóxicos	25
1.8 Epidemiología e Impacto mundial de la hepatitis C	25
1.8.1 Epidemiología del Virus de la Hepatitis C en México	27
1.9 Transmisión del VHC	29
1.9.1 Receptores de sangre y derivados	29

1.9.2 Hemodiálisis	30
1.9.3 Tatuajes y perforaciones	30
1.9.4 Riesgo en personal sanitario	30
1.9.5 Transmisión intrafamiliar	31
1.9.6 Transmisión sexual en grupos de bajo riesgo	31
1.9.7 Transmisión sexual en grupos de alto riesgo	31
1.9.8 Transmisión vertical	32
1.9.9 Usuarios de drogas vía parenteral	32
1.9.10 Otros grupos de riesgo	33
1.10 Pruebas diagnósticas utilizadas para determinar la infección por VHC	33
1.10.1 Pruebas serológicas	33
1.10.1.1 El tamizaje serológico	33
1.10.1.2 El ensayo RIBA	34
1.10.2 Pruebas moleculares	34
1.10.3 Métodos para detectar el genotipo del VHC	38
1.11 Reacción en cadena de la polimerasa	39
1.11.1 Transcripción reversa PCR en Tiempo Real	42
1.11.2 Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real	42
1.11.2.1 Sondas de hibridación específicas	43
1.11.2.2 Agentes intercalantes	48
1.11.2.3 Cuantificación de la PCR en Tiempo Real	50
1.11.2.4 Equipos para PCR en Tiempo Real	54
1.11.2.5 Ventajas de la PCR en Tiempo Real	55
1.11.2.6 Aplicaciones de la PCR en tiempo real	55
VII JUSTIFICACIÓN	57
VIII HIPÓTESIS	57

IX. OBJETIVOS	57
A)Objetivo General	57
B)Objetivos particulares	57
X. METODOLOGÍA	58
XI. DESCRIPCION DE RESULTADOS	59
XII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	72
XIII. CONCLUSIONES	75
XIV BIBLIOGRAFÍA	76
XV. GLOSARIO	80
XVI. ANEXO I	83

INDICE DE FIGURAS

N° Figura	Título	Página
1	Características del Virus de la Hepatitis C	13
2	Estructura del Genoma del Virus de la Hepatitis C	14
3	Ciclo replicativo del Virus de la Hepatitis C	17
4	Mecanismo de acción del interferón	21
5	Historia Natural del VHC	22
6	Respuesta inmune frente al VHC	23
7	Distribución mundial de personas infectadas con el VHC	26
8	Antecedentes de drogadicción en el Norte de la República Mexicana	28
9	Distribución de los genotipos del VHC por zonas en la República Mexicana	29
10	Esquema representativo el proceso de reacción en cadena de la polimerasa	40
11	Conversión de mRNA a cDNA por la acción de la transcriptasa reversa	42
12	Mecanismo de acción de un “quencher”	44
13	Esquema que representa el mecanismo de las sondas de hidrólisis	45
14	Mecanismo de las sondas Molecular “beacons”	46
15	Sondas “Fret”	47
16	Representación de los componentes de la sonda “scorpions”	48
17	Mecanismo de acción del SYBER Green I	49
18	Representación de la curva de desnaturalización (Tm) generada al utilizar el colorante SYBR Green	49
19	Representación de los productos de amplificación en la técnica de PCR en Tiempo Real	50
20	Modelo representativo de una sola gráfica de amplificación mostrando los términos utilizados en la PCR en Tiempo Real	51

21	Curva patrón para cuantificación empleada en PCR en Tiempo Real	52
22	Equipo empleado para PCR-Tiempo Real	54
23	Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región conservada 5'UTR de los diferentes genotipos del VHC	59
24	Representación de la Secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento de los diferentes genotipos del VHC	60
25	Representación de la Secuencia nucleotídica que corresponde al Control Interno Virus del Nilo tecnología Armored	61
26	Electroforesis en gel de agarosa al 4% de los productos de amplificación del VHC en la técnica de RT-PCR en tiempo real	62
27	Gráfica que corresponde a la curva de calibración empleada en la reacción de RT-PCR en Tiempo Real	63
28	Gráfica que representa la curva de calibración del Control Interno virus del Nilo empleada en la RT-PCR en Tiempo Real	64
29	Gráfica que representa el resultado de la especificidad analítica obtenida en la técnica de PCR-Tiempo real	65
30	Representación gráfica del análisis de linealidad	66
31	Gráfico que representa el resultado de la correlación de la carga Viral del VHC, empleando el método Cobas Amplicor vs RT-PCR en tiempo real	71

INDICE DE TABLAS

N° Tabla	Título	Página
1	Fluorocromos y quancher más utilizados en la PCR en Tiempo Real	44
2	Resultados de la carga viral del VHC para el análisis de linealidad del método RT-PCR en Tiempo Real	66
3	Tabla de Resultados del Interensayo	67
4	Tabla de Resultados del análisis Intraensayo	68
5	Resultados de la carga viral de 91 muestras de plasma cuantificadas por el método de Cobas Amplicor y PCR-Tiempo Real	69

ABREVIATURAS

AB	Applied Biosystem
A	Adenina
CI	Control interno
C	Citosina
CN	Control negativo
Ct	Ciclo umbral
cDNA	DNA complementario
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
G	Guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HNANB	Hepatitis no A no B
HVR1	Región hipervariable
IRES	Sitio de entrada al ribosoma
INF	Interferón
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LTC	Linfocitos T citotóxico
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensajero
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR Tiempo Real.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ORF	Marco de lectura abierto
RIBA	Ensayo inmunoblot recombinante
RT-PCR Tiempo Real	Transcripción Reversa de la Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
RNA	Acido Ribonucleico
T	Timina
Tm	Temperatura de desnaturalización
UTR	Región no traducida de los Genes

U	Uracilo
UI	Unidades internacionales
VHC	Virus de la Hepatitis C
VN	Virus del Nilo

RESUMEN

En este presente trabajo se realizó un alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región conservada 5'UTR (región no traducible) de los diferentes genotipos del Virus de la Hepatitis C utilizando el programa Mult Alin para la determinación de regiones variables y conservadas, obteniéndose una secuencia consenso la cual se utilizó para el diseño de los primers y sonda Taqman empleando el programa Primer3Plus: su síntesis se solicitó al laboratorio de Applied Biosystem (AB) al igual que el sistema Custom Taqman Gene Expresión Assay para el control interno (CI).

Se realizaron extracciones de RNA viral a partir de 120 muestras de plasma empleando el kit QIAm Ultrasens Virus, adicionando previamente a cada muestra la secuencia nucleotídica comercial del Virus del Nilo (Armored).

La reacción de RT-PCR Tiempo Real fue llevada a cabo utilizando el equipo Corbett Research 3000.

Para la validación del método fueron evaluados los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, variación intraensayo, variación interensayo y la correlación Cobas Amplicor (Roche) vs RT-PCR Tiempo Real.

La especificidad analítica se evaluó mediante RT-PCR Tiempo Real empleando 15 secuencias nucleotídicas de diferentes tipos de microorganismos. El intraensayo se realizó empleando 7 muestras analizadas cuatro veces en una misma corrida. Para el interensayo se emplearon 19 muestras analizadas por triplicado en tres corridas diferentes. La correlación del método Cobas Amplicor V 2.0 vs RT-PCR Tiempo Real fue calculado con el resultado de carga viral de 91 muestras evaluadas por ambos métodos.

INTRODUCCION

1. VIRUS DE LA HEPATITIS C

1.1 Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 3% de la población mundial está infectada por el Virus de la Hepatitis C (VHC), lo que equivale a 170 millones de personas en el mundo.¹

En la mayor parte de los casos la hepatitis C cursa como una enfermedad asintomática; sin embargo, 85% sufre un curso crónico, con daño hepático lento pero progresivo; así 35% de estos casos terminará en cirrosis hepática y casi 15% evolucionará a hepato-carcinoma; que en la actualidad es la causa principal de trasplante hepático. Aunque en México aún no hay estadísticas precisas, se calcula que existen cerca de dos millones de portadores, y si bien los casos disminuyen lentamente, la seroprevalencia se ubica en 1.2% y el genotipo más común en nuestro país es el tipo 1b.^{2,3}

En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa ha surgido como una metodología robusta y extensamente utilizada para la investigación biológica ya que puede identificar y cuantificar cantidades muy pequeñas de Ácidos Nucleicos DNA (ácido desoxirribonucleico) y RNA (ácido ribonucleico) en forma específica. Como herramienta de investigación su importancia se debe a que su tecnología permite determinar en forma rápida y exacta cambios en la expresión génica resultantes de fenómenos fisiológicos o patológicos. De esta manera es posible correlacionar la fisiopatología con los eventos moleculares lo que permite un mayor entendimiento de los procesos biológicos. Esta metodología se basa en la reacción de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollada por Kary Mullis en la década de los 80, que permitió a los investigadores amplificar grandes cantidades de DNA en forma específica.

Las diferentes metodologías que aplican la (PCR) han propulsado a la biología molecular hacia delante, permitiendo a los investigadores manipular el DNA, facilitando procedimientos comunes, como el clonado, y permitiendo grandes emprendimientos como el Proyecto Genoma Humano.

La PCR en tiempo real representa otro salto tecnológico que ha generado nuevas expectativas para los investigadores, esto es en parte porque la enorme sensibilidad de PCR ha sido equiparada a la precisión proporcionada con la detección en tiempo real de los productos de la PCR.

Esta tecnología nació en los años 90 cuando Higuchi y colegas en Roche y Chiron realizaron la primera reacción de PCR en tiempo real utilizando el marcador fluorescente bromuro de etidio el cual aumenta su fluorescencia al unirse al DNA y siguieron la reacción de PCR con una videocámara. Subsiguientemente, esta tecnología maduró rápidamente en un mercado competitivo; esto es evidenciado por el número de compañías que ofrecen equipamiento y reactivos para PCR en tiempo real y la cantidad creciente de publicaciones científicas que incluyen esta metodología.

El primer equipo para realizar PCR en tiempo real fue comercializado en 1996 por Applied Biosystems, posteriormente se fueron incorporando distintas empresas como BioGene, Bioneer, Bio-Rad, Cepheid, Corbett Research, Idaho Technology, MJ Research, Roche Applied Science, y Stratagene.⁴

1.2 Historia de la Hepatitis C

El término hepatitis, proveniente del griego hepar, que significa hígado, fue utilizado por primera vez por Bianchi en 1710 y se refiere a todas aquellas enfermedades que pueden inflamar el hígado.

La causa más frecuente que provoca hepatitis es una infección vírica, aunque también puede ser producida por agentes químicos, el efecto de alguna medicina, anestésicos, toxinas bacterianas, infecciones parasitarias y por la existencia de litiasis en la vesícula, entre otras. De ahí que las hepatitis se dividan en infecciosas y no infecciosas. La padecida por la mayoría de los pacientes es la de tipo infecciosa. La hepatitis vírica típica en los humanos es producida más comúnmente, por el virus de la hepatitis A (VHA), la hepatitis por el virus B (VHB) y la hepatitis por el virus C (VHC), que anteriormente se conocía como hepatitis no A/no B, y la única relación entre ellas es que todas afectan al hígado.

1.2.1 Descubrimiento del agente causal de la Hepatitis C

En la década de 1940, existían por lo menos dos tipos de hepatitis, la A y la B, pero no fue hasta la década del 70 que se logró con marcadores serológicos, identificar la causa de la enfermedad de ambos y distinguirlos clínica y serológicamente.

En 1974, en el New Cork Blood Center reportaron que el 25% de los pacientes sometidos a cirugía cardiovascular desarrollaron una hepatitis pos-transfusional y el 18% de ellos dieron negativo a los marcadores de ambos virus y con características clínicas diferentes. Por este motivo sugieren la posibilidad de un nuevo tipo de virus y proponen identificarlo como virus de la hepatitis tipo C (VHC). Sin embargo, fue hasta 15 años después que un grupo de la corporación Chiron, en Emeryville, California, a través de métodos de biología molecular e inmunológicos, logró identificar el (los) agente(s) causantes del VHC, ellos construyeron una “secuencia” de DNA complementario (cDNA), del plasma que contenía el agente no caracterizado de la hepatitis no-A no-B (HNANB). Después, buscaron en la biblioteca de DNA y aislaron un clon de cDNA que codificaba un antígeno asociado específicamente con HNANB y se encontró que este clon derivaba del genoma de un agente similar a *Togaviridae* o Flavivirus. Este nuevo agente fue nombrado hepatitis C, el virus causante de la mayoría de las hepatitis post-transfusionales.⁵

1.3 Características estructurales del Virus de la Hepatitis C

El VHC se ha clasificado dentro del género llamado Hepacivirus perteneciente a la familia Flaviviridae, este virus tiene aproximadamente 40-60 nanómetros de diámetro. El VHC es un virus con envoltura, es decir, su genoma viral se encuentra rodeado por una nucleocápside, la cuál a su vez está empacada en una envoltura derivada de las membranas de la célula huésped. (ver figura 1).

El genoma consiste en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva con una longitud de aproximadamente 9,400 nucleótidos. En ambos extremos de la cadena de RNA se encuentra una región no traducida UTR. La primera de estas secuencias se conoce como región 5'-UTR, ya que se localiza en el inicio de la secuencia nucleotídica, y la segunda se denomina región 3'-UTR ya que se localiza al extremo final del genoma viral.

Las dos regiones (5'-UTR y 3'-UTR) contienen secuencias nucleotídicas altamente conservadas, así como las señales requeridas para marcar el inicio y el final de la replicación viral. Además, flanquean una larga secuencia nucleotídica con un solo marco de lectura abierta, la cual determina el número de proteínas que serán sintetizadas.

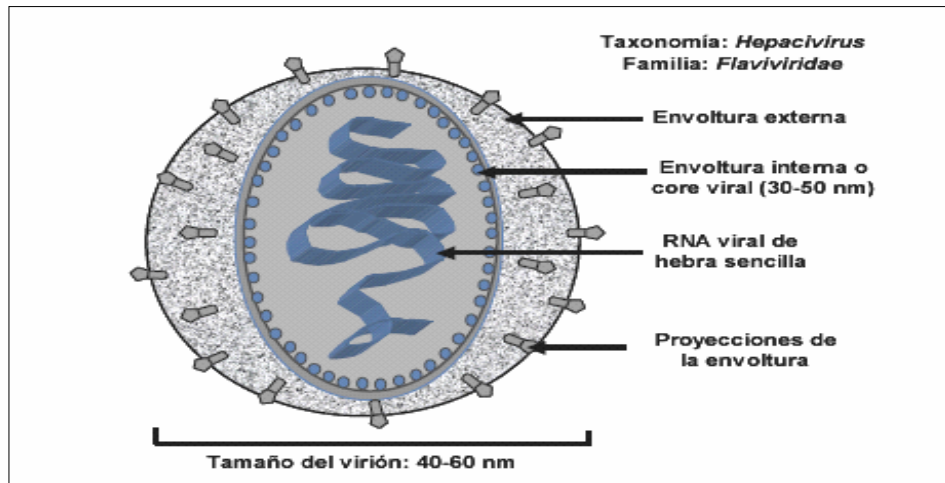


Figura 1. Características del Virus de la Hepatitis C. (Rivas y colaboradores, 2003)

Dentro de la región 5'-UTR (nucleótidos 44 a 354) se encuentra una zona altamente conservada conocida como sitio interno de entrada para el ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) la cual se une directamente al ribosoma para iniciar la traducción del mensaje nucleotídico contenido en la cadena de RNA. Esta región IRES, permite iniciar la producción de las proteínas virales, pasando por alto los mecanismos estándar de traducción utilizados por la célula infectada para producir sus propias proteínas celulares. Una vez iniciada la traducción, el genoma del VHC codifica para una sola poliproteína de aproximadamente 3,010 a 3,033 aminoácidos. Dentro de las células infectadas, la poliproteína es cortada por proteasas celulares y virales, para producir diferentes péptidos⁵.

Esta poliproteína genera 10 diferentes polipéptidos que conforman las proteínas estructurales (core, E1 y E2) y las no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b). (ver figura 2).

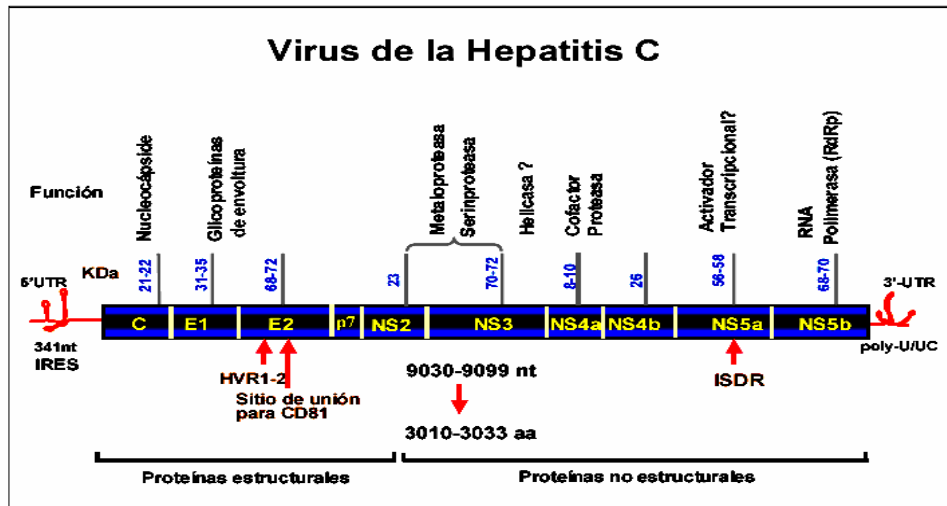


Figura 2. Estructura del Genoma del Virus de la Hepatitis C. (Rivas y colaboradores, 2003)

A continuación se detalla las características más relevantes de cada una de las proteínas del VHC.

1.3.1 Core:

Tiene una secuencia de aminoácidos altamente conservada, y se le ha adjudicado un papel importante en la formación de la nucleocápside, la proteína C es una proteína multifuncional que interactúa con otras proteínas virales y celulares. Además de la función estructural juega un papel importante en el crecimiento celular, apoptosis y carcinogénesis en células infectadas con el VHC. La proteína core induce proliferación celular actuando como trans-activador o bien como trans-supresor para diferentes genes celulares y virales, así como también mediante la activación de las vías de señalización de las MAP kinasas (ERK, JNK y p38 MAP-kinasa).

1.3.2 Proteínas E1 y E2.

Se encuentran asociadas a la envoltura viral, la porción amino terminal de la proteína E2 contiene dos regiones que presentan una alta variabilidad de aminoácidos entre los diferentes virus aislados, esas áreas se conocen como regiones hipervariables (HVR1 y HVR2), se cree que estas regiones son las responsables, en parte, de la evasión de la respuesta inmunológica mediante el cual el VHC escapa a la acción de los anticuerpos neutralizantes.

Se ha reportado que la proteína E2 contiene una secuencia de aminoácidos que interacciona y bloquea la función de la proteína kinasa dependiente de RNA, PKR, la cual representa uno de los mecanismos naturales inducidos por el interferón; además E2 tiene la capacidad de unirse a una proteína celular localizada en la superficie de hepatocitos y linfocitos conocida como CD81 (tetraspanina). Se ha considerado que la proteína CD81 es un probable receptor o co-receptor para el VHC, lo cual facilitaría el acceso del virus hacia el interior de la célula

1.3.3 Proteínas NS2, NS3 y NS4a.

La proteína NS2 en conjunto con la región amino terminal de la proteína NS3 funciona como proteasa viral que participa en el corte postraduccional de la poliproteína viral. Por otra parte, la proteína NS3 utiliza como cofactor a la proteína NS4a, para llevar a cabo su función de serinproteasa. El extremo carboxiterminal de esta misma proteína NS3 funciona como una helicasa, la cual es esencial para el desenrollamiento del RNA viral durante la replicación.

1.3.4 Proteína NS4b.

Hasta la fecha no se le ha asignado ninguna función.

1.3.5 Proteína NS5a.

Algunos reportes han propuesto que esta proteína puede modular el crecimiento y división de las células infectadas.

1.3.6 Proteína NS5b.

Tiene una función muy importante de RNA polimerasa, que es la encargada de la replicación del RNA viral. Es por ello que esta proteína es uno de los blancos más promisorios en la búsqueda de fármacos antivirales.

1.3.7 Región 3' terminal del VHC.

En el extremo 3' de la cadena de RNA, se encuentra la región 3'-UTR (región no traducible) de aproximadamente 200-235 nucleótidos de longitud. Esta región consiste de tres regiones distintas: una región variable, una región poly (U/UC) y una altamente conservada de 98 nucleótidos, que es esencial para la replicación viral. Al parecer esta región ejerce un papel imprescindible en la regulación de la traducción de las proteínas y en la replicación de las partículas virales.^{5,6,7,8}

1.4 Replicación viral

Mediante la utilización de metodologías altamente sensibles basados en la amplificación de ácidos nucleicos y el uso de anticuerpos específicos, se han detectado en hígado de pacientes con hepatitis C, las proteínas no estructurales, además del RNA viral, demostrando que el hígado es el sitio de replicación del VHC; también se ha reportado el aislamiento y replicación del VHC en células sanguíneas periféricas como los linfocitos, lo que confirma la replicación extrahepática del VHC.

Un cuidadoso análisis para estudiar la dinámica viral durante el tratamiento antiviral con interferón reveló que el tiempo de vida media de una partícula viral del VHC es de aproximadamente 3-5 horas y el índice de producción es cerca de 10^{12} partículas virales por día.

Los mecanismos que utiliza el VHC para ingresar al interior de los hepatocitos aún se desconocen. No se ha demostrado con certeza la existencia de receptores celulares que favorezcan la entrada del virus. Sin embargo, se han reportado dos moléculas como probables receptores del VHC, la proteína celular CD81 y el receptor para lipoproteínas de baja densidad (LDL). Asimismo, se han postulado dos mecanismos diferentes para explicar la entrada del VHC a las células; uno mediante la fusión directa del virus con la membrana citoplasmática y el otro mediante endocitosis mediada por receptor.

El modelo más aceptado propone que después de que ha ocurrido el contagio por alguna de las vías de transmisión reportadas para el VHC, el virus infecta las células blanco, en este caso hepatocitos (ver figura 3). Se postula que la infección del hepatocito es muy probablemente a través de endocitosis mediada por receptor, posiblemente mediante la

interacción con CD81. Después de que el virus penetra en la célula, el RNA genómico se libera de la nucleocápside hacia el citoplasma e inmediatamente es traducido para generar proteínas virales. la traducción o síntesis de proteínas del VHC es dirigida por la secuencia IRES la cuál se une directamente a los ribosomas para iniciar la traducción. En primer lugar se genera la poliproteína viral que se procesa inicialmente por una proteinasa perteneciente a la misma célula infectada y después por una segunda proteinasa de origen viral. La mayoría de las proteínas virales que se generan permanecen estrechamente asociadas a las membranas del retículo endoplásmico. Al mismo tiempo a partir de la cadena positiva de RNA original se genera la cadena de RNA negativa, que funciona como un intermediario de replicación (molde) para la producción de nuevas cadenas positivas de RNA. La cadena positiva de RNA interactúa con las proteínas estructurales recientemente sintetizadas y es encapsulada. Una vez formadas las partículas virales, conteniendo el ácido nucleico y las proteínas estructurales, éstas son transportadas desde el retículo endoplásmico, pasando por el complejo de Golgi, para ser finalmente exportadas fuera de la célula e infectar otras células.

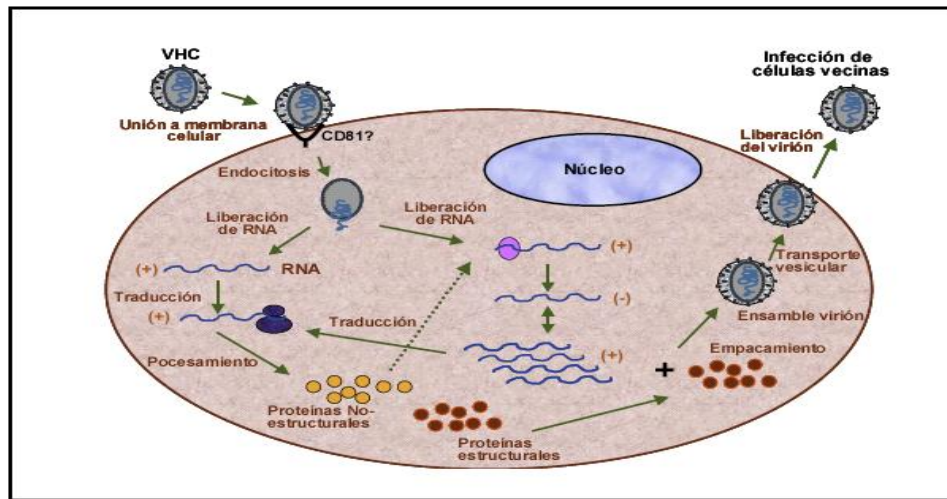


Figura 3. Ciclo replicativo del Virus de la Hepatitis C. (Rivas y colaboradores, 2003)

Otro mecanismo propuesto para la entrada del VHC a las células involucra la participación de receptor de poliproteínas de baja densidad (LDL); ya que las partículas del VHC asociadas con las lipoproteínas de baja densidad son capaces de ligarse a su receptor y permitir la entrada del virus al hepatocito⁸.

1.5 Diversidad Genética del Virus de la Hepatitis C.

El VHC posee un alto, índice mutacional. Esta característica da como resultado una considerable heterogeneidad genética (diferencia en la secuencia de nucleótidos) que se presenta como numerosas sustituciones espontáneas dentro de la secuencia viral original. Este fenómeno se debe principalmente a que la enzima que replica el RNA viral (NS5b, RNA polimerasa) carece de la habilidad de corregir nucleótidos añadidos erróneamente (sistema de reparación de errores) durante la replicación. Por consiguiente la posibilidad de que se genere mutaciones en la secuencia nucleotídica es muy alta, lo que incrementa la genética del virus en cada ciclo de replicación.

Su secuenciación genómica ha revelado la existencia de grandes diferencias entre los clones de aislados víricos de distintas regiones geográficas, de diversos individuos dentro de la misma área y entre aislados del mismo paciente a lo largo de la infección e incluso dentro de una misma cepa. El grado de variabilidad no es homogéneo dentro de todo el genoma. Las regiones más conservadas son 5' UTR, Core, NS3 y NS4. Por el contrario E1, E2/NS1, NS2 y NS5, son las regiones en las que se demuestra una mayor variabilidad entre los aislados. Existe una región hipervariable en los genes E2/NS1 que difiere incluso entre los virus del mismo genotipo, presentando hasta un 51 % de diferencias entre los distintos aislados. Esta región induce la aparición de anticuerpos neutralizantes y su hipervariabilidad es consecuencia del escape inmunológico durante el curso de la infección crónica.

Se postula que la selección inmune de estas variantes puede ser uno de los mecanismos de la infección persistente por VHC, lo cual podría explicar la elevada frecuencia de cronicidad.

Como consecuencia de la elevada tasa de mutación espontánea del VHC, en las personas infectadas el virus no se puede identificar como una secuencia única, sino que está constituido por una secuencia mayoritaria o secuencia consenso, acompañada de un amplio espectro de secuencias mutantes. Esta característica es lo que se denomina «cuasiespecie», que podría asimismo estar implicada en la elevada persistencia del virus y en las fluctuaciones que se producen en la hepatitis crónica. La caracterización molecular de aislados del VHC procedentes de distintos portadores ha permitido distinguir diferentes genotipos virales.

Los genotipos son formas más estables del virus y parece que se originan durante largos períodos de tiempo a diferencia de los mutantes, que, son inestables y se incrementan individualmente en el curso de la enfermedad crónica.

Con base en la secuencia de nucleótidos y al análisis filogenético de la región NS5 se han definido seis genotipos propuesta por, que se numeran del 1 al 6, y una serie de subtipos que se identifican con letras minúsculas (a, b, c).

Cuando se identifica un nuevo aislado de VHC y se secuencia su genoma, se incluye como un nuevo genotipo cuando tiene una homología inferior al 72 % con los ya existentes, y como nuevo subtipo si hay una homología entre el 72-85 %.

En países desarrollados, la determinación del genotipo forma parte del manejo de los pacientes infectados con VHC. Los genotipos 1 y 2 y en menor escala el genotipo 3, se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo.

En Norteamérica y Europa Occidental se han reportado los genotipos 1a, 1b, 2 a/c y 2b. En México, los genotipos identificados incluyen 1a, 1b, 2 a/c y 2b y 3a, siendo el genotipo 1b el predominante.^{8,9}

1.6 Tratamiento frente al Virus de la Hepatitis C

El hecho de que la infección crónica con VHC puede llegar a causar cirrosis y hepatocarcinoma, crea la necesidad de desarrollar fármacos que erradiquen eficazmente la infección. El interferón- α sólo o en combinación con el nucleósido ribavirina son los únicos tratamientos que tienen cierta eficacia frente al VHC.

En los tratamientos con interferón- α , tan sólo se consigue que menos de un 20% de los enfermos respondan al mismo, mientras que en combinación con ribavirina el porcentaje de respuesta aumenta a un 30% aproximadamente. Parece que se obtienen mejores resultados con el interferón- α pegilado en combinación con la ribavirina. El interferón- α pegilado posee un residuo de polietilenglicol unido covalentemente al interferón- α que retarda la eliminación del fármaco de forma que se consiguen unos niveles más constantes del mismo en sangre con dosis menos frecuentes. La respuesta sostenida al fármaco se consigue en 24-48 semanas en un 40-50% de los pacientes.

El interferón- α es una glicoproteína natural que es segregada por la célula en respuesta a una infección viral y produce simultáneamente una activación de la respuesta inmune del hospedador y la inhibición de la multiplicación del virus. Actúa uniéndose a su receptor de membrana celular, e induciendo la proteinquinasa celular PKR, que fosforila el factor eIF2- α , iniciando una cascada de reacciones (ver figura 4) que desembocan en el aumento de la expresión de ciertos genes, induciendo ciertas actividades celulares como:

- a) Disminución de la presencia del receptor CD81 en la membrana de las células hepáticas, responsables de la unión con la proteína de la envoltura viral E2, dificultando así el anclaje de las partículas víricas.
- b) Aumento de la capacidad de las células infectadas para presentar los antígenos víricos a los linfocitos T-CD8+ y activar así a las células asesinas naturales (NK) para la eliminación de las células diana.
- c) Inhibición de la traducción dirigida por IRES y por tanto la replicación de los virus en las células infectadas.

La acción antiviral de la ribavirina se debe a que la RpRd (NS5B RNA polimerasa-dependiente) del virus cataliza la incorporación de ribavirina trifosfato frente a C y U, mutagenizando el genoma vírico y bloqueando además la elongación de la cadena de RNA, disminuyendo el número de virus infecciosos.

La ribavirina, además, promueve la respuesta inmune mediada por las células T tipo 1, potenciando la actividad del IFN- α . Aunque, se ha sugerido que la heterogeneidad del virus está relacionada con la respuesta a tratamiento: a más heterogeneidad, menor respuesta. Asumiendo esta observación, podría llegar a predecirse si un paciente responderá o no al tratamiento, antes de someterse al mismo.

También se han observado cambios en la heterogeneidad del virus durante el tratamiento, sugiriendo que éste podría estar ejerciendo una presión selectiva sobre el virus. El análisis antes y después de la terapia muestran cómo se producen cambios en la HVR1 del virus en pacientes tratados, mientras que en los individuos no tratados no se observa tal cambio.

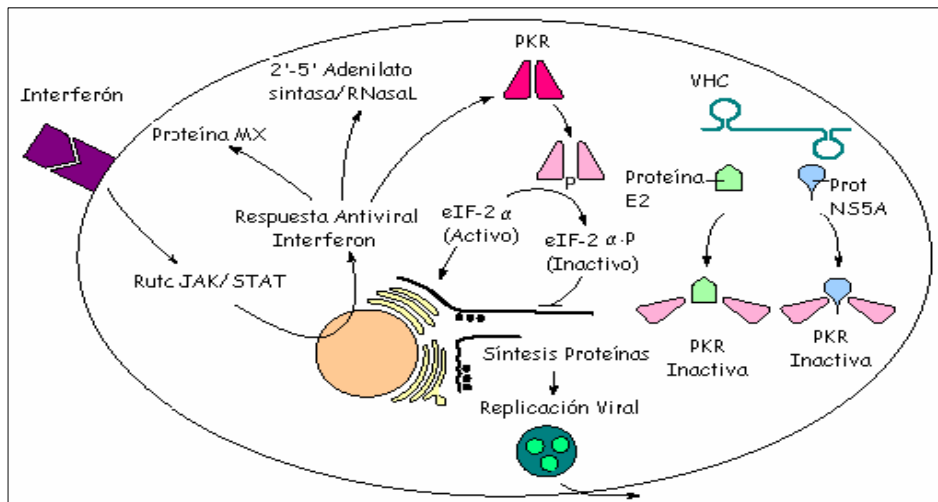


Figura 4. Mecanismo de acción del interferón. Cuando el interferón se une a su receptor celular se activa la transcripción de RNAs que codifican para un rango de proteínas antivirales entre las que se encuentra la PKR. La PKR, mediante la fosforilación del factor eIF2 α , impide la replicación del virus. En la figura también se muestra la acción de las proteínas virales NS5A y E2, inactivando la acción de la PKR. (Jiménez y colaboradores, 2004).

La mayoría de los pacientes con infección aguda no padecen síntomas clínicos aparentes. Durante esta fase casi todos los pacientes desarrollan una fuerte respuesta inmune humoral y celular, que no consigue evitar la infección pero es una de las causas del daño hepático, debido a la destrucción masiva de células hepáticas por el continuo ciclo de replicación y liberación del virus y el ataque del sistema inmune contra las células infectadas. Los niveles de aminotransferasas (ALT) en suero, indicativos del daño a los hepatocitos, aumentan entre la segunda y la octava semana tras la exposición.

La hepatitis C aguda puede ser grave y prolongada, pero raramente es fulminante. En algunos casos, la infección remite por sí sola; los síntomas duran varias semanas y desaparecen conforme caen los niveles de ALT y de RNA del VHC.

No obstante el 85% de los pacientes infectados suelen desarrollar hepatitis crónica. Esta cronicidad está marcada por la persistencia del RNA del VHC durante al menos seis meses después del establecimiento de la enfermedad. En este estadio tampoco se presentan síntomas específicos, suelen aparecer dolores abdominales deslocalizados, fatiga, dolor muscular y en las articulaciones. Un 20% de los enfermos crónicos llegan a padecer cirrosis y de un 1% a un 4% pueden sufrir hepatocarcinoma (ver figura 5).

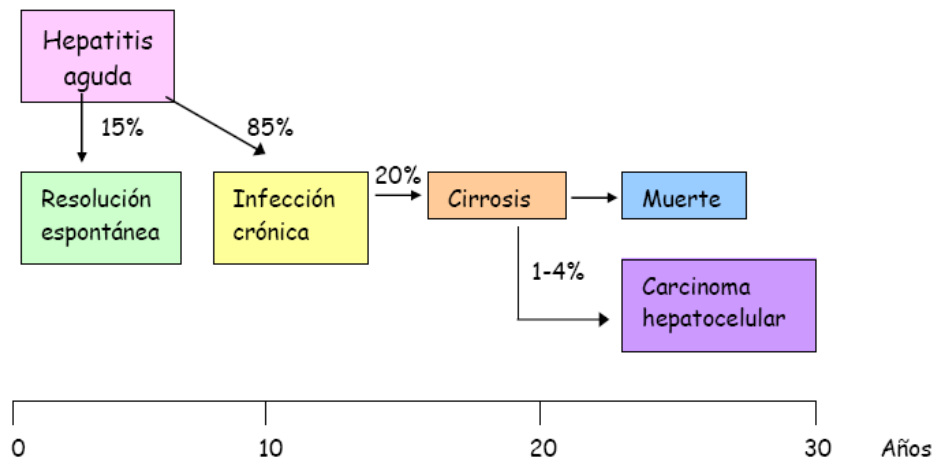


Figura 5. Historia natural del VHC. La mayoría de los individuos infectados desarrollan infección crónica. El intervalo medio de tiempo de duración de la enfermedad es entre 20 y 30 años. . (Jiménez y colaboradores, 2004).

Debido a que la cirrosis puede tardar varios años en desarrollarse, la infección con VHC puede permanecer silenciosa durante décadas. Por tanto, los individuos infectados, suelen desconocer su estado durante largos períodos de tiempo, y la enfermedad es detectada en análisis de sangre rutinarios (por niveles elevados de enzimas hepáticas) o donaciones de sangre. Además del daño hepático, que se ha convertido en una de las principales indicaciones para el trasplante de hígado, se han descrito otras manifestaciones extrahepáticas como crioglobulinemia y glomerulonefritis.^{10,11,12}

1.7 Inmunología de la Hepatitis C

En el hígado, el VHC afecta al hepatocito y es captado por las células de Kupffer. En el hepatocito, el VHC es procesado y los péptidos virales son transportados a la superficie celular y presentado por el CMH clase 1 a los LTC CD8+.

El VHC es también procesado en las células de Kupffer y sus péptidos son presentados por el CMH clase II sobre la superficie celular a las células T CD4+. Estas células liberan citocinas que estimulan a los LTC CD8+ para que lisen a los hepatocitos infectados, y a las células B para que produzcan anticuerpos anti-VHC. El hepatocito infectado libera INF que genera un estado de resistencia anti-VHC en las células vecinas (ver figura 6).

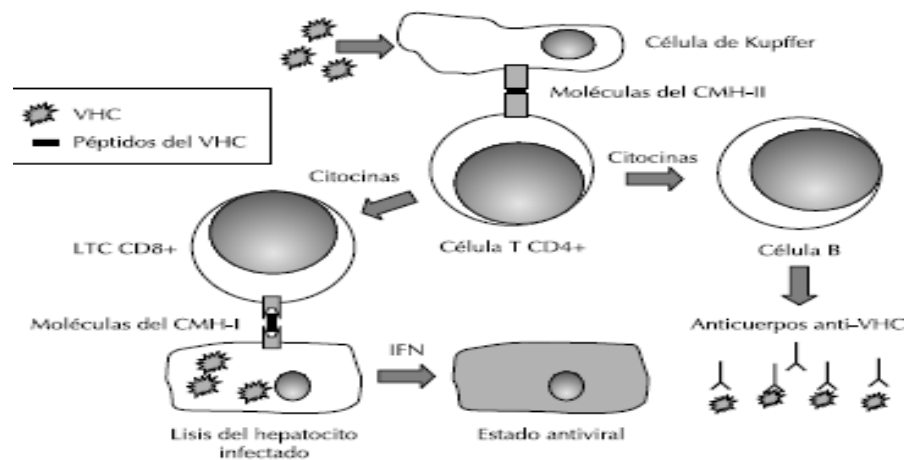


Figura 6. Respuesta inmune frente al VHC. (Cosme y colaboradores, 1999)

1.7.1 Respuesta inmune humoral al VHC

Los anticuerpos son efectivos en etapas tempranas de la infección viral; los anticuerpos específicos contra las proteínas en la superficie de un virus pueden bloquear la unión del virus a las células blanco, los anticuerpos son importantes porque limitan la diseminación de la infección, y previene la reinfección con el mismo virus. Una infección por el VHC resulta en una fuerte respuesta humoral. Las regiones inmunodominantes son Core, NS3, y NS4.

La proteína Core provoca una respuesta de anticuerpos temprana puede persistir aún después de la recuperación de la enfermedad.

Las proteínas E1 y E2 están bajo presión inmune del huésped y esto causa mutaciones y cambios radicales antigénicos para evitar la inmunovigilancia.

La variabilidad en las secuencias E2/NS1 han sido asociadas con recrudescimientos particulares de hepatitis y resistencia a la terapia con el interferón (IFN). El tratamiento con interferón pudiera acentuar las presiones selectivas inmunes normales contra E2/NS1, probablemente por eliminación selectiva de una especie predominante del virus, con la replicación subsecuente de una quasiespecie y el desarrollo de anticuerpos específicos a la nueva variante. Las respuestas humorales IgM e IgG anti-NS4 se ha correlacionado positivamente con la actividad de la enfermedad hepática inducida por el VHC. Sin embargo, los anticuerpos contra NS4 probablemente no tienen cualidades protectoras.

1.7.2 Respuesta inmune celular

La contribución de las células T CD4+ en la defensa contra los virus es iniciada por el reconocimiento de los antígenos del patógeno asociados al CMH clase II; las células T luego secretan IFN gamma y otras linfocinas, así activan macrófagos y ayudan a las respuestas de las células B. Las células TCD8+ reconocen antígenos virales sobre células infectadas que expresan proteínas del CMH clase I. Activadas por este reconocimiento, los LTC CD8+ destruyen a las células infectadas por el virus.

1.7.3 Células T cooperadoras

Las células TCD4+ cooperadoras son los principales elementos generadores de la respuesta inmune, ya que son necesarios para la activación de los otros dos tipos de células efectoras linfoides: LTC y células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Las células T cooperadoras de la mayoría de los pacientes con hepatitis C aguda y crónica, responden, proliferando a la estimulación in vitro con proteínas del VHC, siendo Core, NS3 y NS4 los antígenos más inmunogénicos. Estos epítopes son candidatos potencialmente valiosos de componentes de vacunas contra el VHC.

1.7.4 Linfocitos T citotóxicos

Los LTC son de importancia extrema en la defensa contra las infecciones virales, lisan células del huésped infectadas por el virus, contribuyendo así a la erradicación de la enfermedad, existe una fuerte actividad de los LTC contra los hepatocitos infectados por el VHC. Los LTC CD8+ que infiltran el hígado reconocen epitopes dentro de las proteínas Core, E1 y E2/NS1 y NS2, mientras que los LCT de sangre periférica reconocen a Core, NS3, NS4 y NS5 del VHC.

Se han observado respuestas cruzadas con LTC en pacientes infectados por diferentes genotipos.¹³

1.8 Epidemiología e impacto mundial de la hepatitis C.

El virus de la hepatitis C infecta aproximadamente 170 millones de personas, el 3% de la población mundial, los seis genotipos identificados con sus respectivos subtipos, el 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3c son responsables de 90 % de las infecciones en Europa, Estados Unidos de Norteamérica y Japón. En Europa existe predominio del genotipo 3 en adictos a drogas intravenosas. La mayor prevalencia de infección por el virus de la hepatitis C en el mundo (24 %) se encuentra en Egipto, con predominio del genotipo 4. En otros países es posible identificar genotipos diferentes, como en Sudáfrica el genotipo 5 y en el sureste de Asia el 6, particularmente en Hong Kong. Existen hallazgos aislados de los genotipos 7, 8 y 9 solamente en pacientes vietnamitas, por lo que actualmente se consideran variantes del genotipo 6 al igual que los genotipos 10 y 11 aislados en Indonesia.

La figura 7 muestra la distribución estimada a nivel mundial de las personas infectada por VHC (expresada en millones de personas). Si bien la incidencia disminuyó en forma importante durante la década 1990-99, gracias a los programas de detección del virus en bancos de sangre, aún se estima que la acumulación de casos susceptibles (infección de más de 2 décadas de duración) continuará en aumento en los próximos 10 a 20 años.



Figura 7. Distribución mundial de personas infectadas con el VHC. (López y colaboradores, 2006)

Existen variaciones geográficas importantes, se identifican tres patrones epidemiológicos: el primero muestra que la prevalencia por edad es baja en los menores de 20 años, se incrementa en forma importante en las siguientes décadas, alcanza su pico mayor de los 30 a 49 años y disminuye en los mayores de 50 años, este patrón corresponde al observado en Estados Unidos y Australia. En el segundo modelo la prevalencia es baja en los grupos de menor edad y jóvenes, concentrándose el mayor porcentaje de infectados en los adultos mayores; esto es lo observado en Italia y Japón. El tercer patrón epidemiológico se caracteriza por un incremento sostenido conforme la edad aumenta, con una alta prevalencia en todos los grupos de edad; este tipo de patrón se observa en países como Egipto.

Las principales vías de transmisión a nivel mundial son la transfusión de sangre infectada y el uso de drogas intravenosas; sin embargo, en 30-50% de los casos no es posible reconocer un factor de riesgo, por lo que se han postulado otras vías potenciales de adquisición de la infección las cuales incluyen hemodiálisis, contacto sexual, tatuajes, perforaciones corporales, exposición ocupacional, transmisión materno-fetal e inhalación de cocaína.¹⁴

1.8.1 Epidemiología de la Hepatitis C en México

La prevalencia de la hepatitis C en México se desconoce; en donadores de sangre muestran una prevalencia de 0.47% a 1.2%, en médicos residentes la prevalencia de anticuerpos contra el virus C de 1.2%. Estudios realizados en poblaciones de alto riesgo como son pacientes con insuficiencia renal en tratamiento sustitutivo muestran una prevalencia de 10.2%. No obstante, todos ellos son realizados en poblaciones seleccionadas. La Organización Mundial de la Salud propone como cálculo una prevalencia de 0.7% lo que significa que alrededor de 700,000 personas están infectadas por el virus de la hepatitis C.

Para determinar el panorama epidemiológico de hepatitis C en México se realizó un estudio prospectivo, transversal y observacional (encuesta) en 14 estados de la República Mexicana.

Analizando los factores de riesgo de nuestra población existen dos puntos a llamar la atención:

- a) El uso de drogas intravenosas parece ser un factor de riesgo que tiende a tomar la misma importancia en nuestro país como en los países desarrollados y hasta este momento en los estados de la frontera norte y grandes ciudades del país, muy probablemente, en relación con disponibilidad de las drogas en estas entidades (ver figura 8). Un porcentaje considerable de estos pacientes se encuentra infectado con genotipos 2 y 3, probablemente como consecuencia de la vía de transmisión.
- b) El antecedente de cirugía sin ningún otro factor asociado ocupa un lugar importante y tal vez, traduzca un importante porcentaje de pacientes sin causa aparente para la infección (esporádicos).

El genotipo documentado con mayor frecuencia (72.2%, 1b) corresponde con el reportado en nuestra área geográfica continental. La terapéutica más utilizada antes de la aparición del interferón pegilado fue el interferón alfa 2b solo o combinado con ribavirina.

Durante los últimos años con el advenimiento de los interferones pegilados, el interferón pegilado alfa 2a (40kd) con o sin ribavirina es el tratamiento más utilizado y muy probablemente en relación con la facilidad para su aplicación por el mismo paciente y la comodidad de la prescripción médica.



Figura 8. Antecedentes de drogadicción en el norte de la República Mexicana. Baja California Norte representa 5.7%, Sonora 28.5%, Chihuahua 11.5% y Nuevo León 8.5% (Vera y colaboradores,2005)

En conclusión el grupo estudiado mostró :

- a) La principal vía de transmisión fue la transfusión de sangre y sus derivados. Sin embargo, después de 1995 disminuye en forma significativa (4.5%) muy probablemente en relación con introducción de la pruebas de escrutinio en los bancos de sangre.
- b) El tiempo promedio de la transfusión al diagnóstico es similar a lo reportado en la literatura mundial (23 años para hepatitis crónica y 26 años para cirrosis hepática).
- c) El uso de drogas intravenosas tiende a ser una vía de transmisión con tendencia importante para la infección por virus C en la frontera norte y grandes ciudades del país.
- d) El genotipo predominante en nuestro país es el 1b.
- e) El mayor porcentaje de estos pacientes diagnosticados con infección por virus “C” recibe tratamiento, siendo el más utilizado en la actualidad la combinación de interferón α 2a más ribavirina.

- f) El 50% de los pacientes con cirrosis hepática cursan con complicaciones tardías y en especial aquellos nunca tratados.

Con base en los antecedentes mencionados el patrón epidemiológico que se encontró es similar al de Estados Unidos.

Recientemente se publicó que el genotipo del VHC más frecuente en nuestro país sigue siendo el genotipo 1b. Respecto a la ubicación geográfica, el genotipo 1b fue más frecuente en la zona Norte y el genotipo 1a/1b en la zona Centro y Sur en comparación con las demás zonas. En particular, el genotipo 1b en Jalisco fue el más frecuente, en contraste con el resto del país.^{15,16,17} (ver figura 9).

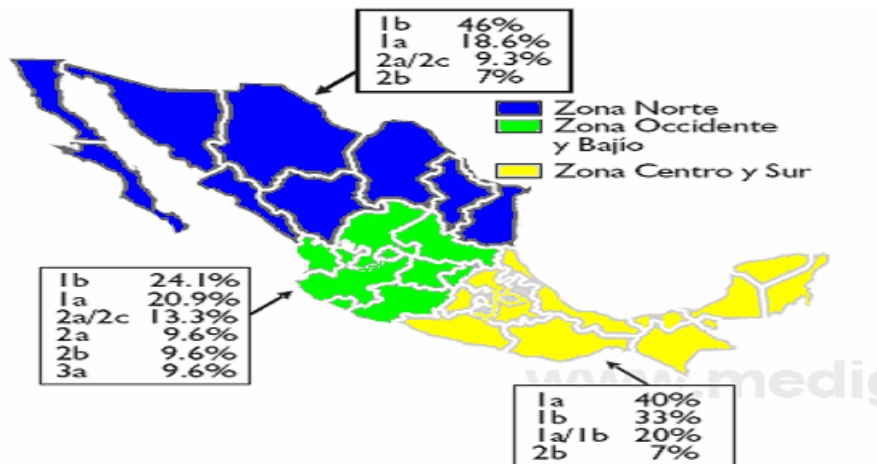


Figura 9. Distribución de los genotipos del VHC por zonas en la República Mexicana. (Vera y colaboradores, 2005)

1.9 Transmisión del VHC

1.9.1 Receptores de sangre y derivados

Antes de 1986 la incidencia de hepatitis C post-transfusional se situaba ente el 5-13%. Desde 1990, al comenzar a realizarse el estudio de marcadores serológicos de VHC la incidencia de hepatitis post-transfusional disminuyó hasta hacerse menor de un 1%. Parece que la incidencia de adquisición de la infección por VHC postransfusión está directamente relacionada con el número y cantidad de productos sanguíneos recibidos.

1.9.2 Hemodiálisis

En cuanto a otras rutas de transmisión, se ha observado una mayor prevalencia de VHC en pacientes en tratamiento de hemodiálisis, observándose gran diferencia entre diferentes países. En Europa se ha estimado una incidencia en torno a un 11,6%. Parece existir una correlación directa entre la duración de diálisis y el número de transfusiones sanguíneas recibidas y la incidencia de infección por VHC. Otros posibles mecanismos de transmisión incluyen el uso compartido de máquinas de diálisis entre pacientes positivos para VHC y otros negativos y la transmisión nosocomial por el personal de diálisis. En España se observó una incidencia de VHC del 19,5% en pacientes en tratamiento con hemodiálisis; dichos valores son ligeramente superiores a los observados en otros países europeos.

1.9.3 Tatuajes y perforaciones

En cuanto a la perforación de los lóbulos de las orejas y otras partes del cuerpo, la acupuntura y el tatuaje, han sido indicados como posibles factores de riesgo de hepatitis esporádica, si el equipo utilizado está contaminado. Sin embargo, la transmisión a través de estas actividades es rara.

1.9.4 Riesgo en personal sanitario

El personal sanitario tiene una prevalencia similar de infección por VHC que la población general. El riesgo de adquirir la infección por VHC tras un pinchazo accidental es bajo, en torno a un 2%. Los grupos de alto riesgo incluyen entre otros a cirujanos, ginecólogos, al personal de hemodiálisis, de medicina intensiva y de salas de urgencias. Si ocurre un pinchazo accidental, el uso de inmunoglobulinas o profilaxis antiviral no está recomendada. Se recomienda que tanto al individuo fuente como al expuesto se les realicen anticuerpos de VHC. Si el individuo fuente es anti- VHC positivo se recomienda realizar RNA del VHC a la persona expuesta. Se recomienda realizar RNA del VHC, anti-VHC y ALT en el momento de la exposición y de nuevo a las 2-8 semanas posteriores al pinchazo, dado que el RNA se detecta en sangre a las dos semanas post-exposición.

1.9.5 Transmisión intrafamiliar

Aunque no es clara la ruta de transmisión, parece existir una mayor prevalencia de infección por VHC (vía no sexual) en familiares de un paciente con VHC. La vía de transmisión es especulativa e incluiría el uso compartido de cepillos dentales, cuchillas, maquinillas de afeitar y utensilios para el cuidado de las uñas. No hay evidencia de que estornudar, besar, compartir utensilios de comida, se asocie con la transmisión del VHC.

1.9.6 Transmisión sexual en grupos de bajo riesgo

Aunque la transmisión sexual existe, parece que esta vía es poco eficaz. En cuanto a las relaciones monógamas de larga duración, en EEUU se estima una seroprevalencia de VHC del 2 al 3% entre parejas con un miembro infectado. Parece que el riesgo de infección del VHC dentro de la pareja es mayor para la mujer que para el varón. Algunos estudios muestran que las parejas de pacientes con hepatitis crónica por virus C tienen mayor riesgo de adquirir el VHC, y éste aumenta con la mayor duración de la exposición. Aunque los datos son muy contradictorios, la mayoría de los expertos creen que en relaciones monógamas de larga duración no se recomiendan modificaciones en las prácticas sexuales, excepto durante la menstruación o si hubiera ulceraciones genitales. Aunque no se recomienda el uso de preservativo debido al bajo riesgo de transmisión, sí se debe advertir a los pacientes, de que su uso disminuye el riesgo de contagio. A pesar del bajo riesgo de contagio, parece recomendado realizar estudio de anti-VHC a las parejas de los pacientes infectados.

1.9.7 Transmisión sexual en grupos de alto riesgo

En EEUU se estima una seroprevalencia del 4 al 6 % del VHC entre personas con múltiples parejas sexuales. Parece existir una correlación positiva entre la infección por el VHC y el número de parejas sexuales, el hecho de no utilizar preservativos, mantener relaciones sexuales vía anal, relaciones sexuales traumáticas, historia de enfermedades de transmisión sexual, y pacientes coinfectados por VIH. En estos casos se recomienda el uso de preservativo, tanto para prevenir el contagio del VHC como de otras enfermedades de transmisión sexual.

1.9.8 Transmisión vertical

Todavía no conocemos la manera y el momento de transmisión materno-infantil. La transmisión perinatal del VHC de niños nacidos de madres positivas para anti-VHC ocurre en aproximadamente un 2% de los casos. Cuando una mujer embarazada tiene positivo el RNA viral el riesgo se incrementa hasta un 4-7%. Las cargas virales menores a 106 parecen disminuir mucho el riesgo de transmisión. La influencia del genotipo viral es discutible. La coinfección materna por el VIH es un factor de riesgo para la transmisión vertical, elevando hasta el 20% el riesgo de transmisión del VHC. No está claro si la práctica de amniocentesis o una rotura prolongada de membranas están asociados con un mayor riesgo de transmisión materno-infantil.

No hay estudios prospectivos que evalúen el uso de cesárea electiva para prevenir la transmisión al niño del VHC, por lo que dicha intervención no está recomendada en pacientes con infección por VHC, a menos que coexista infección por VIH.

Aunque el VHC puede ser detectado en el calostro materno, la lactancia materna no parece aumentar el riesgo de contagio del VHC, siempre y cuando no haya heridas a nivel de la mama. Se recomienda explicar los datos a la madre y que sea ella la que decida si dar lactancia o no.

A los niños nacidos de madres positivas para anti-VHC, se les recomienda realizar RNA de VHC a los 2 y 6 mes de vida y/o test para anti-VHC a los 18 y 24 meses. La positividad de anti-VHC previo a los 15 meses puede deberse a transferencia transplacentaria de anticuerpos de VHC.

1.9.9 Usuarios de drogas vía parenteral

Las personas con abuso de drogas vía parenteral no sólo tienen la mayor prevalencia de infección por VHC, sino que constituyen un potencial reservorio de VHC en la comunidad. La prevalencia varía entre el 31 y el 98%, según la localización geográfica mundial. La prevalencia de la infección aumenta de forma proporcional a la duración del abuso de drogas.

1.9.10 Otros grupos de riesgo

Los adictos a drogas vía oral, al ser comparados con los adictos a vía parenteral tienen menor incidencia de infección por VHC. En cuanto a los consumidores de cocaína vía nasal, dado que con frecuencia se comparte el material de inhalación, se ha observado que hay mayor incidencia del VHC, por lo que ésta, podría ser considerada como una posible vía de transmisión del VHC.¹⁸

1.10 Pruebas diagnósticas utilizadas para determinar la infección por VHC

Las pruebas diagnósticas para determinar la infección por el virus de la hepatitis C se dividen en:

Pruebas serológicas: empleadas para la detección de anticuerpos

Pruebas moleculares: empleadas para la detección de partículas virales

Pruebas para detectar el genotipo

1.10.1 Las pruebas serológicas: calculan los anticuerpos circulantes producidos por el sistema inmunológico del huésped en respuesta a la infección viral, a proteínas o antígenos específicos producidos por el virus y liberados en el suero. Recientemente, se describió que la concentración de anticuerpos anti-VHC disminuye gradualmente con el tiempo en los pocos pacientes que se resuelve la infección espontáneamente.

Las pruebas serológicas se describen a continuación:

1.10.1.1 El tamizaje serológico

Para detectar la infección por el virus de la hepatitis C es la prueba de ELISA (Análisis enzima inmuno absorbente), hay tres generaciones consecutivas con una marcada sensibilidad. Los ensayos de segunda y tercera generación utilizados actualmente, emplean la proteína core, así como las proteínas no estructurales 3 y 4. El ensayo de tercera generación contiene la proteína 5 no estructural y puede detectar anticuerpos de 4 a 10 semanas después del contagio.

1.10.1.2 El ensayo RIBA

El ensayo RIBA (inmunoblot recombinante) se ha utilizado para confirmar los resultados positivos por la prueba de ELISA, así como para antígenos similares a éste pero en formato de inmunoblot de manera que puede identificar la respuesta de cada proteína individual. La prueba carecía de suficiente sensibilidad y especificidad, por lo que fue reemplazada por técnicas de segunda y tercera generación (RIBA-2 y RIBA-3), El RIBA-2 incorporó dos antígenos, uno del gen no estructural (c33c) y otro del core (c22-3). El RIBA-3 es más sensible y específico que el RIBA-2. La última versión añadió una proteína modificada y dos antígenos sintéticos (c100p y c22p), así como la proteína recombinante NS5. Los laboratorios que producen el RIBA son Bayer-Chiron, INNO-LIA de Immunogenetics, Deciscan de Bio-Rad y Bioblot de Biokit-Izasa. Una respuesta positiva por RIBA es aquella que muestra anticuerpos a dos o más antígenos; cuando la respuesta positiva es a un solo antígeno se le llama indeterminada.

1.10.2 Pruebas moleculares

Son útiles para confirmar el origen de la hepatopatía, las indicaciones del tratamiento antiviral en conjunto con determinaciones bioquímicas y biopsia hepática, el monitoreo del tratamiento antiviral y para establecer la duración del tratamiento de acuerdo con el genotipo así como el pronóstico relacionado con otros factores de estudio.

Las pruebas moleculares detectan el RNA viral de forma cualitativa ó cuantitativa y el genotipo del virus de la hepatitis C

Pruebas cualitativas: se usan para confirmar la infección activa por el virus de la hepatitis C en algunos pacientes seropositivos con resultados dudosos, para diagnosticar la infección en los seronegativos con sospecha clínica manifiesta (infección muy temprana) así como en los pacientes inmunodeprimidos (menos del 5%); es decir informan de la presencia o ausencia de RNA.

A continuación se describen las pruebas moleculares cualitativas

Los primeros ensayos cualitativos se basaban en la reacción en cadena de la polimerasa previa transcripción del RNA a cDNA (RT-PCR), de los que el sistema más habitual es el comercial Roche Amplicor® 2.0. Recientemente, se ha introducido el método TMA (*Transcription-Mediated Amplification*), basado en una amplificación isotérmica.

Debido a la variabilidad genómica, los iniciadores que se emplean en los procedimientos de amplificación están basados en la región 5'-UTR que es la mejor conservada.

El sistema PCR Amplicor es el nombre comercial de productos basados en PCR ofrecidos por Roche Molecular Systems y el cual consta de cuatro pasos:

1. preparación del reactivo (Pre PCR),
2. preparación de la muestra (pre-PCR),
3. amplificación (PCR) semiautomatizada y automatizada y
4. detección (post-PCR) semiautomatizada y automatizada

Actualmente, existen sistemas comerciales que facilitan su uso en los laboratorios. La sensibilidad (límite de detección) de la RT-PCR cualitativa es muy alta. entre 50 a 700 copias de RNA viral/ml dependiendo de los sistemas. La especificidad es asimismo muy elevada. Inicialmente se utilizaron ensayos puestos a punto por cada laboratorio, pero en la mayoría de los centros se usan actualmente métodos comerciales con diferentes desarrollos del proceso de automatización. El más habitual, Roche Cobas Amplicor® , permite detectar hasta 50 UI/mL (100 copias /ml, aproximadamente) y una alta concordancia con el método estándar. El sistema TMA detecta hasta 50 copias/mL. La experiencia es más reducida, pero prometedora, sobre todo si, en la práctica real, se reduce el número de reacciones positivas falsas atribuibles a una manipulación inadecuada de la muestra.

Pruebas Cuantitativas: Las pruebas cuantitativas de medición de la carga viral se usan para evaluar la enfermedad del VHC y establecer un pronóstico sobre la eficacia del tratamiento monitoreando la respuesta a éste. La detección y cuantificación, generalmente, se realiza en muestras de suero o plasma, siendo muy importante una estricta y correcta manipulación de las muestras para obtener una buena rentabilidad. Deberían ser separadas

de los hematíes en un plazo no superior a las cuatro horas tras la extracción de la sangre, para prevenir la degradación del RNA por las RNAasas endógenas, recomendándose su rápida refrigeración y almacenamiento a -70°C para asegurar la óptima estabilidad del RNA. Deben evitarse las sucesivas congelaciones y descongelaciones. El proceso de manipulación pre-analítica (separación de sueros y alícuotas) es proclive a producir contaminaciones cruzadas entre muestras positivas y negativas, por lo que deben extremarse las precauciones, sobre todo si se utilizan técnicas cualitativas de una gran sensibilidad.

A continuación se describen las pruebas cuantitativas

Se han desarrollado diferentes ensayos cuantitativos para determinar la carga vírica del VHC basados en distintas tecnologías, que difieren en variabilidad, intervalo lineal, precisión y reproducibilidad. El más introducido es la RT-PCR cuantitativa de Roche. Otros métodos comerciales son el NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Assay*) de Organon Tecnika, la tecnología de DNA ramificado (bDNA de Bayer Diagnostics) y el DNA Elisa de DiaSorin y las técnicas de detección por PCR en tiempo real que presentan alta sensibilidad y precisión, buena reproducibilidad y un amplio intervalo de linealidad.

Debido al auge que están alcanzando éstos métodos moleculares, se hacía necesaria una normalización adecuada para poder intercambiar los resultados de las distintas técnicas. Valorando esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó el desarrollo de un estándar, lo que se logró con el denominado WHO 96/7909, gracias a la ayuda de la Sociedad de Tecnologías de Amplificación (SoGAT). Este estándar se distribuyó y evaluó entre distintos laboratorios, llegando a un consenso y reconociéndolo como el "primer estandar internacional" para el VHC, determinando su valor contenido en Unidades Internacionales (UI).

En los métodos de PCR, el contenido de RNA vírico puede determinarse estableciendo el título final (*end point*), lo que proporciona una semicuantificación, pero lo

frecuente es hacerlo por comparación con un estándar interno que se añade con cada reacción. El ensayo comercial Roche Amplicor® Monitor es el más utilizado y dispone de un sistema semiautomatizado (Cobas Amplicor®) que puede complementarse con un procedimiento de extracción del RNA automático (Ampliprep®). Se estima que el límite de detección es de 10^3 copias/mL, aproximadamente 10 veces menos que su homólogo cualitativo. En la nueva versión de este ensayo, los títulos de RNA se informan en UI/ml, mediante la incorporación del estándar de la OMS. Al parecer, este ensayo cuantifica de forma similar todos los genotipos conocidos del VHC.

El sistema de bDNA de Bayer (antes Chiron) se basa en la amplificación de la señal de detección. Los títulos de RNA del VHC se informan, en las pruebas de última generación bDNA 2.0, en equivalentes/mL. Este sistema detecta los genotipos 1, 2 y 3 con similar eficacia. La precisión de la prueba es muy alta y el sistema muy reproducible. Los coeficientes de variación interensayo son inferiores al 25% para la mayoría de las muestras, aunque la sensibilidad analítica (límite de detección) es menor que la de las técnicas de RT-PCR. Por otra parte, muestra una excelente linealidad en las cargas virales altas (por encima de 10^8 eq/mL) y tiene una buena reproducibilidad entre lotes, que asegura la confirmación de la viremia antes del tratamiento. En breve, estará disponible la última versión bDNA 3.0, más sensible que, según el fabricante, detectará hasta 600 UI/ml, alrededor de 2500 copias/ml. Para la monitorización del tratamiento se usa en combinación de una RT-PCR cualitativa o cuantitativa en todas las muestras negativas por la técnica bDNA. Los estudios que comparan los dos sistemas comerciales en paralelo demuestran que los valores no son intercambiables, siendo posible, sin embargo, derivar las ecuaciones matemáticas de un prueba con los de las otras, demostrando que los cambios en la carga viral se detectan por ambos métodos.

PCR en tiempo real: Recientemente se incluyó este método de PCR en tiempo real para la determinación cuantitativa del virus de la hepatitis C. La PCR en tiempo real permite la cuantificación de la muestra tanto a bajas como altas concentraciones sin necesidad de diluir la muestra.

1.10.3 Métodos para detectar el genotipo del VHC

Los métodos para detectar los genotipos se usan para evaluar la enfermedad del VHC y establecer un pronóstico sobre la eficacia del tratamiento monitoreando la respuesta a éste ya que el genotipo del virus de la hepatitis C es una característica intrínseca de las cepas infectantes; el genotipo del VHC puede ser un factor importante en el curso clínico de la enfermedad. Varios estudios muestran que los pacientes infectados con el genotipo 1b tienen mayor riesgo de padecer carcinoma hepatocelular, comparado con los otros genotipos. Los genotipos no cambian durante la infección; sin embargo, se han observado infecciones con genotipos mixtos.

Para determinar el genotipo del VHC se han desarrollado métodos serológicos y moleculares. La mayor utilidad del genotipado es como marcador de predicción de la respuesta al tratamiento, y también para el seguimiento epidemiológico. Los métodos moleculares son más sensibles que los serológicos, y permiten la subtipificación de las cepas, por lo que son los que habitualmente se usan en los laboratorios clínicos. El mejor método es determinar las secuencias de nucleótidos de la cepa en cuestión, pero no es práctico en un laboratorio de diagnóstico clínico, habiéndose simplificado con otras técnicas. Entre ellos cabe citar el RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), la PCR con iniciadores específicos de tipo y el método comercial LiPA [*Line Probe Assay* (Innogenetics)]. Actualmente, se disponen otros ensayos comerciales que facilitan la determinación de los genotipos en el laboratorio diagnóstico, como el Gen-Eti-K DEIA® (DiaSorin), una PCR específica de tipo (Genlab Diagnostics) y el CFLT (Third Wave Technologies). El Gen-Eti-K® usa iniciadores de zonas conservadas de la región *core*, mientras que INNO-LiPA y CFLP amplifican la región 5'-UTR. El INNO-LiPA es el más habitual en los laboratorios asistenciales, detectando todos los genotipos conocidos y bastantes subtipos.^{19,20,21,22}

1.11 Reacción en Cadena de la Polimeras

Por definición la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), permite la amplificación in vitro de una secuencia específica de DNA y se realiza mediante el uso de un par de primers que flanquean la secuencia de DNA a amplificar, y de ciclos repetidos de síntesis de nuevas cadenas de DNA por acción de una DNA polimerasa. Básicamente cada ciclo de amplificación se divide en tres etapas (ver figura 10).

La primera etapa consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C. La desnaturalización incompleta permite el apareamiento de las hebras de DNA y por lo tanto se reduce el rendimiento el producto. En contraste, los pasos de desnaturalización a altas temperaturas o por mucho tiempo provocan pérdida de la actividad de la enzima.

Segunda etapa consiste en la hibridación o alineamiento de los primers: para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los *primers* a las cadenas; la temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers depende de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m de los primers. Debido a que las DNA polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los primers puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía en dos ordenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C genera buenos resultados.

La tercera etapa es la extensión, esta reacción se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del primer se realiza tradicionalmente a 72°C.

Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima.

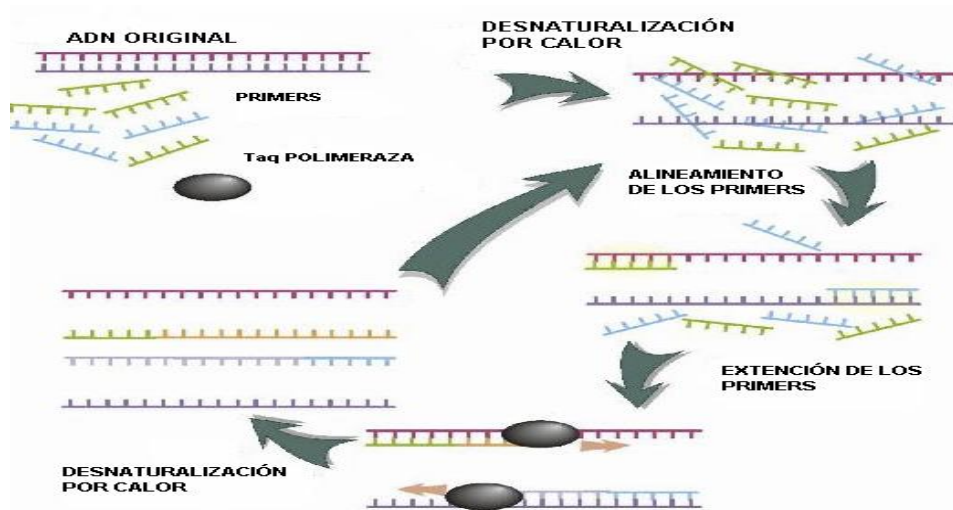


Figura 10. Esquema representativo el proceso de reacción en cadena de la polimerasa (http://www.medvet.una.ac.cr/carrera/mva505_Practica9.pdf)

El éxito de una PCR depende en gran medida de la optimización de los diferentes parámetros involucrados en el proceso:

- DNA molde: es requerida la presencia de por lo menos una cadena completa de DNA con la secuencia por amplificar y con una cantidad mínima de contaminantes para no inhibir la reacción de polimerización.
- Primers: su diseño es un parámetro esencial para la obtención reproducible de un producto de amplificación específico. Los primers deben corresponder a secuencias únicas en la región a amplificar, particularmente en los extremos 3', su temperatura de desnaturalización para ambos primers debe ser similar, además entre ellos no debe haber complementariedad para evitar la formación de dímeros que interfieran en la amplificación, su temperatura de fusión debe estar 50-65° C,

- contenido de GC 40-60%, su tamaño generalmente 18-30 nucleótidos de longitud.
- dNTP's (2'-desoxirribos nucleosido 5'-trifosfato) la concentración de la mezcla equimolar de los cuatro sNTP's debe ser suficientemente alta para permitir la realización de todos los ciclos de amplificación (20-200μM).
- DNA polimerasa requerida para la formación de las nuevas cadenas.
- Iones Mg⁺⁺ que participan como cofactores de la Taq DNA polimerasa, y regular la actividad y la fidelidad de la enzima.
- Parámetros de los ciclos de amplificación: primordialmente controlar los tiempos y las temperaturas utilizadas, durante los ciclos de amplificación.

El inconveniente de la PCR convencional es la ausencia de información cuantitativa exacta debido a la eficiencia de la amplificación. Si la eficiencia de la reacción permaneciera constante para cada ciclo de amplificación, la concentración de ADN posterior a la PCR sería directamente proporcional a la cantidad de DNA diana inicial. Lamentablemente, la eficiencia de la amplificación varía de una reacción a otra, así como en ciclos sucesivos de una misma reacción. En particular, en los últimos ciclos de la PCR los productos de la amplificación se forman de manera no exponencial y a una velocidad de reacción desconocida; la cuantificación del DNA basada en la PCR convencional se apoya en la medición en el punto final, a fin de conseguir la sensibilidad máxima, cuando la amplificación alcanza el rendimiento máximo (la denominada «fase meseta»). En esta etapa la reacción ha superado la fase exponencial, a causa fundamentalmente del agotamiento de los reactivos y de la inactivación térmica gradual de la polimerasa utilizada. Por ello, la correlación resultante entre la concentración del producto final y el número de moléculas diana iniciales es limitada.

Para superar este problema se han desarrollado la PCR en tiempo real, que se proponen establecer una relación entre la concentración de DNA diana y la cantidad de producto de la PCR generada por la amplificación.

1.11.1 Transcripción reversa PCR en Tiempo Real

Una limitación de la PCR en tiempo real es que se debe utilizar DNA como secuencia diana, ya que las DNA polimerasas no pueden amplificar ARN de una manera similar. Este problema se puede superar mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa para generar cDNA a partir de una plantilla de ARN.

Por esta razón la PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-PCR en tiempo real) se ha convertido en el método de elección para realizar un examen rápido y cuantitativo de la expresión de genes específicos, lo que no sería posible con anteriores metodologías; es importante mencionar que dado que la PCR en tiempo real y la transcripción reversa se utilizan en combinación, la señal final obtenida en RT-PCR en tiempo real dependerá de la eficiencia de la reacción de la transcriptasa inversa. (ver figura 11).

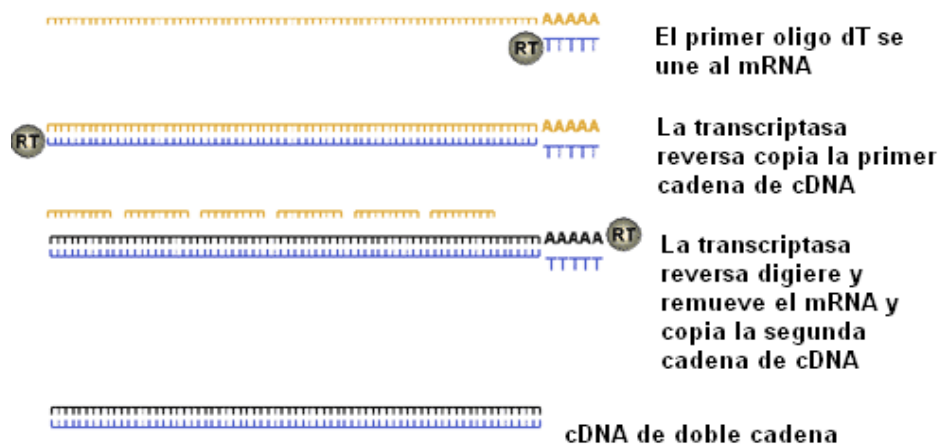


Figura 11. Conversión de mRNA a cDNA por la transcriptasa inversa. En PCR en tiempo real, se utiliza generalmente una transcriptasa inversa que tenga una actividad endo H. Esto elimina el mRNA permitiendo que la segunda hebra de DNA sea formada (http://www.medvet.una.ac.cr/carrera/mva505_Practica9.pdf)

1.11.2 Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

La PCR en tiempo real representa una metodología de la PCR más exacta y más utilizada actualmente. Al contrario que en el caso de las determinaciones en el punto final, los sistemas de PCR en tiempo real monitorizan la reacción a medida que tiene lugar. En este tipo de sistema, la PCR se acopla a la emisión de una señal fluorescente proporcional a

la cantidad de producto de la PCR producido en ciclos posteriores. Esta señal se intensifica proporcionalmente a la cantidad de producto de la PCR generado en cada ciclo de reacción sucesivo. registrando la cantidad de emisión fluorescente en cada ciclo, es posible monitorizar la PCR durante su fase exponencial. El primer incremento significativo de la fluorescencia se correlaciona con la cantidad inicial de plantilla diana.

Los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de la PCR y están basados en:

- el empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra.
- la detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos:

1. sondas de hibridación específicas marcadas con fluorocromos
2. agentes intercalantes

1.11.2.1 Sondas de hibridación específicas

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las moléculas. Las más utilizadas son las sondas TaqMan, las sondas molecular beacons, sondas FRET y las sondas scorpions.

Estos sistemas de detección son capaces de distinguir entre la secuencia de interés y los dímeros de primers o las amplificaciones inespecíficas. Todos ellos se basan en la utilización de quenchers y sondas marcadas con un amplio rango de fluorocromo con diferentes espectros de excitación y emisión.^{15,16}

Un fluorocromo (fluoróforo) es una molécula que absorbe energía y pasa a un estado excitado; posteriormente, al volver al estado inicial emite el exceso de energía en forma de fluorescencia. Los quenchers son moléculas que aceptan la energía de un fluorocromo y la disipan en forma de calor o fluorescencia.^{15,16} (ver figura 12).

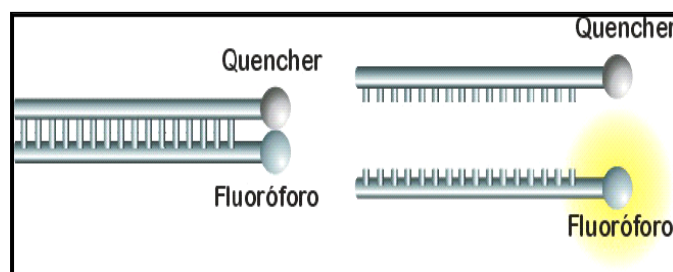


Figura 12. Mecanismo de actuación de un “quencher”. Cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de primers específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia. (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>)

En la siguiente tabla se detallan los fluorocromos (fluoróforos) y quencher más utilizados, así como las longitudes de onda de excitación y emisión.

FLUOROCROMOS			QUENCHERS		
Nombre	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Nombre	Excitación (nm)	Emisión (nm)
FAM	492	515	Methyl Red	410	no disponible
TET	521	536	ElleQuencher	650,600	no disponible
JOE	527	548	Dabcyl	453	no disponible
HEX	535	556	Dabcyl	466	no disponible
TAMRA	555	580	TAMRA	55	580
ROX	575	602			
Cy3	552	565			
Cy3.5	581	596			
Cy5	651	674			
Cy5.5	675	694			
Cy7	743	767			
R6G	518	543			
Texas Red	583	603			
VIC	528	546			

Tabla 1. En esta tabla se presentan los fluorocromos y quenchers más utilizados en la PCR en Tiempo Real

Sondas "Taqman"

Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Cuando la Taq polimerasa empieza a amplificar a partir del primer unido al DNA diana, desplaza el extremo 5' de la sonda que es degradado por la actividad exonucleasa 5' - 3' de la Taq. Este proceso libera el fluoróforo al medio separándolo del quencher, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia detectada (ver figura 13).

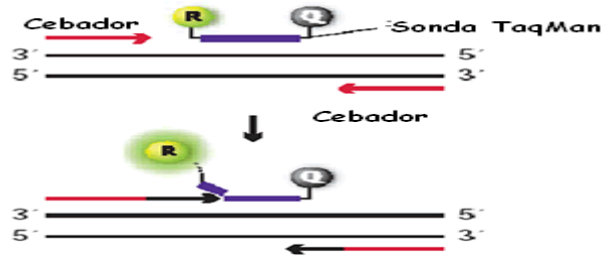


Figura 13. Esquema que representa el mecanismo de las sondas de hidrólisis (TaqMan). Durante la amplificación la sonda TaqMan se degrada en la etapa de polimerización liberando el inhibidor de la fluorescencia (Quencher - Q -) del marcador fluorescente. La fluorescencia por lo tanto es proporcional al amplicón formado. (**Invitrogen, Inc**)

Molecular "beacons"

Consisten en una estructura de horquilla en la cual el bucle es DNA monocatenario (ssDNA) complementario del amplicón; el brazo de la horquilla tiene una longitud aproximada de 6 bases, esta formada por C y G y es la encargada de mantener la estructura de la horquilla. El fluoróforo está unido a uno de los extremos del brazo y el quencher (normalmente Dabcyl o Methyl Red) al otro extremo; el brazo de la horquilla mantiene al fluoróforo y al quencher próximos, de tal forma que el quenching que se observa es colisional.

Durante la PCR, la sonda se une a la secuencia específica del DNA diana ya que el heterodúplex sonda-diana es termodinámicamente más estable que la estructura de horquilla de la sonda. Una vez que la sonda se ha unido a su diana, la horquilla se abre, separándose el fluoróforo y el quencher, con lo que se produce un incremento de la fluorescencia. (ver figura 14)

Este incremento de fluorescencia que se observa es completamente reversibles (al contrario que con las sondas TaqMan), ya que a elevadas temperaturas, la sonda se disocia de su diana y vuelve a la estructura de orquilla original.

El brazo de la estructura añade especificidad a este tipo de sonda ya que el híbrido formado entre la sonda y la diana tiene que ser más estable que la del propio brazo para que se mantenga la unión sonda-diana. Todas aquellas dianas que no sean totalmente complementarias formarán el dúplex con la sonda pero se disociarán a una temperatura bastante menor que las que aparean perfectamente. El estudio de las curvas de disociación permite detectar hasta mutaciones puntuales.

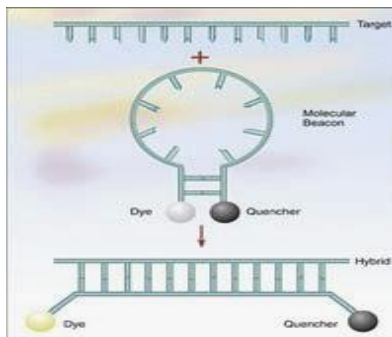


Figura 14. Mecanismo de las sondas Molecular beacons. Durante la PCR, cuando la sonda se une a la secuencia específica del DNA diana, la horquilla se abre, separándose el fluoróforo y el quencher, con lo que se produce un incremento de la fluorescencia. (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>)

La principal desventaja de los “Molecular Beacons” es que su diseño es bastante complicado ya que, además de hacer un estudio de secuencia, como ocurre en el caso de las sondas TaqMan, para que la secuencia del bucle sea complementaria del amplicón, hay que hacer un estudio termodinámico para que la energía de unión bucle-amplicón sea termodinámicamente más estable que la del brazo del propio “Molecular Beacon”, ya que si no es así, aunque la región complementaria del bucle se encuentre presente en el amplicón,

éste nunca se abrirá para unirse al amplicón. Además, aunque se haga un diseño perfecto, la señal suele ser bastante pobre, ya que muchas veces ocurre que cuando el Molecular Beacon se abre e hibrida con el amplicón, el fluoróforo y el quencher quedan lo suficientemente próximos para que el quencher siga capturando la fluorescencia del fluoróforo.

Sondas “Fret”

El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del DNA diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo (ver figura 15).

En todos estos sistemas, el incremento de DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil.

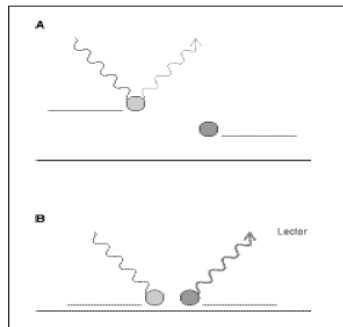


Figura 15. Sondas FRET Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo. (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>)

Sondas Scorpions

Difieren de las sondas anteriores en que su mecanismo de acción es intramolecular. La horquilla esta unida al extremo 5' de un primer específico por medio de un “bloqueante de la PCR” (ver figura 16). Después de la extensión del primer durante la amplificación, la secuencia específica de la sonda se une a la región complementaria dentro de la misma hebra de DNA.

Esta hibridación abre la estructura de horquilla de tal forma que el quencher ya no queda próximo al fluoróforo y se observa un incremento en la fluorescencia. El “bloqueante de la PCR” evita que continúe la amplificación a lo largo de la sonda, lo que provocaría que se abriera la estructura de horquilla de la sonda (con el correspondiente incremento de fluorescencia) en ausencia de secuencias diana específicas. La unión intramolecular de la sonda es cinéticamente favorable y altamente efectiva. Además, no es necesaria la ruptura enzimática de la sonda, por lo que se reduce el tiempo necesario para obtener señal. No obstante, como el quencher y el fluoróforo permanecen en la misma hebra de DNA y relativamente próximos, a veces se puede producir el quenching incluso cuando la horquilla esté abierta.

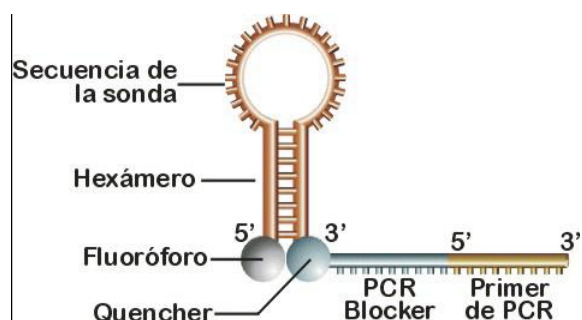


Figura 16. Representación de los componentes de una sonda “scorpions”. (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>)

1.11.2.2 Agentes Intercalantes

Detectan todos los DNA de doble cadena (dsDNA) sintetizados durante la reacción de amplificación (ya sea producto específico, producto inespecífico o dímeros de primers). El método es estándar y consiste en añadir un agente intercalante a la doble cadena o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a ésta. El más utilizado es el SYBR Green I que se excita a 497nm y emite a 520nm. (ver figura 17).

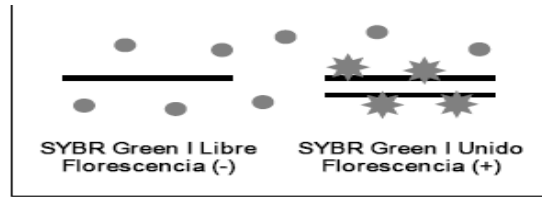


Figura 17. Mecanismo de acción del SYBER Green I. El **SYBR Green** se introduce en la doble hélice del ADN y se une produciendo señal fluorescente, proporcional a la cantidad de ADN presente. (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>)

La principal limitación de estos marcadores es que al unirse al total de ácidos nucleicos en la reacción de la PCR, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son (dimeros de primers). Para hacer frente a esta situación se debe realizar una curva de desnaturalización (“melting curve”) al final de la reacción: la reacción se calienta lentamente desde 50°C hasta 95°C monitorizando continuamente la fluorescencia; la temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green I. Los productos de PCR de diferente longitud y diferentes secuencias se desnaturalizan a diferentes temperaturas, observándose diferentes picos cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura ($-dF/dT$) frente a la temperatura. (ver figura 18)^{15,16} Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los amplicones específicos realizar

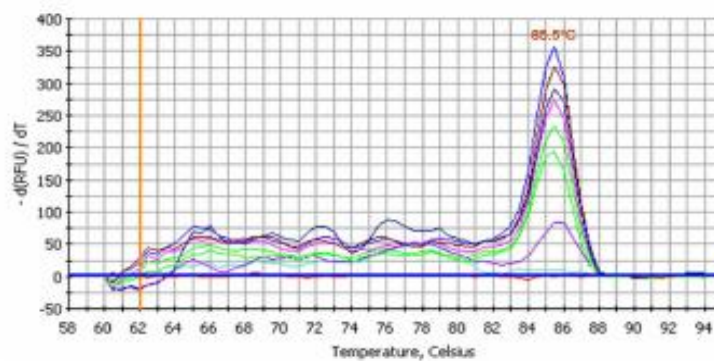


Figura 18. Representación de la curva de desnaturalización (T_m) generada al utilizar el colorante SYBR Green. En esta grafica se observa que a la temperatura de desnaturalización del producto, se puede observar una drástica reducción de la intensidad de fluorescencia, ya que los productos de PCR inespecíficos (cortos) se desnaturalizan a una temperatura muy inferior que los específicos (largos). Esto permite corregir las curvas de desnaturalización de la contribución de los productos de PCR inespecíficos, incrementando la sensibilidad de la técnica a una copia por reacción. (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>)

1.11.2.3 Cuantificación de la PCR en Tiempo Real

La capacidad de monitorear el progreso en tiempo real de la PCR revolucionó totalmente la manera de cuantificación basada en la PCR de DNA y de RNA. Las reacciones son caracterizadas en el momento en el que la amplificación de un producto de PCR se detecta después de un número fijo de ciclos. Cuanto más alto es el número de copias del blanco, más pronto se observa el aumento significativo en la fluorescencia. En la figura 19 se muestra un diagrama representativo de la amplificación. Un diagrama de amplificación es una gráfica de la señal de la fluorescencia contra el número de ciclos. En los ciclos iniciales de PCR, hay un pequeño cambio en señal de fluorescencia. Esto define la línea de fondo para el diagrama de la amplificación. Un aumento en fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR.

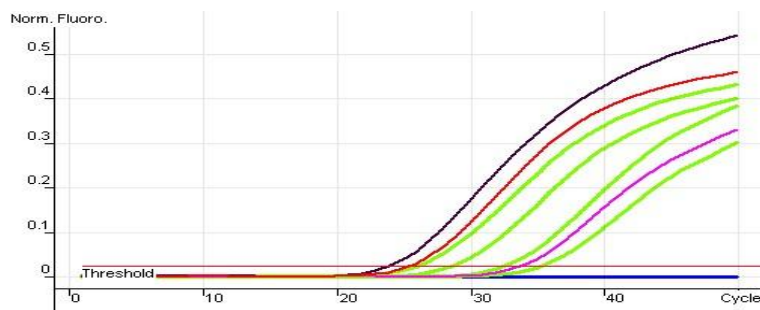


Figura 19. Representación de los productos de amplificación en la técnica de PCR en Tiempo Real. La curva de amplificación es la curva de la señal de fluorescencia contra el número de ciclo (**figura tomada del equipo Rotor Gene Corbett Research**)

Se adquieren los datos cuando la amplificación está todavía en la fase exponencial. Esto está determinado por la identificación del número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (background). Este número de ciclo se llama ciclo umbral (Ct: threshold cycle por sus siglas en inglés). El Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción y es más confiable que las mediciones en el punto final convencionales (Figura 20). El Ct es inversamente proporcional al número de copias del DNA blanco: a mayor concentración de blanco, menor Ct medido.

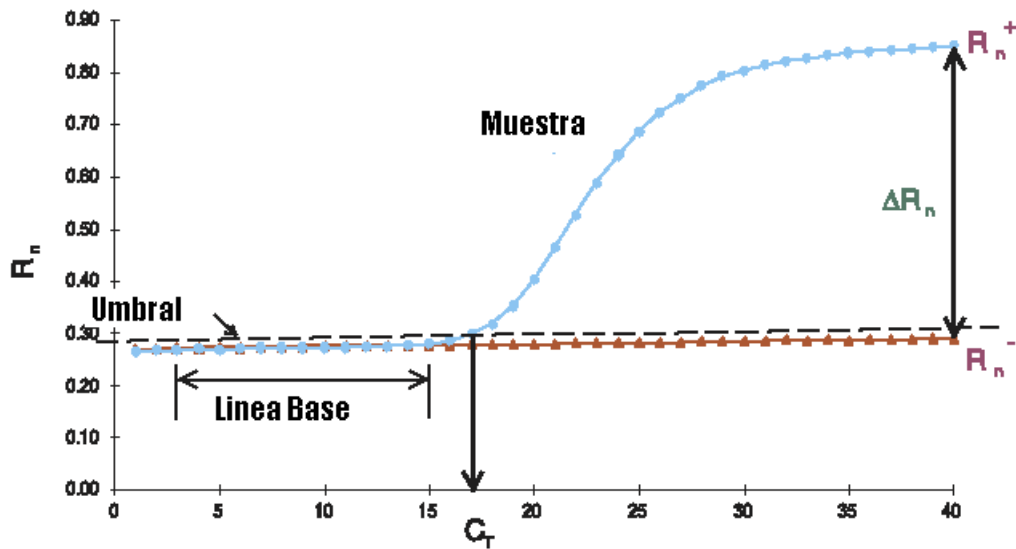


Figura 20. Modelo representativo de una sola gráfica de amplificación mostrando los términos utilizados en la PCR en Tiempo Real. En los ciclos iniciales en donde no hay un cambio significativo en la señal de fluorescencia se define como línea base; Umbral o Threshold: es el nivel determinado automáticamente o manualmente y fijado en la región exponencial de la gráfica de amplificación, por encima de la línea base, determina el nivel de fluorescencia significativamente superior a la fluorescencia basal. Se emplea para la determinación del Ciclo umbral (CT); el Ciclo umbral, es el ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera el umbral. Se calcula en escala logarítmica. El CT se emplea para la cuantificación relativa de la expresión génica. (http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf)

La gráfica del logaritmo del número inicial de copias del blanco para un sistema de estándares contra C_t es una línea recta. La cuantificación de la cantidad de blanco en muestras desconocidas es lograda midiendo C_t y usando la curva estándar para determinar el inicio del número de copias.

Curva estándar para PCR en Tiempo Real

Para obtener datos cuantitativos es necesario contar con o realizar previamente una curva estándar empleando la misma química para el target en estudio. La curva estándar se prepara a partir de una serie de diluciones de un templado control de concentración conocida; se puede utilizar una variedad de targets, incluyendo: plásmidos con un gen clonado de interés (GOI), DNA genómico, DNA codificante, oligonucleótidos sintéticos, transcripts *in vitro* o RNA. Los plásmidos o transcripts *in vitro* son los más utilizados.¹⁷

Los siguientes aspectos son críticos para la obtención de curvas estándares:

La pureza del DNA o del RNA y la precisión del pipeteo para disminuir la propagación de errores en las diluciones sucesivas, estabilidad de los estándares, especialmente la del RNA. En este último caso, se recomienda fraccionar los estándares en alícuotas y almacenarlos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para descongelarlos en el momento de uso. No es conveniente realizar más de tres ciclos de congelación-descongelación.

No es recomendable utilizar DNA como estándar para la cuantificación absoluta de RNA, a menos que se disponga de un control de la eficiencia de la transcripción inversa

La curva estándar se construye representando gráficamente el Ct obtenido de la amplificación de cada dilución en función del logaritmo de la concentración de target. Si las diluciones se han preparado correctamente y la eficiencia de la amplificación no cambia en el rango de concentración del templado, se obtendrá una línea recta, la curva estándar. Al interpolar los valores de Ct de las muestras de concentración desconocida con la curva estándar, es posible la cuantificación de sus concentraciones. (ver figura 21).

Es importante considerar que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos

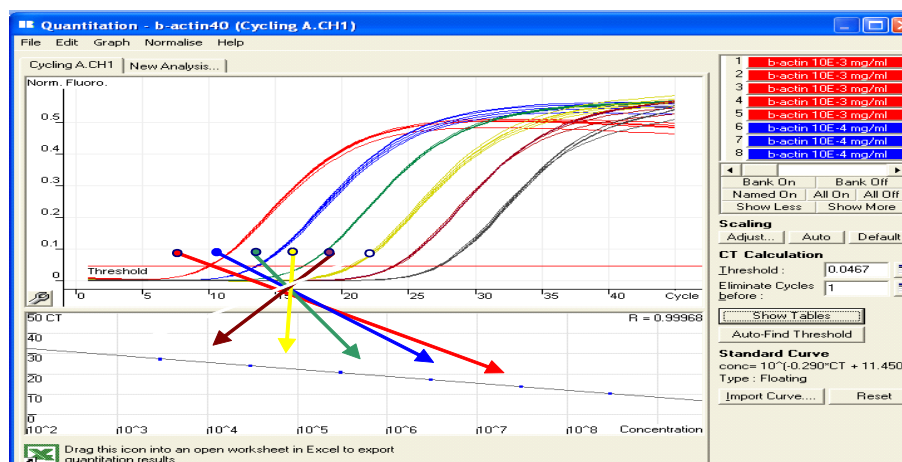


Figura 21. Curva patrón para cuantificación empleada en PCR en Tiempo Real. (Curva tomada del ROTOR GENE Corbett Research)

En las cuantificaciones de cualquier ácido nucleico de interés es necesario asegurarse que los valores obtenidos son reales y no se deben a diferencias en la cantidad de DNA/RNA por variaciones en el proceso, por ejemplo, en la eficiencia de extracción de ácido nucleico, a la presencia de inhibidores de la PCR o a degradación del mismo, por este motivo se utiliza un control interno, que consiste en un gen o secuencia de DNA o RNA diferente al que se requiere analizar y que se amplifica a partir de la extracción obtenida de la misma muestra al que se le realiza el análisis del gen de interés, y que puede estar marcado su sonda con otro fluoróforo diferente para su amplificación. El control interno debe estar presente constitutivamente en la muestra, o bien, puede añadirse en la misma, antes de realizar el proceso de extracción. Todas las muestras a analizar, en caso de añadirse el control interno deben de procesarse en un mismo volumen y con la misma cantidad del control.

Consideraciones aritméticas de la curva estándar empleada en PCR Tiempo Real

- La curva estándar es generada mediante el análisis de regresión lineal.
- La curva debe ser lineal sobre el rango de concentración completo. El estadístico utilizado para evaluar la linealidad es el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson (R^2) el cuál debe ser muy cercano a 1 ($\geq 0,985$).
- Una curva estándar lineal, implica que la eficiencia de la amplificación es consistente a concentraciones del templado variables. Si la curva estándar se vuelve no lineal a bajas concentraciones de templado es probable que nos estemos aproximando al límite de detección del ensayo.
- La eficiencia de la curva estándar debe de estar entre 90 y 110 % (pendiente entre $-3,6$ y $-3,1$), además de próximas entre ellas ($<5\%$).
- 100 % de eficiencia: indica una duplicación perfecta del amplicón en cada ciclo.
- <100 % eficiencia: implica que la reacción esta lentificándose en alguna etapa; puede ser a consecuencia de la presencia de inhibidores, conjunto no apropiado de primers o condiciones de reacción.

- >100% eficiencia: pipetas descalibradas, degradación de la sonda, formación de productos no específicos, dímeros de los primers.

Desviaciones en la eficiencia pueden también deberse a preparaciones deficientes de las diluciones sucesivas, a un rango de concentraciones que puedan inhibir la PCR (altas concentraciones de templado) o que excedan la sensibilidad del ensayo (bajas cantidades de templado).

Es importante recordar que para este tipo de cuantificación, una curva estándar debe ser corrida en la misma placa de las muestra desconocidas; las réplicas pueden variar en el Ct cuando son corridas en tiempos diferentes o en placas diferentes y así no son comparables directamente con otras corridas (variaciones entre 5 y 10%).^{17,18}

En la PCR a tiempo real el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de DNA) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles.

1.11.2.4 Equipos para PCR en tiempo real

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los más utilizados son los equipos fabricados por Applied Biosystems y Roche Diagnostics, en la figura 22 se muestra el Corbett Research 3000. Las diferencias más importantes entre estos equipos hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante. Disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de DNA diana en la misma reacción (PCR múltiple) o incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores.



Figura 22. Equipo empleado para PCR-Tiempo Real. (www.biotols.net)

Los programas de los equipos de PCR a tiempo real tienen las opciones de: Amplificación y detección de DNA o RNA diana en la muestra, PCR múltiple, Cuantificación del DNA o RNA diana en la muestra y Análisis de curvas de disociación.

1.11.2.5 Ventajas de la PCR en tiempo real

La primera gran ventaja de la PCR en tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Otra ventaja muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor (5-6 log) que en los procedimientos convencionales (2-4 log). Asimismo, la determinación de mutaciones puntuales que pueden estar relacionadas con resistencias a medicamentos antimicrobianos o con factores de virulencia, es mucho más fácil. Los equipos para PCR a tiempo real tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.

1.11.2.6 Aplicaciones de la PCR en tiempo real en el diagnóstico Biomédico

Microbiología: diagnóstico e identificación de patógenos. Medición de cargas virales y bacterianas, identificación de resistencia a los tratamientos (aparición de cepas mutantes), genotipificación.

Oncología/oncohematología: medición de la expresión de genes relacionados con diferentes tipos de tumores con valor diagnóstico, pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento, determinación y cuantificación de diferentes traslocaciones causantes de desórdenes oncohematológicos.

Genética Humana: determinación de mutaciones y polimorfismos causantes de enfermedades genéticas y de predisposición génica, determinación y cuantificación de variantes alélicas (polimorfismos) relacionados con diferentes respuesta a drogas (farmacogenética).^{23,24,25,26,27}

JUSTIFICACION

La técnica de PCR en Tiempo Real, es una prometedora herramienta en términos de cuantificación del RNA del VHC para la aplicación clínica, además tiene como principio ser un análisis más confiable para la cuantificación de genomas virales ya que la cuantificación de las muestras se realiza en el curso de la fase exponencial de la reacción a diferencia de las demás variantes de PCR donde la cuantificación se realiza en la fase de meseta.

HIPÓTESIS

Si la metodología implementada cumple con los criterios de linealidad, variación intraensayo, variación interensayo y especificidad, entonces podrá ser empleada como un método de diagnóstico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una metodología para cuantificar la carga viral del Virus de la Hepatitis C (VHC) mediante la técnica de RT-PCR en Tiempo Real (Retrotranscripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real).

Objetivos particulares:

- Realizar el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región conservada 3'UTR de los diferentes genotipos del VHC utilizando el programa Mult Alin, para obtener la zona consenso del virus.
- Realizar el diseño de los primers y la sonda Taqman para el VHC mediante el programa Primer3Plus para el RT-PCR en tiempo real.
- Llevar a cabo la validación del método empleando las pruebas de especificidad analítica, reproducibilidad (variación intraensayo y variación interensayo)
- Evaluar la eficacia del método a implementar calculando la correlación existente entre el método de PCR en Tiempo Real contra el ensayo comercial Cobas Amplicor versión 2.0

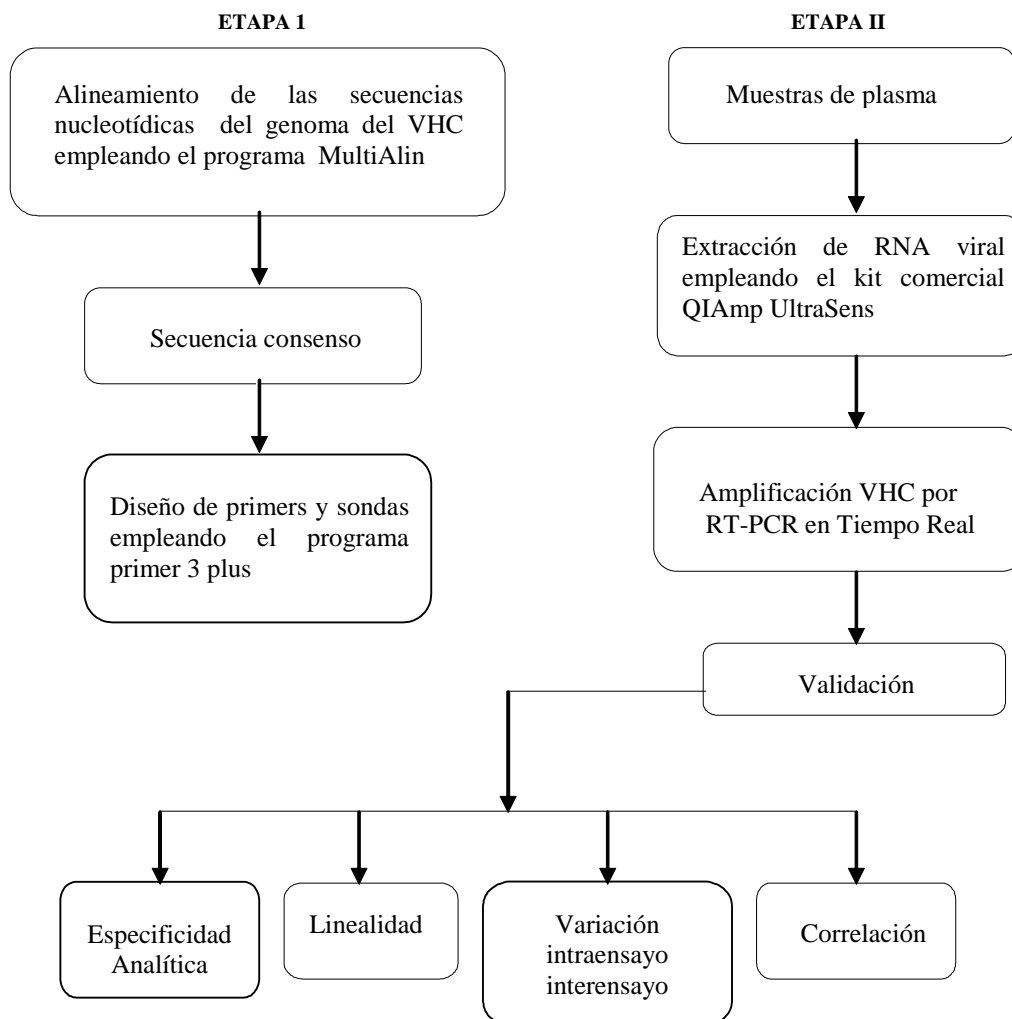
METODOLOGIA

Para llevar a cabo el desarrollo ésta tesis la metodología se dividió en dos etapas:

Etapa 1: corresponde al diseño de los cebadores y la sonda, así como el alineamiento de la secuencia de los diferentes genotipos de Virus de la Hepatitis C (VHC),

Etapa 2: corresponde al proceso para la validación del método lo cual se observa en el esquema metodológico.

ESQUEMA METODOLOGICO



DESCRIPCION DE RESULTADOS

Alineamiento.

Como primer paso para llevar a cabo el procedimiento experimental se procedió a realizar el alineamiento de las secuencias nucleotídicas que representan los 6 genotipos y subtipos conocidos hasta la fecha del Virus de la Hepatitis C, éstas secuencias fueron consultadas en la página de Internet Genbank (www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/). Y una vez que obtuvimos las secuencias se realizó el alineamiento de las mismas haciendo uso del programa Mult Alin, (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). Ver figura 23

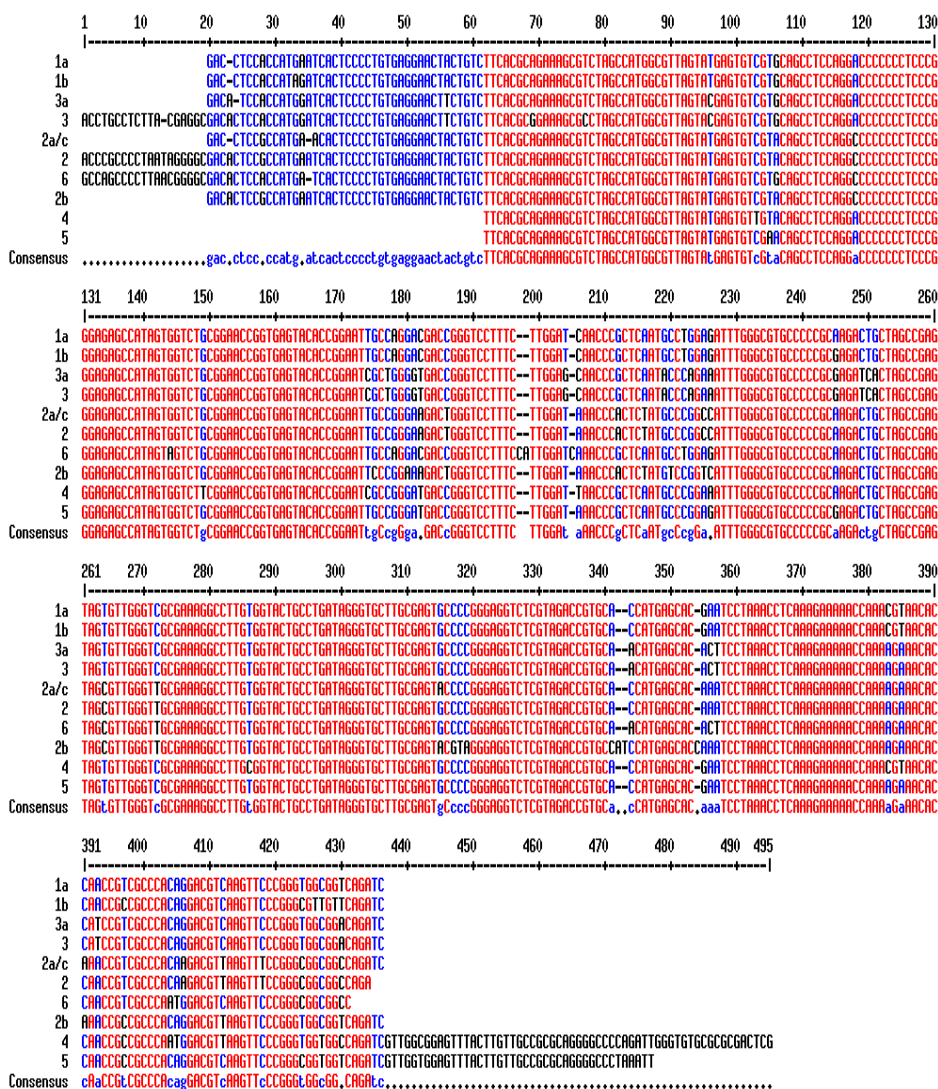


Figura 23. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región conservada 5'UTR de los diferentes genotipos del VHC, las secuencias de Hepatitis C fueron obtenidas del Genbank. Del lado izquierdo aparece el nombre de las secuencias nucleotídicas empleadas marcándose en negro las secuencias que son iguales (secuencias conservadas) y en rojo se señalan las bases en las que hay diferencias (secuencias variables).

Diseño de primers y sonda Taqman para el VHC

Del alineamiento realizado se obtuvo una secuencia la cual llamamos “secuencia consenso” ver figura 24, misma que utilizamos como blanco para realizar el diseño de los primers y de la sonda tecnología TaqMan que serían empleados para identificar el VHC, para realizar el diseño empleamos el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Una vez que obtuvimos el diseño de los Primers y Sonda solicitamos su síntesis al laboratorio de Applied Biosystem (AB); el cuál nos hizo entrega de la sonda marcada con el flourocromo JOE.

```
TCCNCCATNNANCACTCCCCTGTGAGGANCTNCTGTCTTCACGCAGAAA  
GCGTCTAGCCATGGCGTTAGTANGAGTGTTCGTNCAGCCTCCAGGNCCC  
CCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCG  
GAATNNCNGNNGACNNGGTCCTTTCTTGGANNAACCCNCTCNATNNC  
NNGNNATTTGGGCGTGCCCCGCNAGANNCTAGCCGAGTAGNGTTGG  
GTNGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTNCN  
NNGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCNNNNCATGAGCACNNNNTCCNAAAC  
CTCAAAGAAAAACCAAANGNAACACNAACCGNCGCCCACANGACGTNA  
AGTTNCCGGGNGNNGNNCAGATC
```

Figura 24. Representación de la Secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento de los diferentes genotipos del VHC, la cual, es conservada en los diferentes genotipos en las bases A,T,G,C, mientras que la bases que no son conservadas se nombraron con la letra N.

Primers y sonda Taqman para el Virus del Nilo (Control Interno)

La técnica de RT-PCR en Tiempo Real incluye un control interno, en nuestro proceso empleamos la secuencia nucleotídica del virus del nilo (VN) como control interno ver figura 25, el cuál es un producto comercial con tecnología Armored, el diseño de los primers y sonda para nuestro control interno también fue solicitada laboratorio de Applied Biosystem; en éste caso la sonda para el Virus del Nilo fue marcada con el flourocromo FAM.


```
CGATTTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTTCAGGTTACACAGCAATTGCTC
CGACCCGAGCAGTGCTGGATCGATGGAGAGGTGTGAACAAACAAACAG
CGATGAAACACCTTCTGAGTTTTAAGAAGGAACTAGGGACCTTGACCA
GTGCTATCAATCGGCGGAGCTCAAAACAAAGAAAAGAGGAGGAAAGAC
CGGAATTGCAGTCATGATTGCCTCGCCAGCGTAGGAGCAGTTACCCTC
TCTAACTTCCAAGGGAAGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTC
ACAGATGTCATCACGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAACCTATGCATTG
TCAGAGCAATGGATGTGGGATAACATGTGCGATGATACTATCACTTATGA
ATGCCCAGTGCTGTCCGGCTGGTAATGATCCAGAAGACATCGAATG
```

Figura 25. Representación de la Secuencia nucleotídica que corresponde al Control Interno Virus del Nilo tecnología Armored®

Extracción del RNA viral

El RNA viral fue extraído a partir de 500 µL de plasma humano (muestras de rutina); para llevar a cabo el proceso se hizo uso del kit QIAm Ultrasens Virus, para iniciar el proceso de extracción de RNA, a cada muestra de plasma, se le adiciono un microlitro de control interno (secuencia nucleotídica comercial del Virus del Nilo tecnología Armored).

RT-PCR en tiempo real.

La reacción RT-PCR-Tiempo Real consistió: La retrotranscripción inicial 45°C por 30 minutos, Desnaturalización 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos en la fase de PCR cada ciclo de 95°C por 15 segundos, 57°C por 60 segundos y 72°C por 20 segundos.

La reacción de RT –PCR en Tiempo Real se prepara con 300 nmoles de sonda Taqman para el VHC, 300 nmoles de sonda Taqman para el CI, 0.4 U de enzima SuperScript III RT, 600 nm de primers específicos para VHC y CI, buffer de la enzima SuperScript III RT, agua grado molecular y RNA extraído en un volumen final de 20 µl; una vez finalizada la reacción, el producto de amplificación obtenido es visualizado en un gel de agarosa al 4%, en donde se pueden observar dos bandas, la primer banda corresponde al producto de amplificación del VHC con un tamaño de 110 pares de bases y la segunda banda corresponde al producto de amplificación del Control Inteno (Virus del Nilo) que presenta un tamaño de 77 pb. Ver figura 26

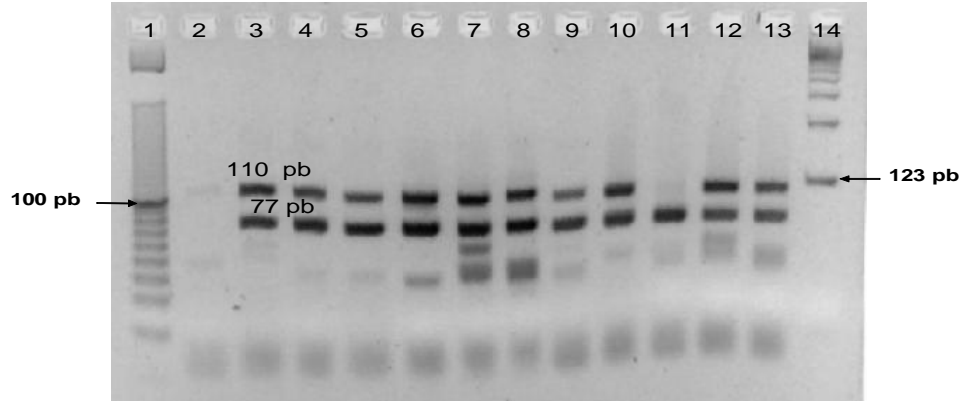


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de los productos de amplificación de la técnica de RT-PCR en tiempo real del VHC. El carril 1 corresponde al marcador de 100 pb, el carril 2 corresponde al control negativo de reacción, los carriles 3,4,5,6,7,8,9,10,12 y 13 representan a pacientes VHC positivos, el carril 11 representa al control negativo de reacción y el carril 14 representa al marcador de 123 pb..

Construcción de la curva de calibración para el VHC

Todo PCR-Tiempo Real incluye una curva de calibración; para obtenerla, se emplearon una serie de muestras positivas para el VHC de concentración conocida de las cuales se prepararon una serie de 4 diluciones (1:10) empleando plasma humano negativo[®]; la curva de calibración que decidimos emplear en el análisis de RT-PCR en Tiempo Real cumplió con las siguientes consideraciones aritméticas: coeficiente de correlación $R^2=0.998$, una pendiente $m= -3.242$ y eficiencia de 1.03; a cada punto de ésta curva le corresponde respectivamente la siguiente concentración: 750,000 UI/mL; 75,000; 7,500 y 750 UI/mL. ver Figura 27.

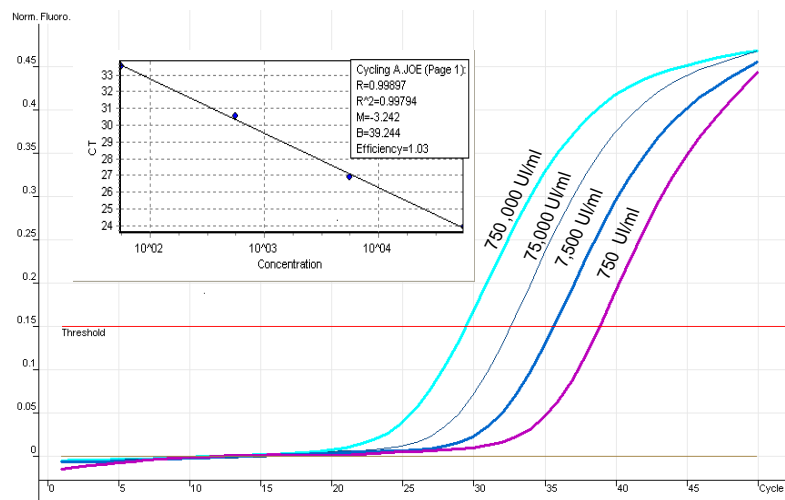


Figura 27. Gráfica que corresponde a la curva de calibración empleada en la reacción de RT-PCR en Tiempo Real. En la representación gráfica se observan cuatro señales de fluorescencia de diferentes colores las cuales representan las siguientes concentraciones 750,000 UI/mL; 75,000; 7,500 y 750 UI/mL; la línea gris representa el control negativo de reacción y la línea roja representa el threshold (ciclo umbral), en el recuadro superior izquierdo aparecen los parámetro estadístico de la curva: $R^2=0.998$, $m= -3.242$ y eficiencia de 1.03. (Figura tomada del Rotor Gene 3000 Corbett Research).

Curva de Calibración CI

Para construir la curva de calibración para el Control Interno se prepararon una serie de 4 diluciones empleando plasma negativo[®] a partir de una muestra de concentración conocida del Virus del Nilo[®], la concentración que le corresponde a cada punto de la curva es de 1,2,3 y 4 μ L respectivamente, los parámetros aritméticos son los siguientes en la cuál obtuvimos una $R^2 = 0.995$, pendiente $m= -3.367$ y una eficiencia de 0.98 ver Figura 28

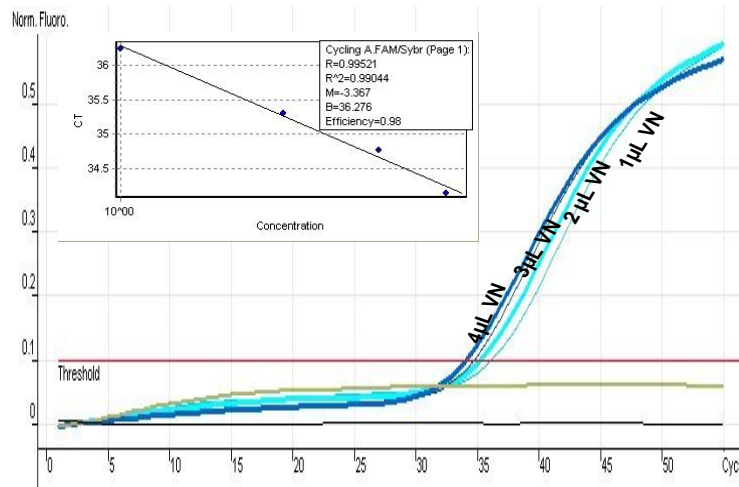


Figura 28. Grafica que representa la curva de calibración del Control Interno Virus del Nilo empleada en la RT-PCR en Tiempo real. Se observa una serie de 4 señales de fluorescencia que corresponden a concentraciones de 1,2,3 y 4 μL del CI, las líneas negra y gris son los controles negativos de reacción y la línea roja representa el threshold (ciclo umbral), en el recuadro superior izquierdo aparecen los parámetro estadístico de la curva: $R^2=0.998$,pendiente $m= -3.367$ y eficiencia de 0.98. (Figura tomada del Rotor Gene 3000 Corbett Research).

Especificidad Analítica

Para evaluar la especificidad analítica de los primers y sondas empleadas para el VHC, éstos se sometieron al Proceso de PCR-Tiempo real con 14 diferentes extracciones de secuencias nucleotídica de DNA y RNA de distintos tipos de microorganismos los cuales son: Virus de Hepatitis A y Hepatitis B, Virus de Papiloma Humano, Trichomona, Mycobacteria, Neisseria sp, Epstein Barr, Parvovirus B19, Herpes tipo I y II, Citomegalovirus y Virus de Inmunodeficiencia Humana, Parvovirus además se una secuencia nucleotídica perteneciente al VHC; los resultados obtenidos de la reacción de PCR en Tiempo Real mostraron que no hubo señal de amplificación en ningún caso de encias nucleotídica de microorganismos diferente al VHC.(ver Figura 29)

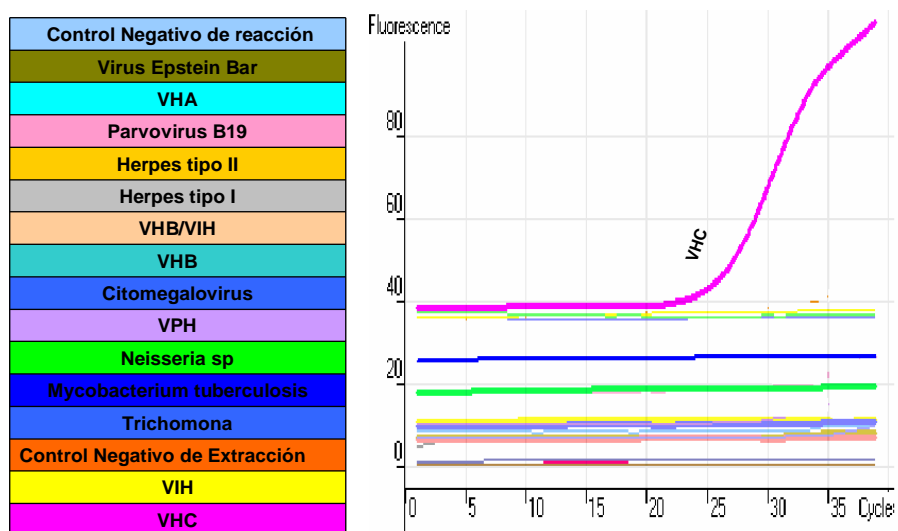


Figura 29. Gráfica que representa el resultado de la especificidad analítica obtenida en la técnica de PCR-Tiempo real. En la gráfica se observa una única señal de fluorescencia de color rosa la cual corresponde al amplificado de la secuencia nucleotídica del VHC; las demás líneas continuas representan la ausencia de amplificación pertenecientes a las secuencias nucleotídicas diferentes al VHC, al control negativo de extracción y al control negativo de reacción. (**Figura tomada del Rotor Gene 3000 Corbett Research**)

Linealidad

Para evaluar el análisis de linealidad para el método de RT-PCR Tiempo Real, se preparó una serie de diluciones: 1/10,1/100,1/1000, a partir de una muestra con un alto título de partículas virales del VHC (770,000 UI/mL); las diluciones fueron preparadas con plasma humano negativo[®]: y cada dilución fue analizada por triplicado.

Para estudiar el comportamiento del ensayo de linealidad se procede a graficar la concentración de la Carga viral del VHC obtenida por RT-PCR en Tiempo Real (UI/mL) contra Carga Viral del VHC de concentración conocida (UI/mL). en donde se obtuvo una correlación $r^2 = 0.999$ Ver figura 30

Carga viral del VHC concentración conocida (UI/mL)	1era lectura	2da lectura	3er lectura	Carga viral del VHC en Tiempo Real (UI/mL) MEDIA	DS	CV
770,000	792,503	906,991	558,909	752,801	177405	24%
77,000	96,609	91,015	73,673	87,099	11959	14%
7,700	6,139	4,527	4,485	5,050	943	19%
770	515	500	315	443	112	25%

Tabla 2. Resultados de la carga viral del VHC para el análisis de Linealidad del método RT-PCR en Tiempo Real; en esta tabla se reporta la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las cuatro concentraciones de carga viral de VHC que fueron analizadas por triplicado.

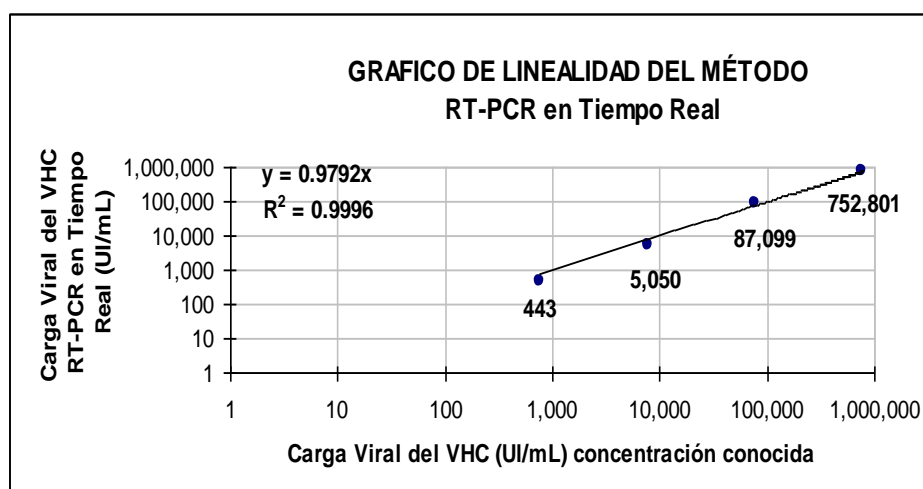


Figura 30. Representación gráfica del análisis de linealidad; del lado superior izquierdo se muestra el valor de correlación obtenido $r^2 = 0.999$, cada uno de los puntos de la línea de tendencia representa la media de la Concentración de Carga Viral del VHC (UI/mL) RT-PCR en Tiempo Real.

Variación Inter-ensayo

Para llevar a cabo el análisis de variación interensayo empleamos 19 muestras de plasma positivas para el VHC que van de concentraciones de 1000 a 1000000 copias UI/mL, cada muestra fue sometida al RT-PCR en Tiempo Real, cada una se analizó en tres ensayos diferentes; para evaluar el resultado de éste análisis, se calculo la media, DS y CV de la carga viral obtenida en este ensayo. Ver tabla 3.

N° Muestra	1er lectura copias UI/mL	2da lectura copias UI/mL	3er lectura copias UI/mL	Promedio copias UI/mL	DS	CV
1	3,496	2,606	2,417	2,840	576.20338	20%
2	16,520	18,567	12,843	15,977	2900.4228	18%
3	138,493	161,259	174,715	158,156	18309.324	12%
4	37,115	34,389	44,028	38,511	4968.7518	13%
5	4,497	4,645	6,634	5,259	1193.3702	23%
6	102,257	124,738	141,779	122,925	19823.301	16%
7	5,510	4,681	3,012	4,401	1272.3211	29%
8	25,128	26,915	18,236	23,426	4582.9044	20%
9	220,234	252,239	287,023	253,165	33404.134	13%
10	130,104	164,462	156,303	150,290	17950.994	12%
11	53,389	57,331	89,308	66,676	19698.741	30%
12	58,376	102,384	81,522	80,761	22013.876	27%
13	2,949	2,874	4,000	3,274	629.56361	19%
14	19,934	20,751	14,548	18,411	3370.304	18%
12	149,012	162,032	192,229	167,758	22170.131	13%
16	64,983	112,079	120,384	99,149	29878.3	30%
17	49,151	44,055	54,167	49,124	5056.0527	10%
18	2,233	2,988	2,104	2,442	477.51475	20%
19	36,555	41,639	23,762	33,985	9211.361	27%

Tabla 3. Tabla de Resultados del interensayo, en esta tabla se reporta la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación del valor de la carga viral de 19 muestras analizadas en tres ensayos.

Variación Intraensayo

Para hacer el análisis Intraensayo, se ocuparon un total de 7 muestras de plasma positivas para el VHC de concentraciones que van desde 300 a 1000000 copias UI/mL; cada una se analizó por triplicado en una misma corrida de RT-PCR en Tiempo Real. El resultado de la media, DS y CV de la carga viral se encuentra reportado en la tabla 4.

N° de muestra	1er lectura	2da lectura	3er lectura	Promedio	DS	CV
1	236,612	226,917	201,833	221,787	17,948	8%
2	1,148,488	1,383,562	1,122,721	1,218,257	143,737	12%
3	986,503	1,033,918	1,197,558	1,072,660	110,733	10%
4	1,426,198	1,647,714	1,675,046	1,582,986	136,468	9%
5	396	303	339	346	47	14%
6	2,510	2,559	2,810	2,626	161	6%
7	617,088	528,027	595,339	580,152	46,432	8%

Tabla 4. Tabla de Resultados del análisis Intraensayo de RT-PCR en Tiempo Real, En esta tabla queda reportado la media, desviación estándar y el coeficiente de variación, del resultado de carga viral de las siete muestras de plasma positivas para el VHC analizadas por triplicado.

Análisis de correlación para el método RT-PCR en Tiempo Real

Para llevar a cabo el análisis de correlación empleamos 91 muestras de plasma de concentración desconocida, estas muestras fueron tomadas al azar, todas las muestras fueron analizadas tanto por el método de RT-PCR en Tiempo Real como por el método Cobas Amplicor versión 2.0, los resultados obtenidos por ambos métodos fueron sometidos al análisis de correlación en donde obtuvimos un resultado de 0.85 Ver figura 31.

RESULTADOS DE LA CARGA VIRAL DEL VHC					
N° Muestra	Carga Viral Cobas Amplicor UI/mL	Logaritmo	Carga viral Tiempo-real UI/mL	Logaritmo	Diferencia de logaritmo
1	300	2.5	230	2.4	-0.1
2	300	2.5	300	2.5	0
3	300	2.5	300	2.5	0
4	300	2.5	300	2.5	0
5	300	2.5	300	2.5	0
6	300	2.5	300	2.5	0
7	300	2.5	300	2.5	0
8	300	2.5	300	2.5	0
9	300	2.5	300	2.5	0
10	300	2.5	300	2.5	0
11	300	2.5	300	2.5	0
12	300	2.5	300	2.5	0
13	300	2.5	300	2.5	0
14	300	2.5	300	2.5	0
15	300	2.5	300	2.5	0
16	223	2.3	300	2.5	0.1
17	300	2.5	300	2.5	0
18	300	2.5	230	2.4	-0.1
19	300	2.5	441	2.6	0.2
20	300	2.5	441	2.6	0.2
21	223	2.3	300	2.5	0.1
22	25,200	4.4	583	2.8	-1.6
23	63,200	4.8	1,599	3.2	-1.6
24	3,000	3.5	2,055	3.3	-0.2
25	25,200	4.4	2,443	3.4	-1
26	63,200	4.8	5,043	3.7	-1.1
27	150,000	5.2	4,106	3.6	-1.6
28	3,000	3.5	2,055	3.3	-0.2
29	300	2.5	3,007	3.5	1
30	37,300	4.6	4,759	3.7	-0.9
31	150,000	5.2	5,363	3.7	-1.4
32	31,900	4.5	31,544	4.5	0
33	285,000	5.5	68,459	4.8	-0.6
34	122,000	5.1	20,330	4.3	-0.8

35	37,900	4.6	26,737	4.4	-0.2
36	25,200	4.4	21,631	4.3	-0.1
37	63,200	4.8	47,239	4.7	-0.1
38	90,300	5	79,935	4.9	-0.1
39	147,000	5.2	44,418	4.6	-0.5
40	25,200	4.4	10,597	4	-0.4
41	63,200	4.8	7,301	3.9	-0.9
42	154,000	5.2	82,476	4.9	-0.3
43	157,000	5.2	80,801	4.9	-0.3
44	137,000	5.1	65,115	4.8	-0.3
45	90,300	5	13,348	4.1	-0.8
46	147,000	5.2	8,980	4	-1.2
47	154,000	5.2	46,196	4.7	-0.5
48	157,000	5.2	14,105	4.1	-1
49	173,000	5.2	33,292	4.5	-0.7
50	137,000	5.1	10,404	4	-1.1
51	90,300	5	7,450	3.9	-1.1
52	147,000	5.2	20,297	4.3	-0.9
53	157,000	5.2	45,314	4.7	-0.5
54	137,000	5.1	50,125	4.7	-0.4
55	285,000	5.5	68,459	4.8	-0.6
56	122,000	5.1	20,330	4.3	-0.8
57	37,900	4.6	26,737	4.4	-0.2
58	31,900	4.5	31,544	4.5	0
59	238,000	5.4	62,526	4.8	-0.6
60	61,900	4.8	28,605	4.5	-0.3
61	235,000	5.4	70,439	4.8	-0.5
62	13,800	4.1	8,318	3.9	-0.2
63	46,600	4.7	55,057	4.7	0.1
64	154,000	5.2	130,315	5.1	-0.1
65	313,000	5.5	502,750	5.7	0.2
66	237,000	5.4	178,926	5.3	-0.1
67	492,000	5.7	264,593	5.4	-0.3
68	261,000	5.4	465,968	5.7	0.3
69	173,000	5.2	331,794	5.5	0.3
70	261,000	5.4	202,416	5.3	-0.1
71	769,000	5.9	749,603	5.9	0
72	237,000	5.4	178,926	5.3	-0.1
73	148,000	5.2	152,270	5.2	0
74	492,000	5.7	264,593	5.4	-0.3

75	185,000	5.3	102,590	5	-0.3
76	236,000	5.4	168,702	5.2	-0.1
77	313,000	5.5	640,482	5.8	0.3
78	293,000	5.5	245,340	5.4	-0.1
79	420,000	5.6	661,174	5.8	0.2
80	174,000	5.2	109,385	5	-0.2
81	261,000	5.4	329,343	5.5	0.1
82	173,000	5.2	93,907	5	-0.3
83	313,000	5.5	502,750	5.7	0.2
84	769,000	5.9	894,224	6	0.1
85	489,000	5.7	833,976	5.9	0.2
86	769,000	5.9	837,359	5.9	0
87	795,000	5.9	2,059,283	6.3	0.4
88	745,000	5.9	2,880,112	6.5	0.6
89	489,000	5.7	1,068,179	6	0.3
90	925,000	6	2,188,362	6.3	0.4
91	613,000	5.8	1,539,535	6.2	0.4

Tabla 5. Resultados de la carga viral de 91 muestras de plasma cuantificadas por el método de Cobas Amplicor y PCR-Tiempo Real.

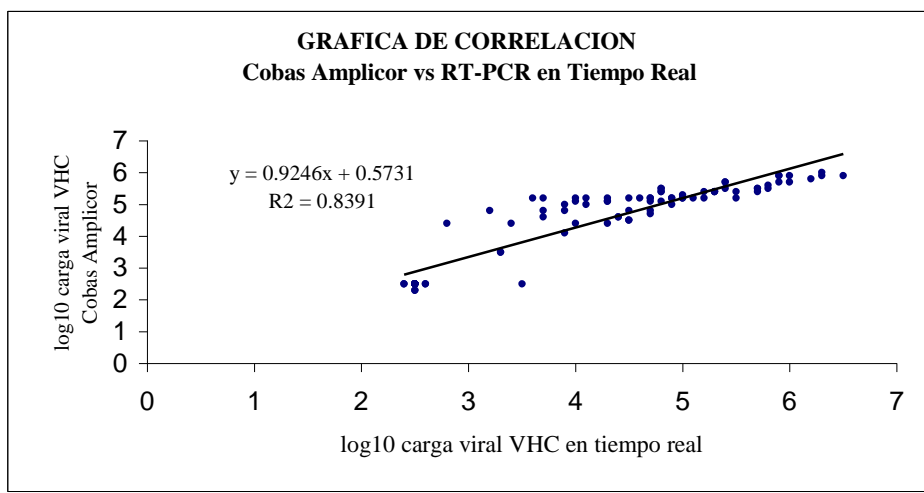


Figura 31. Gráfico que representa el resultado de la correlación de la carga Viral del VHC, empleando el método Cobas Amplicor vs RT-PCR en tiempo real, el valor de la correlación obtenido es 0.85

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La estrategia empleada para la validación de de éste trabajo arrojó excelentes resultados; Como primer paso para realizar éste proyecto; se procedió, a obtener la zona conservada del VHC que represente todas las secuencias nucleotídicas del VHC a realizar el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genotipos y subtipos del VHC, el producto obtenido nos determinó la zona conservada para los 6 diferentes genotipos y subtipos del VHC (1a ,1b , 3a , 3, 2ac, 2, 2b, 4 , 5 y 6), ésta zona conservada se empleó para hacer el diseño de los primers y la sondas tecnología Taqman, la síntesis de los primers y las sondas empleadas para detectar la secuencia nucleotídica del VHC y del Control Interno (Virus del Nilo) fueron solicitadas al laboratorio de Applied Biosystem; el cuál nos hizo entrega de las sondas marcadas, una de ellas marcada con el fluorocromo FAM (para el control Interno) y la otra sonda fue marcada con el fluorocromo JOE (para el VHC); en éste trabajo se probaron varios diseños de sondas para amplificar la secuencia nucleotídica del VHC, éstas fueron sometidas al proceso de RT-PCR en Tiempo Real; y se eligió la que presentó mejor señal de amplificación en el proceso de reacción. Posteriormente para verificar que los productos de amplificación obtenidos correspondan tanto a la secuencia del VHC y secuencia del Control Interno, los productos de amplificación se sometieron a corrimiento en gel de agarosa al 4%; en donde observamos dos tamaños de banda; una de 110 pares de bases (pb) que corresponde al amplificado del VHC, y la segunda banda con un tamaño de 77 pb que pertenece al Control Interno. En lo que refiere al análisis de Especificidad Analítica, demostramos que las sondas y primers empleados solamente, reconocen específicamente la secuencia del VHC, ya que, durante el proceso de reacción de PCR en ninguna de las 14 extracciones de secuencias nucleotídicas pertenecientes a microorganismos diferentes al VHC, se observó señal de amplificación; así de esta forma descartamos la presencia de falsos positivos que, nos impidieran continuar con la validación de nuestro método.

Para poder realizar la cuantificación de la carga viral del VHC en la reacción de PCR-Tiempo Real evaluamos varias curvas de calibración, de ellas sólo elegimos la que cumplió con los siguientes parámetros: coeficiente de correlación R^2 igual a 0.99, eficiencia de 1.0 y pendiente de -3.24, las concentraciones de la misma son las siguientes 750,000 UI/ml,

75,000 UI/ml, 7,500 UI/ml, 750 UI/ml, la curva de calibración se preparó haciendo diluciones a partir de una muestra de concentración conocida positiva para el VHC empleando la misma química del target en estudio; así de ésta forma empleamos 4 diluciones exponenciales que fueron almacenadas a -80° C, para descongelarlas al momento de su uso. En nuestro proceso de PCR en tiempo Real incluimos un control interno el cual es el Virus del Nilo, éste control interno confirma la buena preparación y amplificación de la muestra en estudio; además la amplificación del CI no tiene influencia sobre la PCR analítica, el uso del CI requiere también la construcción de una curva de calibración, motivo por el cuál construimos una curva de cuatro puntos, los parámetro de la curva del CI arrojaron los siguientes resultados: pendiente de -3.4 y una $R^2 = 0.99$ y eficiencia de 0.98 las cuales también se almacenaron a -80° C, para su posterior uso, tanto la amplificación del CI y la transcripción reversa se realizan simultáneamente, solo que son detectados a diferentes longitudes de onda.

La extracción de RNA de las muestras de plasma, se llevo a cabo empleando el kit comercial QIAmp UltraSens, empleando un volumen de muestra de 500 μ l, antes de comenzar la extracción de RNA a todas las muestras se les coloca un microlitro de CI, mismo que fue recuperado y cuantificado en todas las muestras analizadas durante la reacción de PCR en Tiempo Real, éste resultado fue evidenciado en el proceso de reacción ya que se observó en cada muestra la señal de fluorescencia emitida por el fluorocromo FAM característica de la reacción en Tiempo Real, con este resultado garantizamos que el éxito de nuestra extracción de RNA viral. Caso que sucedió en todos nuestros análisis. En lo que refiere al análisis de Linealidad empleamos cuatro concentraciones de muestras de VHC que se sometieron al proceso de RT-PCR en Tiempo Real por triplicado, al graficar el promedio de la carga viral obtenida por PCR en Tiempo Real VS la carga viral de concentración conocida obtuvimos, una correlación de 0.999; determinando que nuestro método de PCR en Tiempo Real presenta una aceptable respuesta lineal con concentraciones hasta de 752,801 UI/mL y determinando una sensibilidad de hasta 443 UI/mL. En lo que se refiere a la Variación Intraensayo; evaluamos el comportamiento de siete muestras positivas para VHC de diferentes concentraciones (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 UI/mL, al ser sometidas cada una a tres ensayos en diferentes días, obtuvimos una variación

(CV) del 8% al 14%. El análisis de la Variación Interensayo se realizó empleando 19 muestras positivas para el VHC, las cuales fueron analizadas por triplicado, en una misma corrida de RT-PCR en Tiempo Real teniendo valores de CV que van del 10% al 30%. La eficacia del desarrollo de la técnica de RT-PCR en Tiempo Real fue evaluada comparando los resultados de carga viral de 91 muestras de plasma escogidas al azar, con el ensayo comercial Cobas Amplicor versión 2.0 el cual es considerado el método de oro para la cuantificación de cargas virales, el método Cobas es utilizado hasta el momento en el laboratorio de referencia Internacional “CARPERMOR” lugar donde se realizó éste trabajo experimental, encontrando un valor de correlación entre ambos métodos igual a 0.85 reflejando la efectividad de la prueba desarrollada.

Los resultados de variación intraensayo, variación interensayo, linealidad y correlación obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de los valores reportados en otros ensayos moleculares que emplean la técnica de PCR en Tiempo Real para la cuantificación de la carga viral del VHC.^{29,30,31,32,33,34,35,36}

La prueba desarrollada en este trabajo trae como beneficios contar con una prueba sensible, confiable y fácil de realizar además de tener un menor costo haciéndola más accesible al público en general, otra ventaja del método de Tiempo Real es que podemos ver el comportamiento de emisión de fluorescencia de todas las muestras en el momento mismo de la reacción, además de mostrar la curva de comportamiento del control interno de cada una de la muestras procesadas.

Por todo lo anterior descrito en base a los resultados obtenidos en los ensayos de linealidad, especificidad analítica, variación intraensayo, variación interensayo y el análisis de correlación obtenidos en el presente trabajo de tesis, podemos decir que los todos los objetivos planteados se cumplieron y que, por lo tanto la hipótesis planteada queda aceptada.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la prueba RT-PCR en Tiempo Real demuestran que esta técnica de análisis para cuantificar la carga viral del VHC, resultó ser una prueba sensible, confiable y de fácil manejo, y que puede ser empleada como una herramienta muy valiosa en el monitoreo de las terapias antiretrovirales empleadas en el tratamiento de la infección por el VHC; motivo por el cual puede ser implementada como técnica de diagnóstico clínico en el laboratorio de referencia Internacional “CARPERMOR”.

BIBLIOGRAFIA

1. Hernández M. y colaboradores. **Hepatitis C en el contexto de donación sanguínea.** Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2006; 44 (2);3-6.
2. Marquez M. y colaboradores. **Frecuencia y distribución de los genotipos del Virus de la Hepatitis C en población mexicana seleccionada.** Rev Mex Patol Clin 2008. 55(2); 79-87.
3. Lara C. y colaboradores. **Hepatitis C.** Med Int Mex 2003; 19 (5); 311-318.
4. Lejona S. y colaboradores. **Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.** Anuario Fundación Dr J.R. Villavicencio 2006; 14: 33-37
5. Gómez C. y colaboradores. **Biología y Métodos de Diagnóstico del virus de la hepatitis C.** Rev Biomed 2003;14:253-268.
6. Huarte M. y colaboradores. **Virología, pruebas diagnósticas, epidemiología y mecanismos de transmisión del VHC.** Anales Sis San Navarra 2009. revista electrónica http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272004000400006&lng=es&nrm=iso>
7. Chiquete E. y colaboradores. **Virus de la hepatitis.** Medigraphic Artemisa 2005. revista electrónica http://www.medigraphic.com/pdfs/invsal/isg-2005/isg_051d.pdf
8. Rivas E. y colaboradores. **Mecanismos moleculares del virus de la hepatitis C, potenciales blancos terapéuticos.** Revista de Investigación Clínica 2003;55(1); 51-64.
9. Juan C. y colaboradores. **Variabilidad genética del virus de la hepatitis C Su impacto en el diagnostico y el tratamiento de la enfermedad.** Biomedicina 2005. revista electrónica <http://www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/1-1/Variabilidad%20del%20virus%20de%20la%20hepatitis%20C.pdf>
10. Elizalde I. y colaboradores. **Tratamiento de la infección crónica por el VHC.** An. Sist. Sanit. Navar 2004. revista electrónica [http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol27/sup2/PDF/10 tratamiento%20de%20la%20VHC.pdf](http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol27/sup2/PDF/10%20tratamiento%20de%20la%20VHC.pdf)

11. García V. y colaboradores. **Virus de la hepatitis C: estado actual. Avances y problemas en el diagnóstico. Transmisión en hemodiálisis.** Nefrología 1996; 16 (2): 128-137.
12. Jiménez H. **Evolución del Virus de la Hepatitis C en muestras hospitalarias de la comunidad de Valencia.** [online] <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0704105-101426/>
13. Cosme A. y colaboradores. **Inmunología de la hepatitis C.** Rev Invest Clin 1999; 51:315-322.
14. López L. y colaboradores **Hepatitis C en Chile: Magnitud del problema.** Rev. méd. Chile 2006; 134:6:777-788.
15. Benitez A. y colaboradores. **Prevalencia del virus de la hepatitis C en el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza.** Rev Med Inst Seguro Soc 2006; 44(3): 227-233.
16. Valdespino J. y colaboradores. **Seroprevalencia de la Hepatitis C en adultos de México.** Salud pública de México 2007; 49(3): 395-403.
17. Vera de León L. y colaboradores. **Panorama epidemiológico y situacional de la hepatitis C en México.** Rev Gastroenterol Mex 2005; 70(1): 27-32.
18. Huarte M. y colaboradores. **Virología, pruebas diagnósticas, epidemiología y mecanismos de transmisión del VHC.** An.Sist.Sanit.Navar 2004; 27(2):41-50.
19. Muñoz E. y colaboradores. **Diagnóstico e interpretación de las pruebas para la hepatitis C.** Medicina Universitaria 2006; 8(32): 162-169.
20. Espy M. **Real Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing.** Clinical Microbiology Reviews 2006; 1:165-256
21. Alvarez M. y colaboradores. **Pruebas diagnósticas para hepatitis C.** Med Int Mex 2004;20(4): 368-372. revista electrónica <http://www.imbiomed.com.mx/1/PDF/Mi0045-07.pdf>
22. Muñoz G. y colaboradores. **Diagnóstico serológico y virológico de la hepatitis C y B.** Gastr Latinoam 2006; 17(2): 249-252
23. **Extracción y purificación de ácidos nucleicos** [online] <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>
24. **PCR en Tiempo Real.** [online] http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf

25. Vinueza B. **PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular.** REDVET 2009;10(2):1-13 revista electrónica <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org>
26. Costa J. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.** Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(5):299-305.
27. **Curso de posgrado PCR en Tiempo Real-aplicaciones en microbiología ambiental.** [online] <http://mail.fq.edu.uy/~microbio/QPCR/P1.doc>
28. Bustin S. y colaboradores. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerasa chain reaction assays.** Journal of Molecular Endocrinology 2000; 25: 169-193
29. Michelin B. y colaboradores. **Evaluation of the Abbot Real Time HCV assay for quantitative detection of hepatitis C virus RNA.** Journal of Clinical Virology 2007; 38:96-100
30. Sizmann. y colaboradores. **Fully automated quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in human plasma and human serum by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system.** Journal Clinical Virology 2007;38: 326–333
31. Martell M. y colaboradores. **High-Throughput Real-Time Reverse Transcription PCR Quantitation of Hepatitis C Virus RNA.** Journal of Clinical Microbiology 1999; 37(2): 327-332
32. Huang J. y colaboradores. **Performance characteristics of a real-time RT-PCR assay for quantification of hepatitis C virus RNA in patients with genotype 1 and 2 infections.** Clin Chem Lab Med 2008;46:475–80.
33. Yang J. y colaboradores. **Real-time RT-PCR for quantitation of hepatitis C virus RNA.** Journal of Virological Methods 2002;102: 119-128.
34. Allice M. y colaboradores. **Clinical evaluation of the Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan for HCV RNA quantitation in comparison with the branched-DNA assay.** Journal Medical Virology 2008; 80(2): 254-260

35. Sábato F. y colaboradores. **Comparison of Performance Characteristics of Three Real-Time Reverse Transcription-PCR Test Systems for Detection and Quantification of Hepatitis C Virus.** Journal Clinical Microbiology 2007; 45(8): 2529-2536
36. Hazari S. y colaboradores. **Development and evaluation of quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for hepatitis C virus RNA in serum using transcribed thio-RNA as internal control.** Journal of Virological Methods 2004; 116: 45-54.
37. Pasloske L. Y colaboradores. **Armored RNA Technology for Production of Ribonuclease-Resistant Viral RNA Controls and Standards.** Journal of Clinical Microbiology 1998; 36:3590-3594.
38. Leutenegger M. y colaboradores. **Real-Time TaqMan PCR as a Specific and More Sensitive Alternative to the Branched-Chain DNA Assay for Quantitation of Simian Immunodeficiency Virus RNA.** Aids Research and Human Retroviruses 2001; 17(3): 243-251.
39. Cindy R. y colaboradores. **Ribonuclease-resistant RNA Controls (Armored RNA) for reverse Transcription –PCR, Branched DNA, and Genotyping Assays for Hepatitis C Virus.** Clinical Chemistry 1999; 45(12): 2079-2085

G L O S A R I O

Amplificación: producción de copias adicionales de secuencias de secuencias de DNA.

Amplicón: producto de DNA obtenido por algún método de amplificación de secuencia.

Carga viral: cantidad de DNA o RNA de un virus que esta presente en un ml de plasma, suero o sangre total. También se le denomina a la prueba que realiza esta cuantificación.

cDNA: proceso por el que el RNA sirve de molde para producir una cadena de DNA mediante la enzima transcriptasa reversa. Proceso común en algunos virus de la familia de los retrovirus como es el caso del HIV y HCV.

Crioglobulinemia: (crioproteinemia): presencia, en plasma sanguíneo, de una variedad de gammaglobulina (crioglobulina, crioproteína), casi siempre una inmunoglobulina de tipo IgG o IgM, que precipita o se solidifica por enfriamiento y que se disuelve por recalentamiento.

DNA: material genético de todos los organismos celulares y casi todos los virus. Esta compuesta de una doble cadena que forma una doble hélice y está formada de la azúcar desoxirribosa, grupo fosfato y las bases nitrogenadas púricas: adenina, guanina y pirimídicas: citocina y timina.

DNA polimerasa: enzima que sintetiza DNA. Para comenzar la síntesis necesita un cebador de RNA o una cadena complementaria de DNA.

Electroforesis: procedimiento para la separación de moléculas basado en su diferente velocidad de migración en un campo eléctrico. Como medio de soporte se usan geles formados por sustancias como almidón, agarosa, poliacrilamida.

Elongación: adición de aminoácidos a una cadena polipeptídica.

Epitopo: también conocido como determinante antigénico, es la parte de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmune, específicamente por anticuerpos, células B, o células T.

Flavivirus: virus RNA monocatenario de sentido positivo y con envoltura.

Fluorescencia es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X. Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo humano), son transformadas en luz visible, o sea, de una longitud de onda mayor a la incidente.

Fluoróforo: (fluorocromo) compuesto que tiene la capacidad de absorber luz de una longitud de onda y emite luz en otra longitud de onda diferente.

Gen. Es la secuencia de ácido nucleico que contiene la información para codificar una proteína y es la unidad del genoma. Esta compuesto de exones e intrones. Estas unidades solos o en conjunto aportan características fenotípicas al individuo.

Genoma: todo el material genético de una célula o un individuo

Genotipo: constitución genética total o parcial de un individuo o célula.

Glomerulonefritis: es un trastorno renal que involucra la inflamación de los glomérulos.

Interferón: es una proteína con actividad antivírica e inmunomoduladora. La acción antivírica se basa en la capacidad para inhibir la síntesis de DNA y de proteínas víricas, mientras que el efecto inmunomodulador depende básicamente del aumento de la respuesta inmunitaria celular.

Interferon pegilado: resulta de la unión mediante un enlace covalente de una molécula de interferón con un polietilenglicol. La pegilación reduce el aclaramiento renal, aumentando así la semivida plasmática, lo que se traduce en una acción más sostenida. Existen dos tipos de interferones pegilados: el PEG-INF alfa 2a, que se conjuga con un polietilenglicol de 40 kD y el PEG-INF alfa 2b que lo hace con uno de 12 kD.

Nucleótidos. También conocido como bases es un compuesto químico formado por la unión de una a tres moléculas de ácido fosfórico, un azúcar de cinco átomos de carbono (desoxirribosa, ribosa) y una base nitrogenada derivada de la purina (adenina y guanina) o la pirimidina (citosina, timina y uracilo). Los nucleótidos son las unidades constituyentes de los ácidos nucleicos (DNA y RNA).

NS. Secuencias de genes virales que codifican para genes no estructurales.

ORF. Marco de Lectura Abierta. Se refiere a la secuencia de bases de un gen que da lugar al inicio de traducción a una proteína.

Plásmido: son moléculas de [ADN](#) circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN [cromosómico](#). Están presentes normalmente en [bacterias](#), y en algunas ocasiones en organismos [eucariotas](#) como las levaduras.

Primer: (cebador, iniciador): oligonucleótido de DNA o RNA que luego de la hibridación con un DNA complementario invertido, tiene un extremo 3'-OH al cual la DNA polimerasa puede agregar nucleótidos para sintetizar una cadena nueva.

Quencher: Los quenchers son moléculas que aceptan la energía de un fluorocromo y la disipan en forma de calor o fluorescencia.

RNA: molécula de longitud variable que contiene Uracilo en vez de Timina. Hay tres tipos: ARN mensajero (RNAm), RNA ribosomal (RNAr) y RNA transferente (ARNt).

Sonda. Secuencia de DNA o RNA de 10 o más pares de bases que se utiliza para detectar una secuencia de DNA o RNA de interés. La sonda se encuentra marcada en su(s) extremo(s) por una molécula fluorescente, quencher, biotina o radioactividad con la finalidad de evidenciar la presencia de la secuencia de ácido nucleico de interés.

Tecnología Armored: son un sistema de preparados de secuencias de RNA resistentes a la degradación de RNasas “blindados resistentes” son empleados como controles positivos en la PCR, estos preparados son homogéneos, no-infecciosos y cuantificables..

Transcripción: es la síntesis del RNA mensajero (mRNA), el primer paso en la extracción de la información contenida en el DNA.

Transcriptasa inversa: complejo enzimático presente en el virus de RNA y que pueden sintetizar DNA a partir de un molde de RNA

UTR. Secuencia nucleotídica de un gen que no se traduce a una proteína. Estas regiones se encuentran tanto en el extremo 5' y/o 3' de un gen.

A N E X O

Mult Alin es un programa que permite alinear simultáneamente varias secuencias biológicas.

Procedimiento para el uso de programa Mult Alin. En la página de MultAlin <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html> verá un gran rectángulo; en donde se pega (como en cortar y pegar) la secuencia de interés en formato FASTA (es decir, una línea con un comienzo > nombre de la secuencia). O en vez de pegar las secuencias, se puede dar el nombre de sus secuencias de archivo, o selecciónelo con el botón "Examinar". El siguiente paso es configurar los parámetros. Se puede encontrar ayuda haciendo clic en el signo de asociados. Simplemente utilizanso el menú pop-up o el tipo de texto o números en caso necesario. Cuando esté listo hacer clic en "Enviar datos" (se puede utilizar cualquiera de los botones en la parte superior o en la parte inferior de la página).

El tercer paso es esperar a que el servidor haga el cálculo; el resultado es enviado al navegador de Internet en forma de un texto o una página html de color, se puede cambiar el color y el tamaño de la letra.

Programa Primer3: es un programa empleado para el diseño automatizado de primers para PCR. Primer3 compara una secuencia de DNA molde con una secuencia de DNA, o proteína, para generar secuencias de primer directo, calculando todas los posibles oligonucleótidos específicos para una determinada región. Finalmente, Primer3 genera las correspondientes secuencias de primer reverso, además de calcular otra información necesaria como la temperatura de melting, o el contenido de GC de cada primer.

Procedimiento para el uso del programa Primer 3. La página principal <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> contiene la presentación del software. Para acceder al programa se elige TRY THE WEB INTERFASE.

La ventana principal del programa presenta varias características, que son muy útiles para un diseño adecuado del primer. Cada ítem es un enlace, hacia una pagina de ayuda, donde se amplía la información para su utilización .El programa tiene, en la parte superior, un cuadro donde se coloca la secuencia para la cual se desean los primers. En este lugar, existe la opción de escoger una de las librerías disponibles (ninguna,

humano, roedor y simple, roedor o drosophila), que tienen la finalidad de evitar que el primer se diseñe sobre sitios repetitivos en la secuencia (especialmente microsatélites). Debajo se presentan 3 cuadros. El primero y el tercero se seleccionan para el primer directo (LEFT PRIMER) y reverso (RIGHT PRIMER). El segundo cuadro se escoge si se desea diseñar una sonda de hibridación (HYBRIDIZATION PROBE). Si se desea, con esta información básica se puede ordenar al programa el diseño de los primers haciendo clic en PICK PRIMERS .

Una segunda parte del programa provee herramientas que permiten acomodar el diseño final de los primers a unas características específicas, que dependerán de los objetivos de la investigación. Una primera opción, en esta sección, es la identificación de la secuencia (SEQUENCE ID) que puede hacerse con números o letras. Luego sigue una casilla (TARGETS) donde se coloca una región en especial la cual se desea que los primers flanqueen. En tercer lugar está el ítem EXCLUDED REGIONS, donde se puede excluir del diseño alguna región dentro de la secuencia. Con la casilla PRODUCT SIZE RANGES se pretende elegir el tamaño del producto que los primers van a flanquear (se debe colocar un rango). Si lo que se busca es un tamaño muy específico de producto se elige CLICK HERE TO SPECIFY THE MIN, OPT, AND MAX PRODUCT SIZES ONLY IF YOU ABSOLUTELY MUST. USING THEM IS TOO SLOW (AND TOO COMPUTATIONALLY INTENSIVE FOR OUR SERVER). NUMBER TO RETURN se utiliza para escoger la cantidad de opciones, en pares de primers, que se quiere que el programa arroje. MAX 3' STABILITY sirve para determinar la estabilidad de las bases del extremo 3' de los primers.

En el caso de la opción MAX MISPRIMING, esta se puede utilizar para determinar el máximo apareamiento con una región de las librerías.

La opción PAIR MAX MISPRIMING indica el máximo permitido de suma de similitudes de un par de primers, con alguna secuencia en las librerías.

Si solo se desea definir estas características se puede hacer clic en PICK PRIMERS

Una tercera sección en esta ventana se denomina GENERAL PRIMER PICKING CONDITIONS, que nos da otras opciones de diseño. La primera, PRIMER SIZE, permite elegir la longitud de los oligonucleótidos. PRIMER TM define la temperatura de melting de los oligonucleótidos. MAX TM DIFFERENCE se utiliza para escoger la diferencia de Temperatura de melting entre uno y otro primer (se aconseja que esta diferencia sea la más pequeña posible). PRODUCT TM ayuda a escoger la temperatura de melting del amplificado o producto. PRIMER GC% sirve para escoger el porcentaje

de GC en los primers. El ítem MAX SELF COMPLEMENTARY permite definir el nivel de autocomplementaridad entre cada par de primers, en tanto que MAX 3' SELF COMPLEMENTARY define el puntaje de autocomplementaridad en el extremo 3'. En el apartado MAX #N'S se puede elegir el número máximo de bases desconocidas (N) para un primer. En cuanto a MAX POLY-X, referencia la máxima cantidad en repeticiones de una base para un primer (Ej. AAAAA). INSIDE TARGET PENALTY permite al programa incluir posiciones sobrelapadas. La función del parámetro OUTSIDE TARGET PENALTY es la de incluir regiones cercanas a la secuencia blanco. El punto FIRST BASE INDEX es para incluir la primera base de la secuencia aportada. El objetivo del apartado GC CLAMP es definir el número de Gs y Cs consecutivas en el extremo 3' de la pareja de primers. SALT CONCENTRATION es usado para calcular la temperatura de melting, en base a la concentración de sales (usualmente KCl). El argumento ANNEALING OLIGO CONCENTRATION ayuda a que se pueda determinar la temperatura de melting de los oligonucleótidos, en correspondencia a un protocolo estándar de PCR. En cuanto al parámetro LIBERAL BASE ayuda a que Primer3 acepte códigos IUPAC o IUB para bases ambiguas (N). Si se han definido estas condiciones para los primers, se puede proceder a hacer clic en PICK PRIMERS .

Más abajo, en la pagina del programa existen otras opciones, como la de incluir una región en específico (INCLUDED REGION); determinar la primera base de un codón de inicio (START CODON POSITION), afín de definir marcos de lectura; la calidad de la secuencia (QUALITY SEQUENCE) y OBJECTIVE FUNCTION PENALTY WEIGHTS FOR PRIMERS que ayudan al usuario a variar algunos de los parámetros del programa predeterminados. Finalmente, se encuentra la sección HYB OLIGOS (INTERNAL OLIGOS, que sirve para el diseño de oligonucleótidos internos usados para detección basada en hibridación, cuyas características son similares a las utilizadas para el diseño de primers.