

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA
PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCION POR EL
VIRUS DE LA HEPATITIS B, EN HEPATOPATIAS
CRONICAS Y BUSQUEDA DEL VIRUS
MUTANTE PRECORE**

POR

MIGUEL ANGEL DECTOR CARRILLO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS**

con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

OCTUBRE DE 1997

TM

RC848

.H44

D4

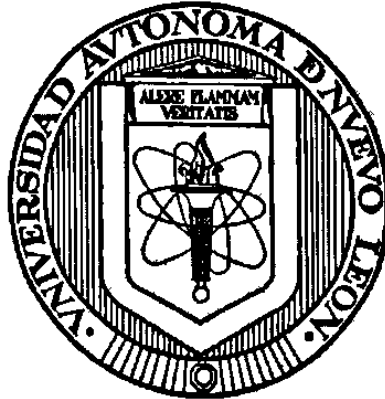
C. 1



1080072428

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNOSTICO
DE INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B, EN HEPATOPATIAS
CRONICAS Y BUSQUEDA DEL VIRUS MUTANTE PRECORE**

Por

MIGUEL ANGEL DECTOR CARRILLO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Octubre, 1997

TM
RC8
H44
D4

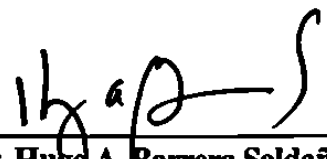
BURAWI RANDOL FITRA
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

**LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNOSTICO
DE INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B, EN HEPATOPATIAS
CRONICAS Y BUSQUEDA DEL VIRUS MUTANTE PRECORE**

Aprobación de la Tesis:



Dra. Linda E. Muñoz Espinosa.
Coasesor
Segundo Vocal




Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Coasesor
Primer Vocal



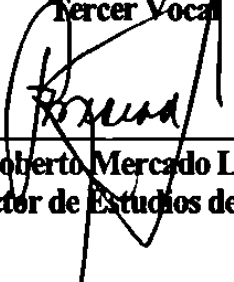
Dra. Martha Guerrero de Viader
Presidente



Dra. María del Socorro Flores de Castañeda
Secretario



Dr. Francisco J. Martínez Martínez
Tercer Vocal



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Estudios de Postgrado

La presente tesis se realizó entre la Unidad de Hígado del servicio de gastroenterología del Depto. de Medicina Interna, Hospital Universitario “José Eleuterio González” y la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los estudios con pacientes se desarrollaron en la Unidad de Hígado bajo la asesoría de la Dra. Linda E. Muñoz Espinosa y los estudios de biología molecular en la ULIEG bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes instituciones y personas que contribuyeron con apoyos económicos y materiales, sin los cuales hubiera sido imposible realizar esta tesis:

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por haberme otorgado la beca de estudios de postgrado.

Al CIBMyC por la aprobación del proyecto G-14-90, que sirvió para iniciar el equipamiento del laboratorio de biología molecular de la Unidad de Hígado.

Al CONACYT por los recursos del proyecto aprobado bajo la clave 4948-M9406, que fueron determinantes para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Pablo Valenzuela del la compañía Chiron Corp., CA. EU. por haber donado amablemente el plásmido pEco63 que fue el estándar de oro en el diagnóstico del VHB.

Al Dr. T. Jake Liang del Cancer Center de Boston Mass por la donación del plásmido p970.1, que fue valioso en la búsqueda del VHB mutante precore.

A mis asesores el Dr. Hugo Barrera por haberme dado la confianza al aceptar ser mi asesor y permitirme ser parte de la U.L.I.E.G. y la Dra. Linda E. Muñoz, por haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y además por respaldarme en mi superación académica.

Agradezco de manera especial a todos los miembros de la comisión de tesis, por su interés y apoyo para hacer de la titulación un proceso más agil, también por sus valiosos y acertados comentarios que enriquecieron la escritura de mi trabajo.

A la QFB Ma. de Jesus Ibarra, por su ayuda incondicional en la determinación de los marcadores virales, al Dr. José María Viader por su ayuda altruista en la revisión del diseño de los iniciadores, al Biol. Javier Zavala por la enseñanza del manejo computacional de las secuencias genómicas virales y a la QBP Norma Guerra por su ayuda en situaciones críticas. A las secretarias Raquel, Alejandra, Paty y Vicky, por los innumerables favores que me hicieron. A ellos mil gracias.

Sobre todas las cosas a Dios porque sin él nada de lo anterior pudiera haber sido posible.

DEDICATORIA

Esta tesis se la quiero dedicar a las siguientes personas con las que me unen lasos de amistad; a mis superamigos veracruzanos Delia, Alma Delia, Laura, Mirna, Sabino, Armando, Antonio, Roberto, Sergio. A mi amiguísima Dora de Irapuato. A mis nuevos amigos de Monterrey; Vero y Rosalba de Farma, Aurora y Ruty de la Unidad de Hígado, Roberto y Eva de Inmuno, a los primeros amigos de la ULIEG; Tomás, Ataulfo, Dra. Herminia y a los demás compañeros de maestría Ana, Feli y Ampudia. A mi familia ULIEG: Dr. Barrera, Drs. Viader, Dr. Agnès, Ascacio, Normita, Carmen V, Lolita, Celia, Ramiro, Martín, Luis, Gil, Marta, Raquel, Paty, Ale, Vicky, don Aarón, don Pancho, don Raul, don Pedrito, don Ponchito.

Sin faltar a toda mi gran familia Déctor: Abuelitos Angel y Carmen, mis hermanos Magda, Rubén y Carlos, mis sobrinos Erica, Leslie, Naomi, Larisa y Alfredo. Mis cuñados Tere, Yurisan y Alfredo. Mis tias Trini, Melón, Pilar y Lourdes. Mis primos Lili, Cristi, Nacho, Mónica, Jaime, Jorge, Mario, Andoni. A la familia que gané a mis suegros Esteban y Carmen, a mis cuñados Angélica, Sergio, César y definitivamente a mi esposa Carmen y a mi hijito Axel que son mi razón de existir.

Finalmente quiero dedicar mi tesis a mi querido tío Liborio, que desde siempre me ha hecho sentir una persona importante y especial, que ha sido mi ejemplo a seguir en la vida y que siempre me ha tendido su mano sin esperar nada a cambio, por lo que estoy orgulloso de ser su sobrino.

RESUMEN

Miguel Angel Déctor Carrillo

Fecha de Graduación: Octubre de 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

Título del Estudio: La reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de infección por el virus de la hepatitis B, en hepatopatías crónicas y búsqueda del virus mutante precore

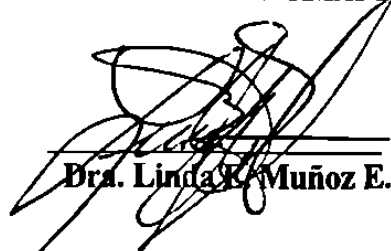
Número de Páginas: 77 **Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Area de Estudio: Ciencias de la Salud

Propósito y Método del Estudio. Mediante la detección del DNA del virus de la hepatitis B por técnicas de biología molecular, se tuvo conocimiento de casos DNA-VHB positivos con marcadores serológicos negativos detectados por ensayos inmunoenzimáticos. En algunos casos se demostró que el virus circulante en el individuo infectado poseía epítopes mutados que impedían su detección y provocaban el diagnóstico erróneo. Un VHB mutante con importancia clínica es el mutante "precure" el cual no produce el antígeno e y que se ha encontrado en las hepatopatías más severas. El objetivo principal en el presente trabajo fue establecer la PCR para el diagnóstico confiable de infección por VHB en muestras de suero. La PCR amplifica 146pb de la región preC-core altamente conservada, que a su vez sirvieron para determinar la presencia y la prevalencia del VHB mutante "precure" que fue el segundo objetivo, basandose en un análisis de restricción con la enzima Bsu36I. Se analizaron 102 muestras de suero de pacientes con hepatopatía crónica relacionadas a infección con VHB, pero negativas para infección por el virus de la hepatitis C (VHC).

Contribuciones y Conclusiones. La PCR correlacionó con la serología, logrando detectar infección por VHB en el 100% de las muestras de suero positivas. También se estableció el estado de replicación viral en ausencia del Age (15.3%) y además se lograron detectar secuencias de tamaño esperado (146pb) en muestras de suero con marcadores serológicos atípicos (7.1%) y hasta negativos (4.8%) para VHB. En los casos negativos, la caracterización enzimática del producto de PCR arrojó un patrón similar a aquel de los plásmidos usados como controles, dando validez a los hallazgos. En ninguna de las 26 muestras PCR positivas fue posible detectar la presencia del VHB mutante precure, lo que podría indicar la baja o nula prevalencia de este mutante en las hepatopatías crónicas B de esta muestra de la población mexicana. Estos resultados resaltan la utilidad de la PCR en el diagnóstico de infección por el VHB.

FIRMAS DE LOS ASESORES:


Dra. Linda R. Muñoz E.


Dr. Hugo A. Barrera S.

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCION	Página
1.1 La Hepatitis B	1
1.2 El virus de la hepatitis B (VHB)	2
1.2.1 La estructura viral	2
1.2.2 Los Genes del VHB	4
1.2.3 El ciclo de vida	6
1.3 La patogenia de la hepatitis B	8
1.4 Las mutaciones en el VHB	11
1.4.1. El VHB mutante "precore"	14
1.4.2. El VHB mutante Ags negativo	16
1.5. El diagnóstico de la hepatitis B	17
1.5.1 Las técnicas para el diagnóstico de la hepatitis B	18
1.6. La detección del DNA viral	19
1.6.1. Las técnicas de Biología Molecular	19
1.6.2. La reacción en cadena de la polimerasa	21
1.7. Las técnicas de detección del VHB mutante "precore"	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL Y METODOS	25
3.1. Tipo de estudio	25
3.2. Las muestras de suero	26
3.2.1. Los criterios de inclusión	26
3.2.2. Los marcadores serológicos	26
3.2.3. Los sueros controles	27
3.3. Los plásmidos	28
3.4. los reactivos y las enzimas	30
3.5. La reacción en cadena de la polimerasa	30
3.5.1. Los iniciadores	31
3.5.2. El tratamiento de las muestras de suero	31
3.5.3. La optimización de la PCR	32
3.5.4. La determinación del producto amplificado	33

3.6. La detección del VHB mutante "precore"	33
3.6.1. La digestión enzimática	33
3.6.2. La electroforésis	34
3.7. Las precauciones tomadas	34
4. RESULTADOS	36
4.1. El análisis computacional	36
4.2. La optimización de la PCR	38
4.3. La caracterización enzimática del producto amplificado	42
4.4. El tamizaje por PCR de las muestras de suero	43
4.5. La búsqueda del virus mutante "precore"	45
4.6. La comparación de los patrones de restricción de los productos de amplificación	47
5. DISCUSION	50
6. CONCLUSIONES	55
7. REFERENCIAS	56
APENDICES	67
APENDICE A. Prevalencia del DNA-VHB en suero en hepatopatías crónicas	68
APENDICE B. Prevalencia del VHB mutante precore en hepatopatías crónicas	70
APENDICE C. Tablas de los grupos de pacientes de acuerdo a los marcadores serológicos	72

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I.-Los marcadores serológicos más importantes en la infección por VHB	18
II.-Grupos de pacientes de acuerdo a los marcadores serológicos	27
III.-El programa de la PCR para la detección del DNA-VHB en suero	32
IV.-Las características de los iniciadores 3'	36
V.-Comparación de los iniciadores 3' con sus regiones virales homólogas	37
VI.-Resumen de los resultados de la PCR	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema del virus de la hepatitis B	3
2. Proteínas de la envoltura del VHB	5
3. Organización del gen P del VHB	5
4. Esquema del gen C del VHB y el origen del mutante "precore"	14
5. Surgimiento del mutante "precore"	15
6. Origen del mutante Ags negativo	16
7. Estrategia general	25
8. Mapa y patrón de restricción del plásmido pEco63	29
9. Región blanco de la PCR	30
10. Estrategia para la detección del VHB mutante "precore"	34
11. Optimización de la PCR variando la concentración de los reactivos	40
12. Optimización de la PCR aumentando la temperatura de 58°C a 60°C	41
13. Mapa teórico y caracterización enzimática del producto de PCR apartir del plásmido pEco63	42
14. PCR en las muestras de pacientes del grupo I de alta replicación viral	44
15. Diagnóstico diferencial entre VHB silvestre y VHB mutante "precore"	45
16. Detección del mutante "precore" en pacientes del grupo I	46
17. Detección del mutante "precore" en pacientes de grupos I y IV	46
18. Patrón de restricción de los productos de PCR de los plásmidos utilizados como control negativo (pEco63) y positivo (p970.1) para la detección del mutante "precore"	47
19. Patrón de restricción de los productos de PCR de pacientes con marcadores serológicos atípicos y negativos para VHB	48
20. Comparación de los 2 patrones de restricción de los productos de PCR de plásmidos y de pacientes sin marcadores para VHB	48

NOMENCLATURA

A	Nucleótido de adenina
aa	Aminoácidos
Acc I	Endonucleasa derivada de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Apa I	Endonucleasa derivada de <i>Acetobacter pasteurianus</i>
Arg	Arginina
b	bases o nucleótidos en el DNA
BamH I	Endonucleasa derivada de <i>Bacillus amylicuefaciens</i>
Bgl II	Endonucleasa derivada de <i>Bacillus globigii</i>
Bsu 36 I	Endonucleasa derivada de <i>Bacillus subtilis</i>
C	Nucleótido de citosina
Da	Daltones
dNTP	Cualquier desoxinucleósido trifosfato
EcoR I	Endonucleasa derivada de <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
G	Nucleotido de guanina
Gly	Glicina
h	Horas
HCl	Acido clorhídrico
Hind III	Endonucleasa derivada de <i>Haemophilus influenzae</i>
HLA	Complejo mayor de histocompatibilidad humano
KDa	Kilodaltones
Kpb	Kilopares de bases, miles de pares de bases en el DNA
M	Concentración molar
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros

μl	Microlitros
μg	Microgramos
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases en el DNA
pBR325	Plásmido vector de clonación
pH	Logaritmo negativo de la concentración de H ⁺
<i>Pst</i> I	Endonucleasa derivada de <i>Providencia stuartii</i>
RNasaH	Actividad que degrada RNA en híbridos DNA-RNA
r.p.m.	Revoluciones por minuto
<i>Sca</i> I	Endonucleasa derivada de <i>Streptomyces caespitosus</i>
T	Nucleótido de timidina
U	Unidades enzimáticas
V	Voltios
°C	Grados Celsius
5'	Extremo del DNA con el grupo hidroxilo en posición 5 del azúcar
3'	Extremo del DNA con el grupo hidroxilo en posición 3 del azúcar