

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. La hepatitis B

La hepatitis B es una enfermedad producida por un patógeno de importancia mundial, que ocasiona tanto una infección aguda como crónica en el hombre. Las personas con infección crónica representan la principal fuente de infección y también experimentan un riesgo aumentado de mortalidad y morbilidad asociado con la hepatopatía crónica y con el carcinoma hepatocelular primario.

El curso clínico de la infección con virus B es muy variable y va desde un portador asintomático hasta el desencadenamiento de una hepatitis fulminante con alta mortalidad. La proporción de individuos infectados que no eliminan el virus y se convierten en portadores crónicos, es inversamente proporcional a la edad.

La hepatitis B tiene una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo principalmente de Asia y de Africa , así como en países de las islas del pacífico. Es menor en países desarrollados como E.U.A., países de Europa Occidental y Australia.

En áreas de prevalencia alta, la transmisión es vertical de una madre infectada hacia el neonato y también es horizontal entre los familiares. En zonas de prevalencia intermedia, la transmisión es horizontal (más en niños mayores, adolescentes y adultos). En áreas de prevalencia baja, la enfermedad afecta principalmente a los adultos y se transmite por vía sexual o parenteral.^{1,2}

1.2. El virus de la hepatitis B (VHB)

1.2.1. La estructura viral

Este virus pertenece a los pararetrovirus y específicamente a la familia *Hepadnaviridae* que se caracteriza porque sus miembros son hepatotrópicos y causan hepatitis en los vertebrados que infectan^{3,4}. Otros miembros de tal familia son; el virus de la hepatitis B de la marmota Marmota monax (VHBM), el virus de la hepatitis de la ardilla Spermophilus beechey (VHBA) y el virus de la hepatitis B del pato de Pekín Anas domesticus (VHBP).

El virus de la hepatitis B es una partícula esférica de 42nm de diámetro, sellada doblemente con un núcleo interno icosaédrico y una cubierta formada de proteínas de superficie, de lípidos y bajo contenido de carbohidratos^{4,5}

El genoma viral, se encapsida junto con una o dos polimerasas y una cinasa propias. El genoma mide aproximadamente 3.2 Kb de longitud en su cadena negativa, mientras que la cadena positiva puede abarcar desde el 25% hasta el 75% del genoma viral y el 100% cuando se esta replicando. Presenta 6 marcos de lectura abiertos que codifican para 4 tipos de proteínas conocidas y 2 marcos de lectura de los que se desconoce su producto. Los 4 marcos codificantes se encuentran orientados en el mismo sentido de la cadena positiva y los desconocidos en la cadena negativa⁵ (figura 1).

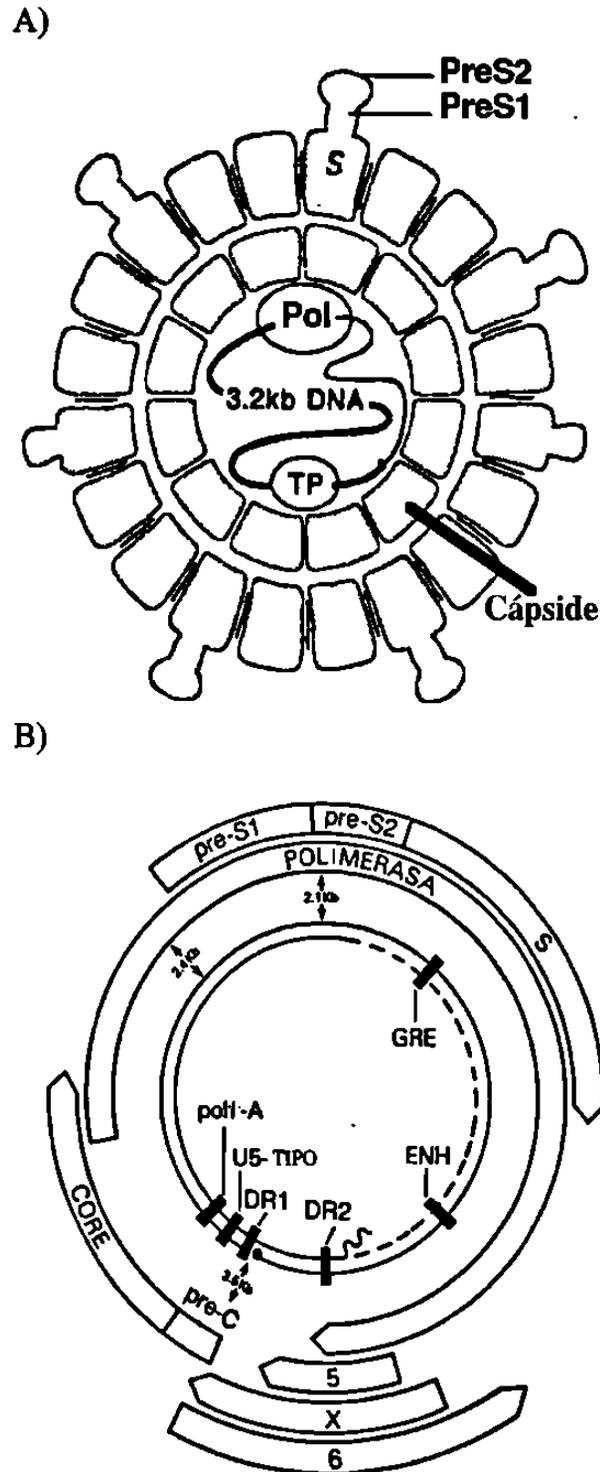


Figura 1. Esquema del Virus de la Hepatitis B. A) Se muestra el genoma interno de DNA con la polimerasa, la cápside y la envoltura externa. También se muestran los dominios S, PreS2 y PreS1 de las 3 proteínas de superficie; pequeña, mediana y grande. B) Marcos de lectura abiertos y secuencias señal en el genoma del VHB (GRE=elemento de respuesta a glucocorticoides, ENH=potenciador de la transcripción, Poli-A=señal de poliadenilación, U5-Tipo= secuencia similar a aquella U5, DR1 y DR2=secuencias repetidas directas). Tomado de Gerlich WH, et al (1993) y de Miller RH, et al (1989).

1.2.2. Los Genes del VHB.

Gen S. Codifica para las proteínas de la envoltura del virus o antígeno de superficie (Ags). Dependiendo del inicio de la traducción del transcrito de este gen, se sintetizan 3 tipos de proteínas (figura 2) que difieren en su extremo amino (la pequeña, la mediana y la grande). Los residuos aminoacídicos de la proteína de superficie **pequeña** (Agsp) que es la más abundante en la partícula viral, están incluidos también en las otras dos proteínas y posee 226 aminoácidos con peso molecular de 25,350 Da. Se puede encontrar en forma glicosilada (GP25) o no glicosilada. El extremo carboxilo aporta los epítopes de "superficie" clásicos (a,y/d,r/w). Se sabe que participa en la morfogénesis y en la secreción de las partículas virales y se especula que también participa en la fijación y en la penetración a las células ⁶

La proteína de superficie **mediana** (Agsm) es la más escasa y tiene 55 residuos aminoacídicos más que la proteína pequeña en su extremo amino codificados en el dominio preS2 (por estar previo al dominio S). Esta proteína presenta glicosilaciones inusuales y expone residuos de galactosa y posiblemente de ácido siálico por donde el virus se une al receptor de la asialoglicoproteína en el hepatocito.⁷ También contiene los aminoácidos 19-29 altamente conservados entre los hepadnavirus que unen albúmina sérica humana polimerizada (ASHp), lo que pudiera funcionar *in vivo* como factor de estabilidad en la circulación, además de neutralizar la respuesta inmune que eliminaría al virus.⁶

La proteína de superficie **grande**. (Agsg) contiene 119 aminoácidos más que la mediana, mismos que corresponden al dominio preS1. Se asume que esta proteína tiene un sitio de unión a receptores de varias células humanas incluyendo células de hepatomas ⁷Participa en la penetración del virus a la célula, ya que si se usan anticuerpos contra esta proteína se neutraliza la infección⁶.

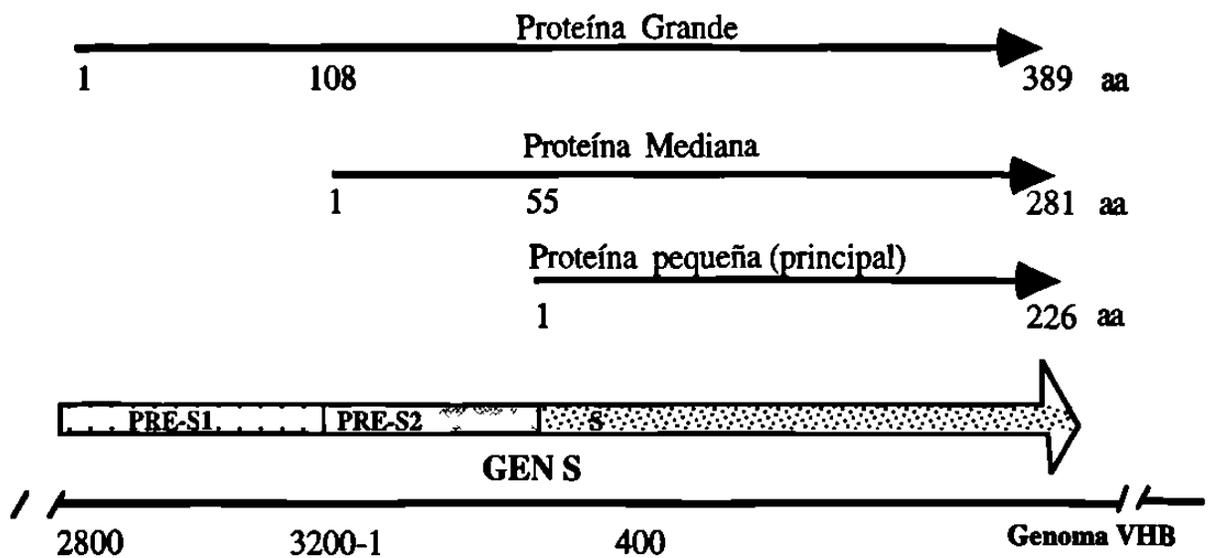


Figura 2. Proteínas de la envoltura del VHB. Estas proteínas se encuentran codificadas en un solo gen (genS), en una misma fase de lectura y difieren en su extremo amino terminal

Gen P. Abarca el 80% del genoma viral y codifica para una proteína rica en histidina de 832-845 aminoácidos y 95KDa. La proteína P está organizada en dominios funcionales que en orden de extremo amino a carboxilo son los siguientes: proteína terminal (supuesto iniciador de la síntesis de la cadena negativa), una región espaciadora no esencial de 99 aminoácidos, el dominio de DNA polimerasa-transcriptasa reversa y el dominio de RNasaH (figura 3)⁸.

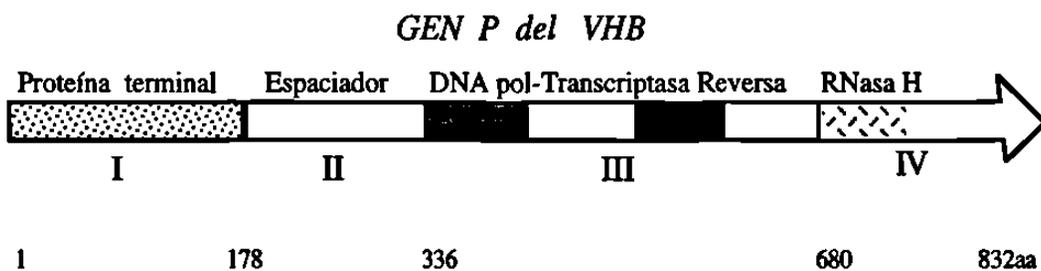


Figura 3. Organización del Gen P del VHB. Consta de 4 dominios funcionales deducidos por análisis de mutaciones, que se indican aquí del extremo amino al carboxilo (izquierda a derecha). Tomado de Radziwill et al. 1990⁸

Gen C. Codifica para dos proteínas; el antígeno core (Agc) de 183 aminoácidos y 19 KDa y el antígeno "e" (Age o P25) producto del primer codón de iniciación localizado en el inicio de la región precore (preC). El Agc contiene 40 aminoácidos en su extremo carboxilo con similitud de estructura a la protamina, cuya función es unirse a DNA y esta proteína también contiene un péptido señal de transporte al núcleo. La proteína core tiene la capacidad de autoensamblarse en ausencia de otras proteínas en una cápside icosaédrica de 27nm. El Age se encuentra como dímero en el suero de personas con replicación viral y no forma cápsides porque la señal para este fin en el extremo amino del core, se encuentra interferida. El dominio precore adiciona un péptido señal de transporte al sistema de endomembranas siguiendo la ruta para secreción. Durante este tránsito intracelular, el Age se acorta por proteasas celulares hasta quedar una proteína de 22KDa que se libera al torrente sanguíneo. Se desconoce la función de esta proteína, aunque se le atribuye la función de inducir tolerancia inmune en el hospedero (ver figura 4)⁹.

Gen X. Codifica para la proteína X que varía de 145-154 aminoácidos y de 16 a 17KDa. La función de esta proteína es transactivar las secuencias potenciadores de la transcripción de los genes virales y también puede transactivar secuencias heterólogas tales como las de los virus del SIDA y del Sarcoma de Rous, así como la de protooncogenes celulares, por lo que se le considera un promotor de tumores⁹⁻¹².

1.2.3. El ciclo de vida

Este virus se puede encontrar en todas las secreciones corporales (saliva, moco, orina, semen, etc) de sujetos infectados. La transmisión de este virus puede ser parenteral por sangre contaminada durante alguna transfusión o hemodiálisis, por uso de agujas contaminadas entre los drogadictos y punciones con agujas y lesiones abiertas; accidentes

o violencia; perinatal (durante el embarazo o en el nacimiento) y por contacto sexual (homo o heterosexual).

El virus penetra por endocitosis a las células epiteliales interactuando con un receptor específico. Una vez dentro del hepatocito el virus se libera de la envoltura y de la nucleocápside por enzimas lisosomales del hospedero. Durante esta etapa el genoma viral se puede encontrar en dos formas; una libre o replicativa asociada a la infección aguda y la otra integrada al cromosoma del hospedero constituyendo la forma no replicativa. Ambas formas no pueden coexistir en una misma célula².

En la forma libre, el genoma del virus se hace completamente de doble cadena y se transcribe a RNAs positivos por la RNA polimerasa II. Los mensajeros se traducen eficientemente generando los 4 tipos de proteínas virales . El transcrito de 3.5 Kb que constituye el "pregenoma" contiene un elemento de estructura denominado "ε", al que se le unen una o dos polimerasas virales formando el complejo de iniciación de la encapsidación. Al complejo de iniciación se le adicionan monómeros de proteína C hasta constituir la cápside¹³. En la última etapa del ciclo la cápside se envuelve por interacción de las membranas del retículo endoplásmico liso con las proteínas de superficie viral, pasando a la membrana celular y los viriones completos se liberan al torrente sanguíneo por exocitosis. El virión completo liberado al torrente sanguíneo puede infectar nuevos hepatocitos, también a células mononucleares o a otros órganos como el páncreas, el riñón y otros tipos celulares como la piel, el epitelio del ducto biliar, células musculares lisas y células de la médula espinal, en algunas de las cuáles puede replicarse, a la vez que expresa sus antígenos, pero con menos eficiencia que en el hígado ^{2,14}.

La polimerasa del virus hace posible que cada pregenoma se retrotranscriba a DNA negativo, se degrade el RNA y se sintetice la cadena complementaria de DNA, mediante las actividades respectivas de transcriptasa reversa, de RNAsaH y de DNA polimerasa que posee en sus dominios⁸.

La integración al genoma del hospedero.

La integración del genoma viral no es necesaria para su replicación y el genoma viral integrado puede estar completo o ser solo fragmentos subgenómicos rearrreglados ¹⁵ No se sabe con certeza si se integra desde una forma lineal o si lo hace desde un círculo abierto y al no encontrarse un patrón entre las secuencias aisladas de hepatomas se deduce que se integra en secuencias al azar por medio de recombinación inespecífica. Durante esta etapa el virus puede transcribir y expresar el gen de la proteína de superficie, mientras que puede o no expresar los de las proteínas de cápside y su producto de hidrólisis así como el gen de la polimerasa, pero sin replicarse.

1.3. La patogenia de la hepatitis B

Se reconocen 3 fases en la infección por VHB¹⁶:

- A) *Inmunotolerancia*; con Age persistente, alta viremia, niveles normales de alanina aminotransferasa (ALT) y anticuerpo contra el Agc de tipo IgM, no detectable.
- B) *Inmunoeeliminación*; con fluctuaciones en la viremia, niveles altos de ALT y Agc con distribución nuclear y citoplásmica.
- C) *Latencia*; con niveles normales de ALT, DNA-VHB no detectable por hibridación de ácidos nucleicos y sin Anti-Agc IgM¹⁶.

La hepatitis B presenta un espectro amplio de infección o condiciones clínicas, tales que de una enfermedad aguda autolimitada, evolucione a una infección crónica con alto riesgo de desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). Esta variedad de hepatopatías se debe principalmente a la intensidad de la respuesta inmune contra los productos virales, ya que el virus B no es citopático *per se*, también hay otros factores que contribuyen, tales como la edad, el sexo, la raza, sobreinfecciones con los virus delta

(VHD) o virus C (VHC) o con el virus de inmunodeficiencia humana VIH e incluso la misma heterogeneidad del VHB¹⁷⁻²¹.

Aunque en la mayoría de los pacientes la hepatitis B es autolimitada y se resuelve con o sin manifestaciones clínicas, en pocos casos puede llegar a ser fulminante y fatal con destrucción masiva de los hepatocitos. En otros casos hay una progresión a la cronicidad. Algunas veces con una forma activa y rápidamente progresiva, mientras que otra es más bien estable y menos activa. A veces se observa un curso de recaída con fases de reactivación del daño hepático alternando con períodos de remisión completa.

Se reconocen dos patrones serológicos en la hepatitis crónica. El primer tipo Age positivo ó forma "clásica", se asocia con un grado variable de daño hepático y puede ser seguido por la seroconversión a Anti-Age, con terminación de la replicación viral y remisión de la hepatitis.

El segundo tipo se reconoció recientemente en pacientes Age negativo y anticuerpo contra el Age positivo con evidencia de actividad viral y hepatopatía (diferente a la forma Ags y Anti-Age positivos, DNA-VHB negativo, asociada a sobreinfección con VHD y con VHC). Esta forma atípica es más frecuente en el lejano oriente y el mediterráneo donde prevalece sobre la forma Age positivo. Esta hepatitis crónica es frecuentemente más severa y rápidamente progresiva, por lo que el promedio de remisión es más bajo, también se caracteriza por una fluctuación en los niveles de las transaminasas haciéndola más parecida a la hepatitis C que a la B. Aunque el DNA-VHB también fluctúa, generalmente se mantiene detectable con períodos cortos de negatividad. Hay recaídas recurrentes de hepatitis con reactivación de DNA viral con períodos de vida cortos alternando con períodos prolongados de normalidad en las transaminasas y DNA negativo. Las exacerbaciones son más severas con niveles altos de ALT con o sin ictericia²⁰.

Una infección hepática crónica refleja una respuesta inmune específica para VHB suficiente para causar daño hepático, pero insuficiente para eliminar completamente la infección²².

La respuesta inmune puede ser sobre 4 proteínas: las de superficie (envoltura), las core (p25 o Age, p21 o core), la polimerasa y la proteína X.²³ Esta respuesta puede ser tanto humoral como celular, siendo la última la principal responsable de la eliminación viral. Se sabe que tanto la cápside como el Age son los productos virales más antigénicos (hasta 80 veces más que las proteínas de superficie²² y que el Age además de circular libremente por sangre, puede estar adherido a las membranas de hepatocitos infectados, siendo por lo tanto el principal blanco en la eliminación viral.

Se ha comprobado que las células T cooperadoras (Th) específicas para los determinantes antigénicos Age/Agc, pueden mediar la producción de anticuerpos que participan en la eliminación viral (anticuerpos anti-PreS1).

Si se considera que el Age comparte determinantes antigénicos con el Agc, la tolerancia debida al Age incluiría al Agc, eliminando la respuesta inmune celular. Esta hipótesis del Age como inmunotolerógeno es apoyada por el hecho de que en una infección prenatal, los hijos de madres portadoras Age positivos, desarrollan hepatitis crónica mientras que los hijos de las madres Anti-Age positivas desarrollan hepatitis fulminante²¹⁻²³.

Esta hipótesis del Age como tolerógeno *in útero* establece que esta proteína por ser secretada accede al timo atravesando la barrera placentaria y que este modo de presentación del antígeno dirige a la delección funcional de las células Th con el complejo restringido HLA de clase II específico a Age/Agc, así el Age se reconocería como antígeno propio²².

Por lo anterior la tolerancia a los antígenos Agc/Age podría también eliminar la producción de anticuerpos dirigidos hacia las proteínas de la envoltura viral necesarios para la neutralización²².

Al virus B se le reconoce como promotor de la hepatocarcinogénesis por existir una correlación entre la prevalencia de VHB y la incidencia de CHC, también por la observación del desarrollo de CHC después de una infección con VHB. Aún mas se han encontrado secuencias genómicas del VHB integradas en el genoma de células de

hepatocarcinoma y de productos virales en estas mismas células y en las líneas celulares derivadas de CHC^{15,24-26}.

Se piensa que el VHB induce cáncer primario de hígado por una combinación de al menos 2 mecanismos. La infección es un factor que contribuye a la cirrosis hepática, la cuál está asociada con el cáncer primario de hígado en el 60 al 90% de los pacientes. Además, estudios moleculares han revelado otros mecanismos potenciales que pueden contar para el papel directo del VHB en la carcinogénesis: el DNA-VHB integrado en las células hepáticas puede modificar la expresión genética celular mediante rearrreglos cromosómicos o por mutagénesis insercional que altere la expresión de protooncogenes celulares o mediante la transactivación de los mismos por las proteínas virales, como la proteína X y versiones truncadas de las proteínas de superficie^{10-12,27-29}.

Las proteínas virales tienen efectos perjudiciales directos para el hospedero, como son la supresión de la expresión del interferón β humano mediada por la proteína de la cápside³⁰.

Ahora se sabe que la baja replicación del VHB puede deberse a sobreinfecciones con el VHD reconocido como el inhibidor selectivo mejor conocido de la replicación del VHB, reduciendo el DNA-VHB a límites detectables únicamente por PCR¹⁸

1.4. Las mutaciones en el VHB

Debido a la tasa de replicación tan alta de los virus, estos presentan mutaciones con mayor frecuencia que los organismos superiores y en cada ciclo de replicación se pueden producir mutaciones al azar que se acumulan durante el tiempo, algunas de las cuáles afectarán su viabilidad, pero otras la mejorarán, vgr.: a través de evadir la respuesta inmune cambiando sus epítopes.

A pesar de que el virus de la hepatitis B posee ciertas restricciones en la capacidad para mutar (vgr.: mutaciones en gen S pueden afectar la polimerasa o dominios

funcionales y estructurales de otros productos virales), hay evidencia indicativa de mutación espontánea del virus durante la infección aguda dentro de cada hospedero y de que existe una población viral heterogénea en portadores crónicos ^{19,31}.

El VHB posee un promedio de mutaciones espontáneas de 1.4 a 3.2 X 10⁻⁵ sustituciones por sitio por año o sea 1 ó 2 órdenes de magnitud menor que los virus de RNA (hasta 100 veces menos que el Virus de la Inmunodeficiencia Humana) pero hasta 4 ordenes de magnitud mayor que el de los virus de DNA³². Al igual que en los retrovirus, la polimerasa del VHB que actúa como transcriptasa reversa carece de la actividad de exonucleasa 3'-5' encargada de corregir las incorporaciones erróneas de nucleótidos. El hecho de experimentar una tasa de replicación elevada y de poseer sitios proclives a mutar (hot spots), hacen del VHB una fuente potencial de diversos virus cuya probabilidad de surgir se acentúa en las infecciones prolongadas. Además, la presión inmune tiende a eliminar a los virus que colonizaron, mientras que aquellos virus que sufrieron mutaciones permisivas la evaden y constituyen la población de virus patógenos³¹.

Las personas con DNA-VHB persistente después de la seroconversión (aparición de anticuerpos contra determinado antígeno viral), pueden seguir infectados por el virus, con mutaciones en cualquiera de sus genes. Estas mutaciones pueden ocasionar bajo nivel de síntesis de Ags o ausencia de Age y baja replicación viral³³. Algunas mutaciones producen virus incapaces de expresar proteínas y por lo tanto no pueden encapsidarse ni replicarse por ellos mismos, pero sí por complementación con productos virales proporcionados por otros virus no mutados de la misma población que si las expresan.

Las mutaciones pueden recaer en cualquiera de los genes virales y correlacionan con formas más severas de enfermedad hepática. Estas mutaciones son como ya se dijo mecanismos potenciales para escapar a la eliminación y para el establecimiento de una enfermedad persistente, además de alterar el tipo de patogenicidad y la cinética de replicación^{17,34,35}.

Hay mutaciones más recurrentes en el genoma del VHB y reciben nombres específicos (se les conoce también como "variantes"). El virus "mutante "precore"" y los virus "mutantes pre-s y s" son los mejor caracterizados²⁰. También se han aislado mutantes con deleciones en el gen X en hepatitis serológicamente atípicas³⁶, aunque los más estudiados son aquellos con importancia clínica, es decir, aquellos cuyas proteínas no se pueden detectar por serología o que se relacionan con determinados tipos de hepatopatías³⁷.

Se especula que en las infecciones con el virus B silvestre, hay un curso relativamente más benigno (como en el norte de Europa donde sólo 5% de personas adultas desarrollan hepatitis crónica). En cambio la presencia de una variante viral o ésta junto con el virus silvestre hacen que se desarrolle una hepatitis fulminante o crónica, como ocurre en países del mediterráneo y lejano oriente^{23,37}

De manera general la presencia de mutantes muestra que la presión selectiva es un factor que permite que se observen eventos poco frecuentes como son las mutaciones (en virus son más frecuentes), haciendo posible que los virus que contienen mutaciones que le permiten evadirla produzcan una nueva explosión poblacional y así sucesivamente se pueden repetir episodios seriados con serología distinta.

Por ejemplo, en un ambiente en el cuál el Age esta contribuyendo en múltiples aspectos de la respuesta inmune contra los antígenos del VHB y es el centro de la eliminación viral, puede ocurrir la selección de un virus mutante incapaz de producir el Age y evadir por lo tanto la misma respuesta inmune^{22,23}.

1.4.1. El VHB mutante "precore"

Este mutante se caracteriza por carecer del Age, debido al cambio en el nucleótido 1896 (segunda posición del codón 28 del Age) de A en lugar de G, que crea un codón de terminación prematuro que aborta la traducción del Age (figura 4). Esta variante viral aparece durante la elevación de las transaminasas, cuando la presión inmune ejerce su efecto sobre los hepatocitos infectados con virus productores del Age (virus tipo silvestre) y permite así que sobrevivan los hepatocitos que portan el virus mutante (figura 5), llegando a ser la población predominante³⁸. La importancia de ésta variante recae en la pérdida del marcador serológico (Age) usado comúnmente en pruebas de rutina como indicador de replicación viral. Su prevalencia en las hepatitis crónicas es mayor en los países del mediterráneo y del lejano oriente y menor o nula prevalencia en países del primer mundo como los de Europa del norte y en E.U.A^{16,39-41}.

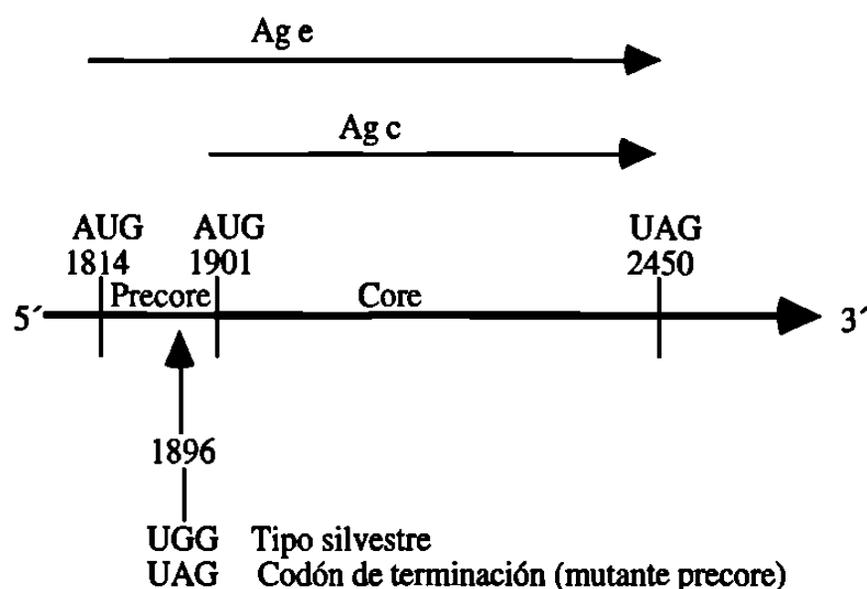


Figura 4. El gen C y el origen del mutante "precore". Se muestran los dos inicios de la traducción y el único codón de terminación. La aparición de un codón de terminación prematuro en la región precore, elimina la síntesis del Age, pero no la de la cápside. Tomado de Thomas HC y Carman WF 1991²³

Esta variante viral está relacionada estrechamente con la hepatitis aguda fulminante, aunque no de manera concluyente, ya que el tipo silvestre también la puede producir ⁴²⁻⁴⁷ por lo que se le considera importante pero no suficiente para este tipo de patogenia ⁴⁷. Se le ha involucrado en el establecimiento del estado de portador crónico del VHB y con el desarrollo de formas más severas de hepatitis crónica. ^{16,42,48}. En casos de hepatocarcinoma con baja replicación viral también se ha detectado este virus y en estos casos se sugiere una relación entre cáncer y virus mutante ^{32,49}. También se ha encontrado en portadores asintomáticos Anti-Age positivos ⁵⁰ y en casos de baja respuesta al tratamiento con interferón, aunque hay reportes que afirman que su presencia no afecta el tratamiento y que el virus se elimina más rápidamente ⁵¹.

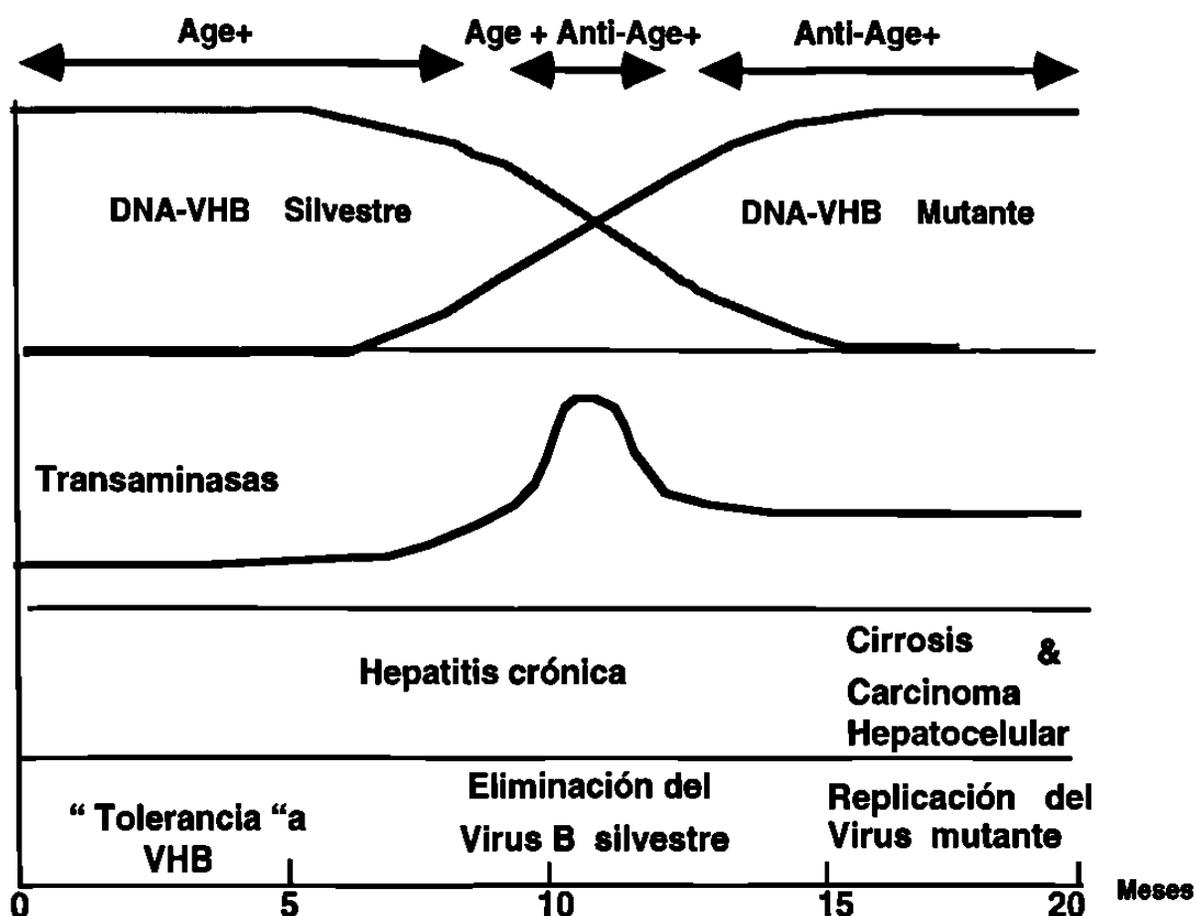


Figura 5. Surgimiento del mutante "precore". Este mutante surge durante la seroconversión a anti-Age en una infección crónica. Se cree que el Age es un blanco de presión inmune, lo que permite sobrevivir a los hepatocitos que no lo expresan. Modificado de Thomas HC y Carman WF 1991²³

1.4.2. El VHB mutante Ags negativo

En zonas endémicas de hepatitis B, es más común encontrar individuos Ags negativo y DNA-VHB positivos por PCR ^{32,52-54}. En estos casos el agente involucrado es el VHB mutante pre S/S o Ags- que corresponde a un virus con mutaciones puntuales o con rearrreglos en los dominios preSs o S que son las regiones antigénicas ^{19,53-57}. Se ha reportado un virus de hepatitis B con una mutación puntual en el epítipo "a" y que repercute en el cambio del aminoácido arginina por glicina en la posición 145 y se considera también un "mutante de escape", debido a que se replica en individuos vacunados contra VHB tipo silvestre (figura 6)⁵⁵. Los virus mutantes con rearrreglos o deleciones en las regiones preS-S, producen partículas virales de tamaño menor a 42nm. Los epítipes preS1 y preS2 no se afectan con la mutación. Estos, se relacionan con la infectividad. El virus puede así replicarse y continuar provocando la hepatopatía.²⁰

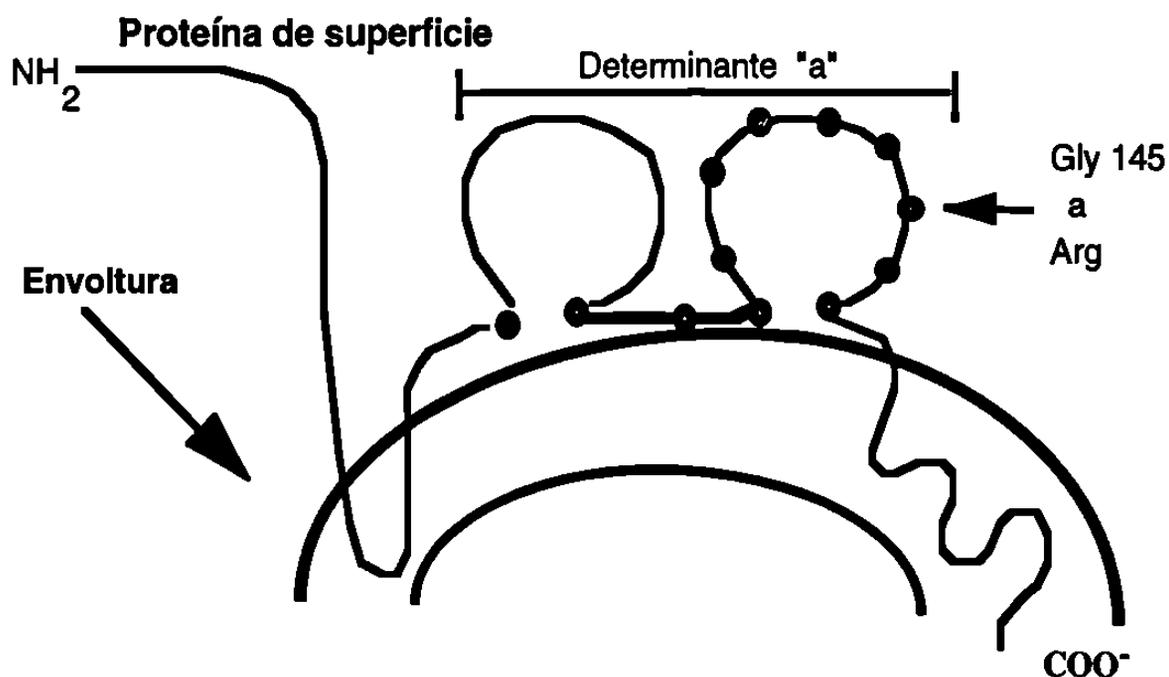


Figura 6. Origen del mutante Ags negativo. La sustitución de un solo aminoácido en la proteína de superficie cambia la antigenicidad del determinante "a". A esta variante se le denomina de "escape", puesto que se encontró en un individuo vacunado contra VHB. Tomado de Thomas HC y Carman WF 1991.²³

1.5. El diagnóstico de la hepatitis B

Para establecer el diagnóstico de infección por este virus, se recurre rutinariamente a la detección serológica de los productos proteicos del virus (antígenos), a los anticuerpos producidos por el hospedero en respuesta a esos antígenos y menos frecuentemente a la detección del DNA del VHB en muestras biológicas tales como suero, plasma o en biopsia hepática (Tabla I).

La prueba que se usa más frecuentemente para el diagnóstico de VHB es el Ags. Este antígeno se presenta tanto en la fase aguda como en fase crónica, por lo que para confirmar una infección aguda se recurre a la detección de otro marcador: el anticuerpo tipo IgM producido contra el antígeno de la cápside (Anti-Agc IgM). La persistencia del Ags por más de 6 meses a la par del Anti-Agc total, indican el estado de portador crónico. La presencia del Age y DNA-VHB en suero y Agc en hígado son marcadores de replicación viral e infectividad. Además de las pruebas anteriores que se basan en ensayos tipo ELISA, se dispone de ensayos bioquímicos que detectan niveles de enzimas en suero, principalmente la ALT y la aspartato aminotransferasa (AST), las cuáles son buenos monitores para el seguimiento de la hepatitis crónica B y en la hepatitis crónica de sobreinfección. Tanto en la hepatitis B aguda como en la crónica, debe considerarse la posibilidad de una coinfección o de una sobreinfección con el virus de la hepatitis Delta (VHD)^{58,59}.

TABLA I. LOS MARCADORES SEROLOGICOS MAS IMPORTANTES EN LA INFECCION POR VHB

MARCADOR	SIGNIFICADO DIAGNOSTICO
Ags	PORTADOR no necesariamente infeccioso
Anti-Agc	Con Anti-Ags = Inmunidad
Anti-Agc IgM	INFECCION AGUDA
Anti-Ags	INMUNIDAD
Age	REPLICACION VIRAL - INFECTIVIDAD
Anti-Age	INFECCIOSO ? solo si el DNA-VHB es positivo solo = inmunidad ? altos títulos = infección continua
Polimerasa	REPLICACION VIRAL - INFECTIVIDAD
DNA-VHB	REPLICACION VIRAL - INFECTIVIDAD
Agc en hígado	REPLICACION VIRAL - INFECTIVIDAD
*Ag X (antígeno X)	Replicación viral-infectividad?

* No se usa en la clínica.

1.5.1. Las técnicas para el diagnóstico de la hepatitis B.

En el diagnóstico de la hepatitis B, se han empleado varias técnicas serológicas. El método de inmunodifusión simple detectaba a la proteína de superficie de la "partícula Dane"^{60,61}. Este método era poco sensible y fue sustituido por la hemaglutinación y posteriormente por el radioinmunoanálisis (RIA), que cuenta con mayor sensibilidad¹⁹.

Debido al uso de material radiactivo, el RIA no se emplea tan comúnmente como una prueba de rutina en los laboratorios clínicos. La prueba de ELISA que muestra una alta sensibilidad y especificidad para los epítopes clásicos "a" del antígeno de superficie y para los epítopes de la nucleocápside (Agc y Age), cuenta en la actualidad con una mayor aceptación.

El ensayo de ELISA para anticuerpos, emplea como antígenos fijos en la fase sólida, las proteínas producidas por la tecnología del DNA recombinante y para antígenos

emplea los anticuerpos monoclonales fijos en una fase sólida del mismo tipo. El método ELISA tiene una especificidad alta, pero por ser un método espectrofotométrico, los niveles bajos de expresión de antígenos o de los complejos antígeno-anticuerpo pueden dar lecturas falsas negativas. El uso de anticuerpos monoclonales en los ELISAs anti-Ags, hacen casi imposible detectar epítopes mutados, vgr.: el cambio de Arg en la posición 145 del determinante "a" del Ags reacciona con el ELISA pero de manera más débil que el tipo normal^{33,44,62,63}.

1.6. La detección del DNA viral

Las técnicas que detectan DNA-VHB son clínicamente útiles debido a que la ausencia de DNA-VHB de suero durante hepatitis aguda ó crónica B indica que el virus no se replica y generalmente precede la resolución de la enfermedad⁶⁴. La detección del DNA-VHB en suero correlaciona con la presencia del Agc y con el Agc en hígado que son los marcadores de replicación⁶⁵⁻⁶⁸. A diferencia de la última, la detección del DNA viral no es un método invasivo.

Los estudios moleculares han establecido la replicación viral (DNA del VHB positivo en suero) incluso con una aparente desaparición o ausencia de los marcadores serológicos virales VHB^{52,63,69}, con lo cual estos estudios se han convertido en las pruebas más confiables de la infección y del estado de la replicación viral.

1.6.1. Las técnicas de Biología Molecular

Con el advenimiento de las técnicas de Biología Molecular, se han desarrollado métodos altamente sensibles para detectar secuencias de DNA-VHB dentro del genoma de células humanas y en fluidos extracelulares. Con el empleo de sondas específicas hacia las secuencias del virus, marcadas con isótopos radiactivos, pueden identificarse genomas virales al nivel de picogramos⁷⁰.

Estos métodos de Biología Molecular son mil veces más sensibles que los de RIA para proteínas, y es posible detectar una secuencia génica en particular entre 0.5-1 millón de éstas, cuando están presentes en el núcleo de cada célula¹⁵

Entre los métodos más directos y sensibles para detectar VHB, se encuentran los que se basan en la hibridación del DNA en solución⁷¹, cuyo rango de sensibilidad se encuentra entre cien mil y un millón de partículas virales por ml de suero o de plasma¹⁹. Otros métodos moleculares están basados en la detección del DNA-VHB fijado a una membrana de nitrocelulosa o de nylon, mediante la hibridación con una sonda marcada radiactivamente que impresiona una película de rayos X, dando como resultado una mancha al haber reconocimiento de alguna secuencia génica. Entre estos métodos se encuentra la hibridación tipo Southern blot (SB)^{63,69,72,73} donde el DNA fijado en la membrana proviene de una transferencia a partir de un gel donde se había resuelto previamente por electroforesis. Cuando el DNA se fija directamente de una solución en un punto determinado de la membrana sin pasar por electroforesis, el método recibe el nombre de dot blot (DB)^{45,64,68,69,70,71,74}.

El método de SB es útil en la detección cuantitativa de genomas virales porque la intensidad de la señal es proporcional al número de partículas completas, y permite así distinguir entre las secuencias integradas en el genoma del hospedero y las formas replicativas libres (las primeras dan señales de un tamaño mayor a 3.2Kb, que es el tamaño del genoma del VHB)^{15,74}.

El método de DB es más sencillo que el método de SB, ya que evita la electroforesis, además de que pueden analizarse muchas muestras a la vez y es también un método cuantitativo⁷⁴. En los métodos SB y DB, al analizar la intensidad de la señal con un densitómetro, se puede cuantificar la concentración del DNA viral^{65,66}. Tanto con muestras de hígado⁶⁴, suero^{63,70} y de células mononucleares⁷⁵ se han obtenido resultados positivos. En algunos casos, ni el SB ni el DB han sido suficientemente sensibles para detectar DNA-VHB, como en los casos con baja replicación viral o al inicio y en la etapa

de resolución de la enfermedad ^{17,76}, además estos métodos tienen el inconveniente de emplear material radiactivo. Este último problema, se ha resuelto en parte mediante el uso de sondas no radiactivas, marcadas con biotina o digoxigenina. Aun así, el problema de la sensibilidad continúa presente.

1.6.2. La reacción en cadena de la polimerasa

Un método empleado a partir de 1989 en el diagnóstico de la hepatitis B, que resuelve los problemas de los métodos mencionados anteriormente (los ELISAs, el SB y el DB) es la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction)^{77,78}.

La PCR es un método *in vitro*, con el que se amplifican ciertas secuencias específicas. Esta amplificación se obtiene con la ayuda de 2 oligonucleótidos o iniciadores de secuencias complementarias, uno a un extremo de una de las cadenas del DNA bicatenario y el otro al otro extremo, pero en la cadena opuesta. Estos iniciadores permiten el copiado por la acción de la enzima DNA polimerasa Taq termoestable (Taq polimerasa=aislada de *Termophilus aquaticus*), de la región comprendida entre ambos oligonucleótidos. La secuencia blanco se puede amplificar 2^n veces, donde n es el número de veces (ciclos) que se repiten los pasos que caracterizan la acción de copiar a la secuencia génica de interés; a saber desnaturalización, alineación y extensión⁷⁹.

La PCR provee un método directo y altamente sensible para detectar genomas virales, aunque éstos provengan de tan solo 10 partículas/ ml de suero⁷⁷. Las infecciones por el virus B que carece del determinante "a" silvestre del gen S, sólo son detectables por la PCR.^{27,33,53,80} El problema principal con la PCR, es su extrema sensibilidad y por lo tanto su proclividad a originar resultados falsos positivos. Estos resultados son debidos principalmente a la contaminación de la muestra o de los reactivos con productos de

amplificación de PCRs previos⁸¹. Este método aún no proporciona un análisis 100% cuantitativo y existe la necesidad de su automatización⁷⁸.

Los problemas arriba mencionados se están resolviendo: existen mejores métodos de extracción de DNA de varias fuentes, los costos de aparatos y reactivos se han abaratado por la competencia entre los proveedores y se cuenta ya con métodos que eliminan los productos de PCR contaminantes (que provocarían resultados falsos positivos)⁸².

1.7. Las técnicas de detección del VHB mutante "precore"

Cuando se analizaron las secuencias nucleotídicas del gen C (región precore-core) en aislados del VHB, de las muestras de pacientes en etapa crónica de la enfermedad con serología Age-/anti-Age+s (obtenidas principalmente por la clonación de los productos de la PCR), se encontró que la mutación A en lugar de G en la posición 1896 (codón 28 del Age) era predominante sobre otras mutaciones que también eliminan la producción del Age (desaparición del codón de iniciación y otro codón de terminación en el codón 29)^{16,40}.

Actualmente esta mutación se rastrea por algunos métodos basados principalmente en las técnicas de la PCR y en la secuenciación de los ácidos nucleicos. En el método más directo se determina la secuencia nucleotídica a partir del producto de amplificación, mediante la secuenciación por la PCR o después de la clonación de los productos de la PCR en plásmidos^{7,17,36,83}.

Se ha descrito otro método post-PCR denominado "refractario", en el cual se provoca una amplificación diferencial del mutante variando la temperatura de apareamiento de los iniciadores. Esto se consigue con el diseño de un oligonucleótido iniciador 5' con la última base específica del VHB mutante y con el desapareamiento de la antepenúltima base. Si la temperatura de apareamiento es lo suficientemente alta, impide que se inicie la

amplificación de una secuencia de VHB tipo silvestre, mientras que la del mutante si se lleva a cabo^{41,84,85}.

Otra manera más compleja de diferenciar al virus mutante está basada en la hibridación de los productos de PCR con sondas específicas al VHB mutante, donde las condiciones de astringencia son cruciales¹⁶.

Finalmente, existe otro método que emplea los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (del inglés RFLP's) generados con una enzima específica a partir de productos de la PCR. Este último método fue utilizado durante el presente trabajo³⁵.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

Los objetivos que se persiguieron con la realización del presente trabajo fueron dos, a saber:

- 1. IMPLEMENTAR LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNOSTICO DE LA HEPATITIS B.**
- 2. INVESTIGAR LA PRESENCIA Y LA PREVALENCIA DEL MUTANTE "PRECORE" DEL VHB, EN 112 SUEROS DE PACIENTES DEL NORESTE DE MEXICO CON HEPATOPATIAS CRONICAS RELACIONADAS A INFECCION POR VHB.**

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

3.1. Tipo de estudio

El presente estudio fue transversal, retrospectivo y observacional de ensayos serológicos y moleculares, realizados en pacientes con hepatopatías crónicas.

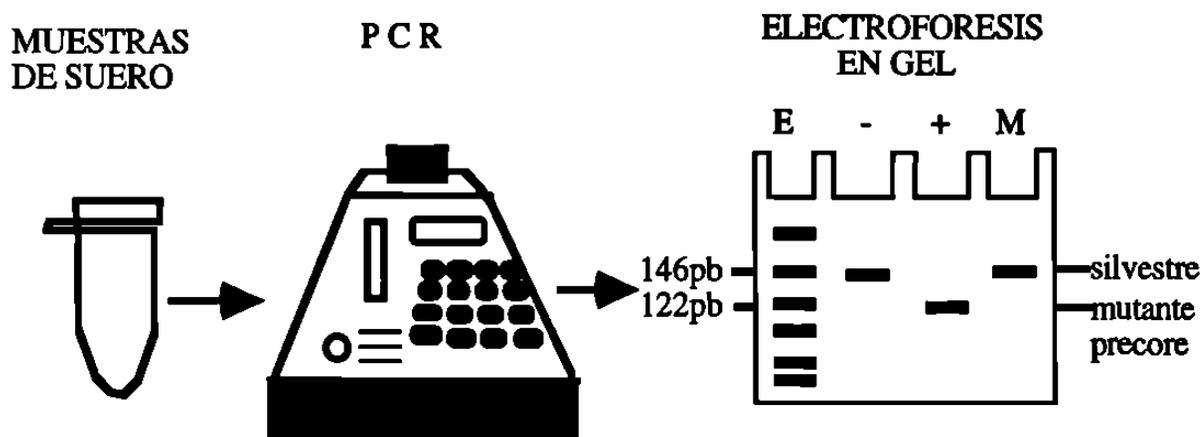


Figura 7. Estrategia General. Se esquematiza el orden de las etapas de que constó este trabajo. Las muestras de suero de pacientes se someten a la PCR y aquellas positivas se les investiga la presencia del VHB mutante precore. E=estándar de peso molecular, - = negativo al virus mutante precore, + = positivo al virus mutante precore, M= muestra a analizar.

3.2. Las muestras de suero

Se seleccionaron sueros de pacientes que asistieron a la Unidad de Hígado y al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario "José Eleuterio González" a partir de Febrero de 1985 y hasta Septiembre de 1995. Los pacientes fueron referidos para la detección de los marcadores serológicos correspondientes a infección crónica por VHB. Estas personas acudieron con diagnósticos diversos de hepatopatía crónica tanto confirmados o con la sospecha de una hepatitis viral. En total se seleccionaron 102 sueros, tomando como base los siguientes criterios.

3.2.1. Los criterios de inclusión

Se estudiaron sueros de pacientes con hepatopatía crónica y sospecha de infección por VHB, con resultados negativos para la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). Esto último determinado mediante un ensayo ELISA de segunda generación.

3.2.2. Los marcadores serológicos.

Los marcadores virales se determinaron por medio de los estuches comerciales por el método de ELISA (Laboratorios Abbott, Chicago IL). A los sueros se les determinaron los marcadores de infección por VHB y se clasificaron de acuerdo al perfil serológico.

La interpretación de los marcadores virales en los sueros fué como sigue:

El perfil de replicación viral alta (grupo I), se consideró cuando la presencia del Ags era positiva, al igual que el Anti-core total y el Age . En este grupo hubo un paciente que presentó además el Anti-Age positivo (tabla II). El grupo de replicación viral baja (grupo II) se diferenció del anterior únicamente por la ausencia del Age y en este grupo, 9 pacientes fueron positivos y 4 negativos al Anti-Age (tabla II). El grupo con marcadores

atípicos y de protección (grupo III), incluyó 15 pacientes que tuvieron sólo el Anticore total positivo, 1 paciente con Anticore y Anti-Age positivos, 3 pacientes con únicamente el Ags positivo, 6 pacientes con Anticore total y Anti-Ags positivos y los 3 restantes fueron Anticore total, Anti-Ags y Anti-Age positivos (tabla II). En el último grupo definido (grupo IV), ningún paciente tuvo algún marcador serológico positivo que indicara infección o historia de contacto con el virus. La distribución de los pacientes según el patrón serológico puede apreciarse en la Tabla II. (Para más detalle ver apéndice C).

TABLA II. GRUPOS DE PACIENTES DE ACUERDO A LOS MARCADORES SEROLOGICOS

DIAGNOSTICO	#	Ags	Anticore total	Anti-Ags	Age	AntiAge
Grupo I. Replicación alta	20	+	+	NN	+	+/-
Grupo II. Replicación baja	12	+	+	-	-	+/-
	1	+	+	NN	-	ND
Grupo III. Marcadores atípicos y de protección	7	-	+	-	-	-
	2	-	+	-	ND	-
	6	-	+	-	ND	ND
	1	-	+	-	-	+
	1	+	-	NN	-	ND
	2	+	-	NN	-	-
	2	-	+	+	-	-
	4	-	+	+	ND	ND
	3	-	+	+	-	+
Grupo IV. Sin marcadores	41	-	-	-	-	-
TOTAL	102					

+/- : indica o resultado positivo o negativo del marcador serológico, pero no ambas cosas, ND= no detectado, NN=no necesario.

3.2.3. Los sueros controles

Se tomaron alícuotas de 2 sueros de pacientes con infección por el virus B (Ags positivo), que además tenían títulos altos de DNA viral, el cual se determinó por el método de Southern blot (Specialty Laboratories, Sta. Mónica, CA, EUA) y replicación viral alta evidenciada por la presencia del Age.

3.3. Los plásmidos

Se emplearon dos plásmidos como controles positivos, uno que contiene un genoma completo de VHB tipo silvestre (pEco63) y el otro que contiene 822 pb de la región precore-core de un VHB mutante "precore" (p970.1).

El plásmido pEco63 se propagó a gran escala y se purificó en un gradiente de Cloruro de Cesio⁸⁶. Se caracterizó enzimáticamente para determinar la orientación de la clonación del virus en el sitio *EcoRI* del plásmido pBR325⁸⁷. El patrón de restricción coincidió con el mapa teórico, como se muestra en la figura 8. Este plásmido fue donado por el Dr. Pablo Valenzuela de la compañía Chiron Corp., CA, EUA.

El plásmido p970.1 fue donado por el Dr. T. Jake Liang del Centro del Cáncer de Boston, MA. USA. y a este únicamente se le practicó una minipreparación de plásmido por el método de lisis alcalina⁸⁶. Este plásmido es de la serie pGEM (Promega Corp, Madison, WI, EUA) y tiene clonado los 822 pb del gen C del VHB en los sitios *EcoRI-Hind III*.

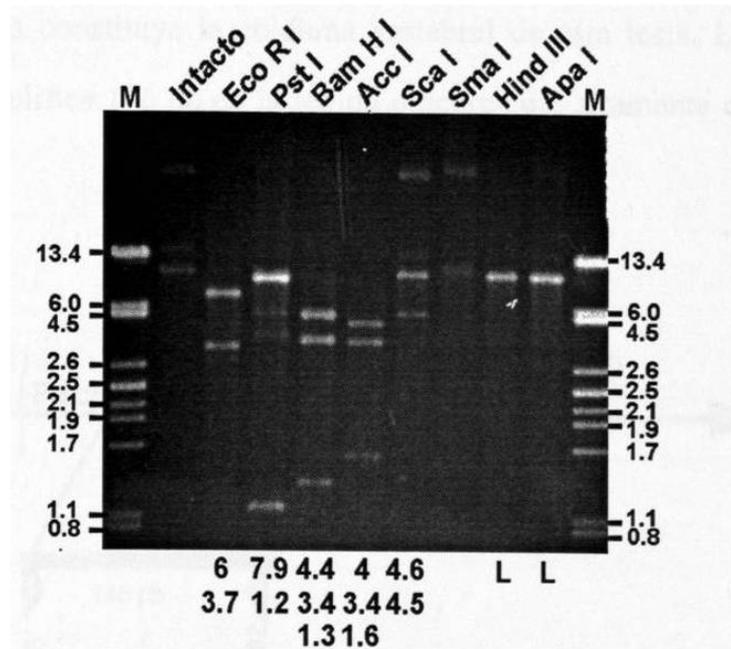
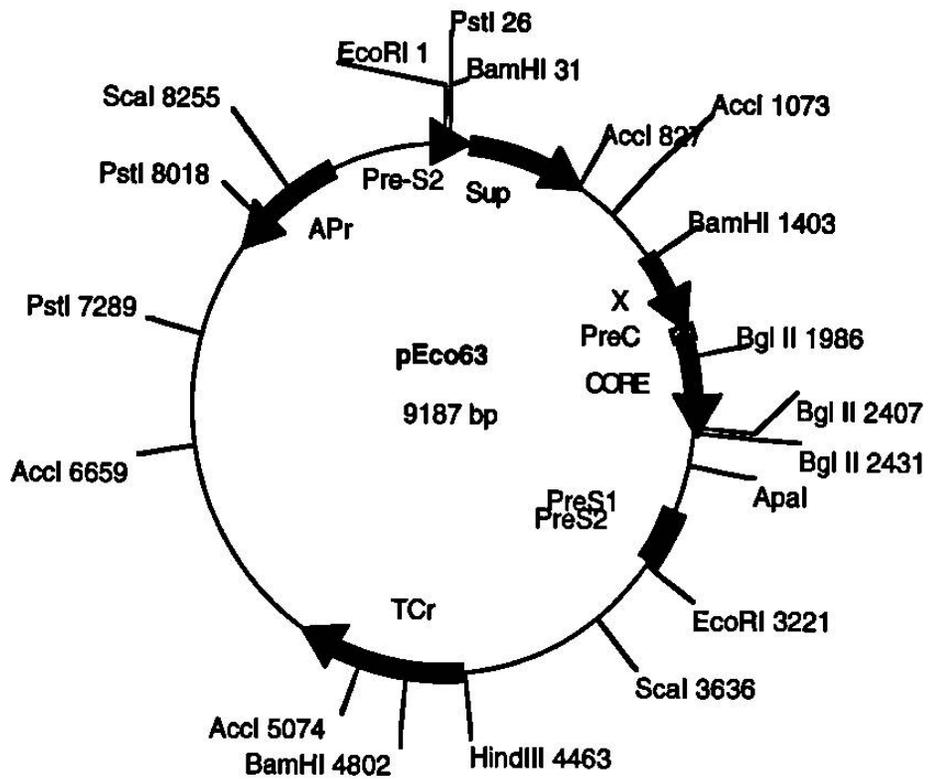


Figura 8. Mapa y patrón de restricción del plásmido pEco63. El plásmido pEco63 provino del plásmido pBR325 y de un genoma viral clonado en el sitio EcoRI . El marcador de peso molecular (M) es DNA del fago lamda digerido con EcoRI-Hind III. Los carriles siguientes corresponden a las digestiones con diversas enzimas de restricción, indicadas arriba de cada carril. Abajo de la foto se aprecian los tamaños de los fragmentos esperados, los cuáles coincidieron con los observados. En el carril de la enzima Pst I se aprecian dos bandas que probablemente fueron contaminación del carril siguiente. Las enzimas que sólo linearizaron el plásmido se indican con una L

3.4. Los reactivos y las enzimas

Los reactivos de la PCR (dNTPs, buffer, MgCl₂ y la enzima DNA Polimerasa Taq) se compraron a la compañía Promega Corporation (Madison, WI, EUA). La agarosa y los reactivos para los geles de poliacrilamida se obtuvieron de las compañías SIGMA (St. Louis, MO, EUA) y Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, EUA), respectivamente. La enzima *Bsu36I* para la detección del mutante "precore" se compró a la compañía New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA).

3.5. La reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica constituye la columna vertebral de esta tesis. La PCR una vez implementada, amplifica 146 pb de la región precore-core altamente conservada en el VHB (figura 9).

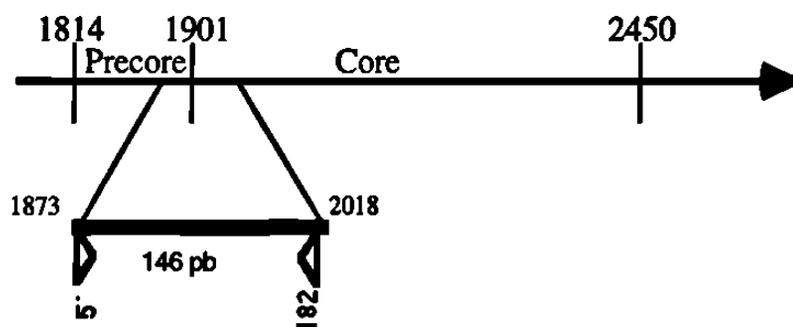


Figura 9. Región blanco de la PCR. Se muestran los sitios de apareamiento de los iniciadores y el tamaño del producto de PCR esperado. La numeración de la secuencia esta dada de acuerdo a Galibert et al.⁸⁸

3.5.1. Los iniciadores

La PCR utiliza sólo el iniciador 5' del par descrito por Hamasaki y cols.³⁴, pues el iniciador 3' fué diseñado por nosotros en la U.L.I.E.G. Sus respectivas secuencias son:

Iniciador 5' = CAA GCT GTG CCT TGG GTG GCC TT (posiciones 1873-1895)

Iniciador 3' = CCC GAT ACA GAG CTG AGG CGG TGT C (posiciones 1994-2018)

Estos iniciadores se sintetizaron en el Laboratorio de Química Biomolecular de la ULIEG bajo la supervisión del Dr. José María Viader. La síntesis se llevó a cabo en fase sólida por medio del método de las fosforamiditas y en un equipo automatizado de la compañía Beckman (Beckman de México, S.A. de C.V.).

3.5.2. El tratamiento de las muestras de suero

El método que se empleó para el tratamiento de las muestras de suero, fué descrito primero por Kaneko y cols.⁷⁷. Este método se basa en la desnaturalización de las proteínas séricas y virales en un pH alcalino y en la precipitación posterior por medio de centrifugación y neutralización del pH con ácido diluido, para liberar el DNA-VHB en el sobrenadante. Este método se seleccionó por su sencillez y factibilidad, además de que el riesgo de contaminación es prácticamente nulo, a diferencia de los métodos de lisis-extracción con solventes orgánicos, en los que la contaminación se puede dar a varios niveles (en la extracción, en la precipitación, en los lavados, en el secado, en la resuspensión, etc).

Este método se llevó acabo de la siguiente manera: se incubaron 18µl de suero con 2 µl de NaOH 1M a 37°C por 60 min en un baño de agua. Se neutralizó la solución formada con 20µl de HCl 0.1M y se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min a 4°C,

recuperándose todo el sobrenadante (aproximadamente 25 μ l). Este constituye la muestra que se emplea directamente con los demás reactivos de la técnica de PCR.

El volumen recuperado puede variar de una muestra de suero a otra, algunas veces la cantidad de proteínas puede producir una pastilla que supera con mucho al sobrenadante (<25 μ l). En otras ocasiones no se presenta la pastilla, por lo que en esos casos la muestra corresponde al volumen total (40 μ l).

3.5.3. La optimización de la PCR

Para esta finalidad se empleó como control, una muestra de suero VHB positiva. Primeramente se variaron las concentraciones de los reactivos de la PCR incluyendo: la concentración de MgCl₂, las unidades de la enzima DNA Polimerasa Taq, la cantidad de muestra y la concentración de los iniciadores (figura 11). Una vez seleccionadas las concentraciones óptimas de los reactivos, se procedió a aumentar la temperatura de apareamiento desde 58°C hasta 60°C (figura 12). El aumento de la intensidad de la señal de 146 pb, así como la ausencia o disminución de bandas inespecíficas, se tomaron como criterios de éxito para la optimización de las condiciones de reacción.

La amplificación se ejecutó en un termociclador minicycler, modelo PT-150 (MJ Research, Watertown, MA, EUA), según el programa descrito en la tabla III.

TABLA III. EL PROGRAMA DE LA PCR PARA LA DETECCION DEL DNA-VHB EN SUERO

PASO	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización Inicial	94°C	3 min
2	Desnaturalización	94°C	1 min
3	Apareamiento	60°C	1 min
4	Extensión	72°C	1 min
5	Ciclos	35 ciclos desde	el paso 2 al 4
6	Extensión final	72°C	3 min

3.5.4. La determinación del producto amplificado

Una vez realizada la PCR en cada muestra, se depositó un décimo del volumen de cada reacción en geles de agarosa al 2% y se sometió a electroforesis a 100 V durante 3 h. Junto con las muestras se depositó un marcador de peso molecular que daba una banda que coincidía con la esperada de 146 pb. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio, se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se compararon con el marcador de peso molecular. La aparición de una sola señal al nivel de 146pb, se consideró como criterio de positividad para la infección por el VHB.

3.6. La detección del virus mutante "precore"

La detección del virus mutante "precore" se esquematiza en la figura 10 y se basa en la digestión enzimática del producto de una PCR-VHB con *Bsu36 I*, lo que da un fragmento de 124 pb diferenciable del producto intacto de 146 pb que corresponde al VHB tipo silvestre. La enzima reconoce la secuencia CCTNAGG, que se forma primeramente por la aportación de la mutación que introduce el iniciador 5' en su antepenúltima base (C en lugar de T) y se completa con la base mutada que corresponde al VHB mutante "precore" (A en lugar de G en la primera base con la que se extendería el iniciador).

3.6.1. La digestión enzimática

Las reacciones de PCR que dieron una señal de 146 pb se transfirieron a un tubo nuevo y se les realizó una extracción fenol-sevag, seguida de precipitación con etanol⁸⁶. Una cuarta parte del volumen de resuspensión se digirió con 10 unidades de la enzima *Bsu36I* en un volumen final de 15 µl y en las condiciones que recomienda el proveedor, durante no menos de 3 horas a 37°C.

3.6.2. La electroforesis

La mitad de cada producto de la PCR previamente digerido, se depositó en un gel de poliacrilamida al 12% y se sometieron a electroforesis a 120V por 2 h. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta. La aparición de una banda a nivel de 124 pb se consideró como prueba positiva para VHB mutante “precore”.

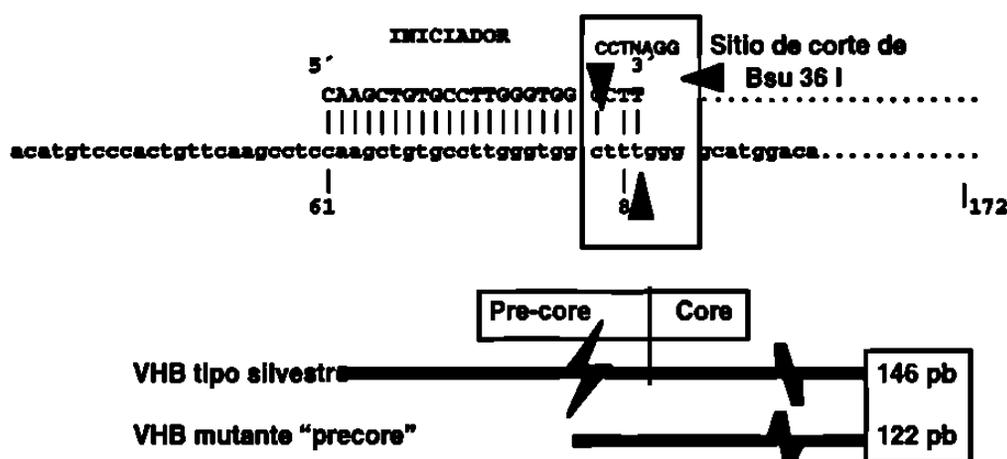


Figura 10. Estrategia para la detección del VHB mutante “precore”. Se esquematiza como el iniciador 5'el cual introduce una mutación (C en lugar de T) en el producto de la PCR que junto con la A de la secuencia mutante, completan el sitio de reconocimiento de la enzima Bsu36I (CCTTAGG). La digestión enzimática posterior origina un fragmento de 122pb que diferencia al virus mutante del virus silvestre el cual permanece intacto (146pb). Tomado de Hamasaki K, et al 1994³⁸

3.7. Las precauciones tomadas

Como medida profiláctica contra el contagio con el material infeccioso usado (sueros), se siguió el esquema de vacunación contra la hepatitis B con la vacuna recombinante Engerix B™ (SmithKline Beecham Farmacéutica), consistente de 3 dosis; 0,1 y 6 meses .

También se emplearon una bata y guantes desechables y se trabajó bajo una campana de flujo laminar tipo II, cuando se destapaban los contenedores de las muestras,

en la separación y en el alicuotado de las mismas. Después de cada manipulación de las muestras se practicó una asepsia escrupulosa de las manos. Todos los desechos relacionados con las muestras se depositaban en frascos con una solución de hipoclorito de sodio al 5% para desinfección por lo menos durante media hora y después se esterilizaban con calor húmedo, antes de ser desechadas.

Posterior al trabajo con las muestras se limpiaban los aparatos, utensilios y superficies expuestas con SDS y con hipoclorito de sodio al 5%, seguido por irradiación con luz UV por al menos una hora⁸⁹.

Para evitar la contaminación de las muestras, se separaron las áreas de pre-PCR y post-PCR. Los reactivos se dividieron en alícuotas y se procuró evitar la formación de aerosoles⁸¹.

El área de pre-PCR fué ubicada en la Unidad de Hígado, donde se alicuotaron los reactivos, se trataron los sueros de los pacientes y se montaron las reacciones de PCR, siempre bajo una campana de flujo laminar. Previamente a cada etapa (alícuotado de reactivos, tratamiento de la muestra, montaje de la reacción) se realizó un tratamiento de la campana de flujo laminar con luz ultravioleta por al menos una hora y nunca se trabajaron productos amplificados bajo la misma.

Los resultados se consideraron válidos si estos fueron positivos en al menos dos ocasiones. Para evitar la contaminación con plásmidos, estos se alicuotaron previamente en tubos con la debida concentración de DNA, que sirvieron como control positivo en cada amplificación.

Siempre se incluyeron en cada PCR realizada, un control positivo y uno negativo, este último constituido por agua ultrapura esteril⁸¹.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1. El analisis computacional

La decisión de sustituir el iniciador 3' original, fue tomada al comparar los pares original y nuevo, con los programas Oligo 4.0 y Amplify 1.2 (National Biosciences Inc. Plymouth, NN, EUA. 1992 y Bill Engls, Departamento de genética, Universidad de Winconsin, WI. EUA. 1992).

En la tabla IV se resume el desempeño de los iniciadores con las regiones homólogas de varios virus, incluyendo mutantes del VHB y en la tabla V, se muestran las características principales de ambos oligonucleótidos.

TABLA IV. LAS CARACTERISTICAS DE LOS INICIADORES 3'

PARAMETROS	ORIGINAL	MODIFICADO
Longitud del Iniciador	23 pb	25 pb
Posición	149	182
Longitud del producto	111 pb	146 pb
Tm de apareamiento	51.3°C	57.4°C
Diferencias de Tm	15.6°C	0.6°C
Capacidad Iniciadora	96%	99%
Estabilidad	56%	76%

Mediante el programa computacional Amplify 1.2, el iniciador 5' fue capaz de aparearse perfectamente a las 18 secuencias genómicas del VHB disponibles en el GeneBank (emb excepto *gb): hbvaywc, X65257; hbvadw2a, X02763; hbvadr, V00867; hehvayr, X04615; hpbmut1, L27106; hbvdna, X68292; hpbetnc, *L08805; hbvxcps,

X0185; hbvadv, V00866; hbvadr4, X01587; hpbadyw, J02202; hbadywmcg, X59795; hbvaywe, X65259; hpbhbvaa, *M32138; xxhepav, V01460; hbvadrm, X14193; hbvadv3, D00331 y hbvadv4, X69798. En estas secuencias el iniciador 5', introduce la mutación en la antepenúltima base como se esquematiza en la figura 10.

El iniciador 3' original presentó mayor número de diferencias cuando se comparó con sus regiones homólogas de 18 secuencias VHB, como se indica en la tabla V:

TABLA V. COMPARACION DE LOS INICIADORES 3' CON SUS REGIONES VIRALES HOMOLOGAS

Secuencia de VHB	Oligonucleótido 3' original	Oligonucleótido 3' nuevo
Iniciador 3'	AGACTGAAGAAAGGAAGATAAGC5'	CTGTGGCGGAGTCGAGACATAGCCC5'
hbvaywc	-----TC-T--	--A-----
hbvadv2a	-----GC-GT-	-----
hbvadr	-----C-----	-----A-----
hehbayr	-----	-----A-----
hpbmut1 (mutante)	-----GCGT--	--A-----A-----
hbvdna (prototipo)	-----GC-TT-	-----T-----
hpbetnc (mutante)	-----	-----A-----
hbvxcps	-----GC-GT-	-----T-----
hbvadv	-----GC-T--	-----T-----
hbvadr4	-----	-----T-----
hpbadyw	-----GC-T--	--A-----C-----
hbvadywmcg	-----TC-T--	--A-----T-----
hbvaywe	-----AG-TGC-T--	--A-----
hpbhbvaa	-----TC-T--	--A-----T-----
xxhepav	-----TC-T--	--A-T-----
hbvadrm	-----A-----G-----	-----T-----T-----
hbvadv3	-----	-----T-----
hbvadv4	-----A-----G-----T-----CC-----	-----A-----T-----G-----

La mayor variabilidad en el extremo 5' del iniciador 3' original, provoca una disminución de su estabilidad y capacidad iniciadora. En cuanto al nuevo iniciador 3', la variabilidad fué puntual y sólo en ciertas secuencias virales (Tabla V).

La mayor similitud del nuevo iniciador 3' con las diversas secuencias blanco, se traduce en una mayor capacidad iniciadora, además de contener 2 nucleótidos más que el

original y con un contenido más elevado de nucleótidos G-C; ambas características redundan en mayor estabilidad en el apareamiento con su secuencia blanco.

Analizando las temperaturas medias de fusión (T_m) de los iniciadores originales mediante el programa computacional Oligo 4.0, se encontró que tal diferencia de temperatura era muy grande (15.8°C), en contraste con el par nuevo, donde dicha diferencia se disminuía a menos de un grado centígrado. Esta menor diferencia en la T_m , asegura que ambos iniciadores se comporten de manera similar en cuanto a su eficiencia de apareamiento con su secuencia blanco.

El cambio de posición del nuevo iniciador 3', provoca que el producto de amplificación sea 35 pb más largo que el original. Este tamaño aunque ligeramente mayor, mejora la visualización del producto en los geles de agarosa y poliacrilamida, en el ensayo de detección del virus mutante "precore".

La comparación de secuencias mediante el programa computacional blast, consultado via INTERNET (NCBI, Washington, D:C:, EUA), demostró que estos oligonucleótidos sólo se aparean a secuencias del virus de la hepatitis B y con ninguna otra secuencia conocida.

4.2. La optimización de la PCR

Para esta finalidad se variaron las concentraciones de algunos de los reactivos como se muestra en la figura 11, excepto la concentración de desoxinucleósidos trifosfato, la cual se mantuvo constante en todas las reacciones de la PCR. En cuanto a la concentración de enzima Taq polimerasa, ésta se trabajó a 2.5 unidades en todas las otras reacciones de PCR, por lo que no aparece especificada en la figura 11. Al igual que con la enzima Taq polimerasa, la concentración de cloruro de magnesio se manejó a 1.5 mM.

Para la elección de una determinada concentración de un reactivo en la PCR, se tomó el criterio de aumento en la intensidad de la banda de 146 pb (señal de mejoramiento

de la técnica). Como se puede apreciar en la figura 11, hubo un aumento proporcional de la señal con la concentración de cloruro de magnesio, pero al mismo tiempo aumentaba un "barrido" hacia arriba de la banda de interés. Esto probablemente se debió a un aumento en la inespecificidad en la PCR provocada por el exceso de reactivo.

En lo que toca a la concentración de la enzima DNA Polimerasa Taq , se observó una disminución de la señal a 2 unidades, pero no un aumento con 3 unidades, por lo que se eligió la concentración intermedia de 2.5 unidades.

El aumento en la cantidad de muestra empleada (suero tratado), por arriba de los 25µl inhibió la PCR (50µl de volumen final). Esto también ocurrió cuando se ensayó la PCR a un volumen final de 100µl. Al aumentar la concentración de los iniciadores, también aumentó proporcionalmente la señal de 146pb por lo que se eligió la concentración más alta (0.5µM).

Al hacer las combinaciones de las concentraciones que dieron mejor señal en experimentos de una sola variable, por ejemplo; de los iniciadores (0.5µM) con aquellas del cloruro de magnesio, los resultados no fueron como se esperaba, es decir, no fueron sumatorios. La señal de interés siguió aumentando proporcionalmente a la concentración del cloruro de magnesio, pero la inespecificidad también lo hizo y con mayor intensidad.

Al aumentar la temperatura de apareamiento de 58 a 60°C (como se muestra en la figura 12), se observó una disminución en la inespecificidad, al aparecer menos bandas en el primero de los 2 sueros negativos (carril 1*) y en el segundo suero negativo, éstas desaparecieron por completo (carril 2*). En los sueros positivos (Carriles 3 y 4) también se disminuyó el fondo inespecífico (que era débil), como en el primer suero (carril 3*) y en el segundo suero no se disminuyó la intensidad de la banda (carril 4*). Esto indica una mejoría notable en la PCR sumando las concentraciones combinadas óptimas de reactivos con el aumento de la temperatura a 60°C . Cabe mencionar que sólo en algunos casos aislados de sueros negativos a la PCR, hubo inespecificidad de la reacción, aún en condiciones óptimas.

Finalmente las condiciones óptimas a las que se realizaron las PCRs, después de variar la concentración de los reactivos y aumentando la temperatura de apareamiento de los iniciadores, fueron las siguientes: 10 μ l. de cada muestra de suero, 0.2 μ M de cada desoxinucleosido trifosfato, 2.5 Unidades de Taq DNA polimerasa, 0.5 μ M de cada iniciador, 1.5mM de MgCl₂ y 1X del buffer de reacción a un volumen final de 50 μ l.

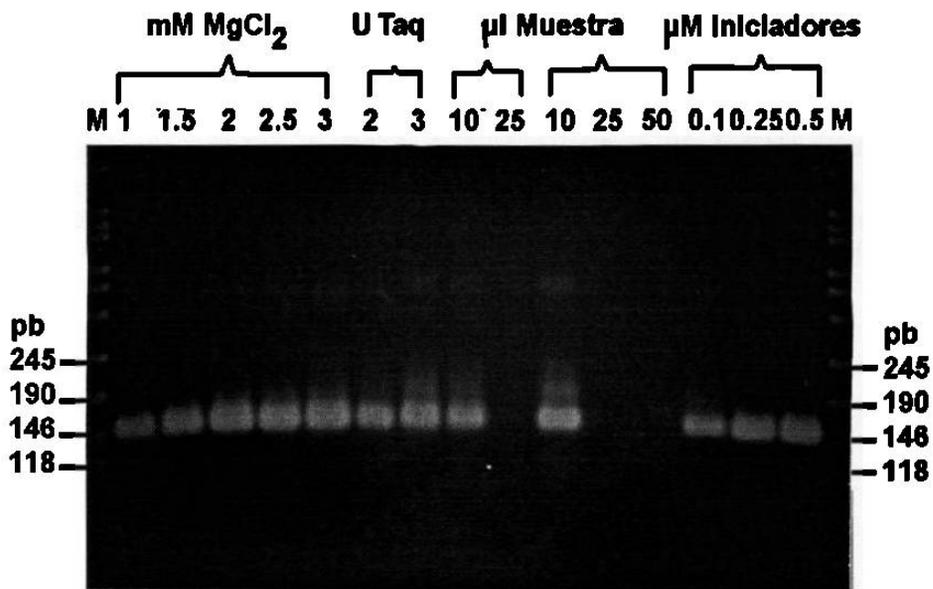


Figura 11. Optimización de la PCR variando la concentración de los reactivos. Con base en concentraciones estandar de reactivos y a un volumen final de 50 μ l (MgCl₂ 1.5mM, 2.5 U Taq, 0.1mM de iniciadores), se variaron las concentraciones específicas de reactivos verificando la intensidad de la banda de 146pb en el gel de agarosa al 2%. En cuanto a la cantidad de muestra, las PCRs se realizaron a dos volúmenes finales: 50 y 100 μ l. M=pP500hPLA/*Msp I*.

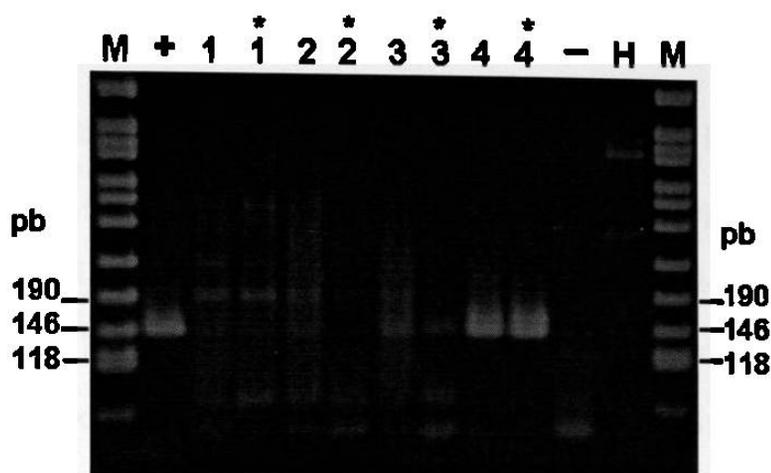


Figura 12. Optimización de la PCR aumentando la temperatura de 58°C a 60°C. Se ejemplifican los resultados en dos casos extremos de inespecificidad (1 y 2) y en dos positivos (3 y 4) al VHB. El aumento de la temperatura se indica por (*). Se incluyó un PCR a partir de DNA genómico humano (H), así como un control positivo de DNA plasmídico (+) y uno negativo sin DNA (-). En el carril H, las dos bandas observadas coinciden con aquellas inespecíficas de los negativos, estableciendo que la inespecificidad es debida a DNA genómico humano en tales sueros. M=pP500hPLA/*Msp I*.

4.3. La caracterización enzimática del producto amplificado

Para corroborar la identidad del fragmento producido por la PCR a partir de DNA plasmídico, se generó por computadora, un mapa de restricción correspondiente al producto de amplificación del plásmido pEco63 y se verificó la digestión con las enzimas seleccionadas; AluI, BglII, MaeI y Mnl I. Esto se realizó mediante el programa DNA stryder 1.1(Ch. Marck y C:E:A.: Département de Biologie e Institut de recherché Fondamentale. Francia. 1992),

Primero se caracterizó el producto de PCR del testigo positivo (plásmido pEco63). Como se aprecia en la figura 13, el patrón de bandas correspondió con el mapa teórico.

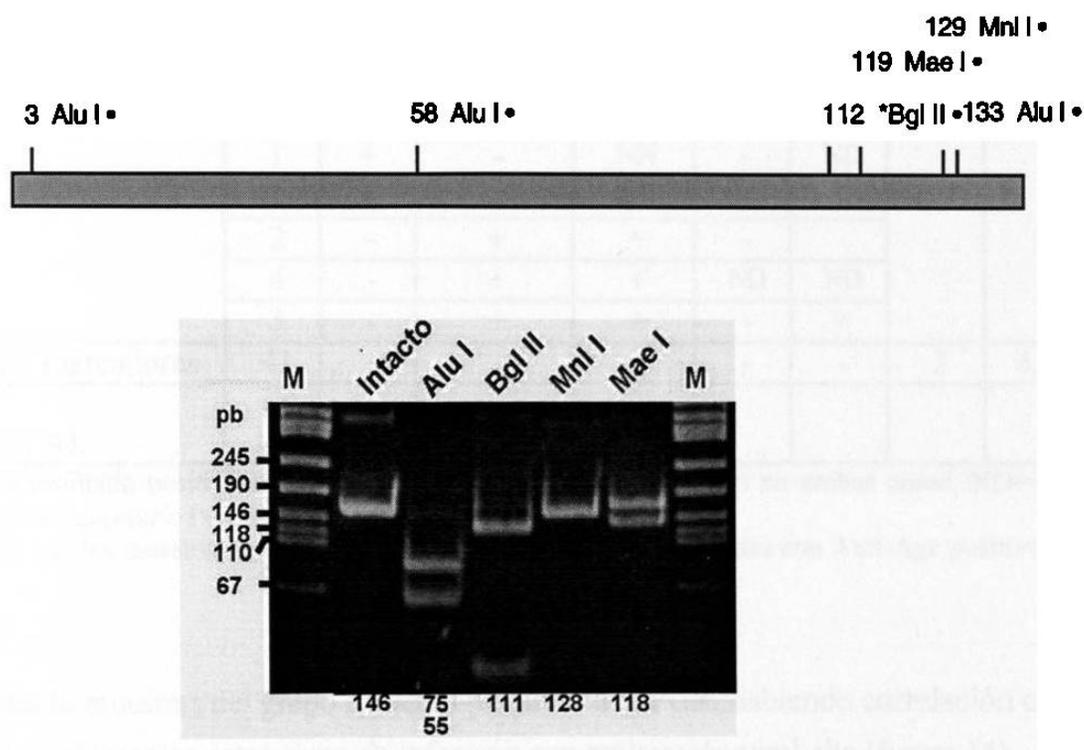


Figura 13. Mapa teórico y caracterización enzimática del producto de PCR a partir del plásmido pEco63. Seleccionando 4 enzimas de restricción, se digirieron 10 μ l de una reacción de PCR por cada enzima y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Se observa que los fragmentos generados coinciden con el mapa teórico (arriba). M=pP500hPLA/Msp I.

4.4. El tamizaje por PCR de las muestras de suero

Las 116 muestras de suero fueron tratadas para liberar el posible DNA viral, sometidas a la PCR y a electroforesis en agarosa. Los resultados positivos de PCR, así como sus porcentajes por grupo de pacientes se resumen en la tabla VI.

TABLA VI. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA PCR

DIAGNOSTICO	#	Ags	Anticore total	Anti-Ags	Age	Anti-Age	PCR (+)	%
Grupo I. Replicación alta	20	+	+	NN	+	+/-	20	100
Grupo II. Replicación baja	12	+	+	-	-	+/-	2/ *	15.3
	1	+	+	NN	-	ND		
Grupo III. Marcadores atípicos y de protección	7	-	+	-	-	-	2	7.1
	2	-	+	-	ND	-		
	6	-	+	-	ND	ND		
	1	-	+	-	-	+		
	1	+	-	NN	-	ND		
	2	+	-	NN	-	-		
	2	-	+	+	-	-		
	4	-	+	+	ND	ND		
	3	-	+	+	-	+		
Grupo IV. Sin marcadores	41	-	-	-	-	-	2	4.8
TOTAL	102							

+/- : indica o resultado positivo o negativo del marcador serológico, pero no ambas cosas, ND= no detectado, NN=no necesario (ver texto). El porcentaje esta dado por grupo.

2/ * significa que las muestras positivas a la PCR , pertenecen a los pacientes con Anti-Age positivo.

Todas la muestras del grupo I, fueron positivas a la PCR, habiendo correlación con el perfil serológico en estos casos de infección con replicación viral alta (figura 14).

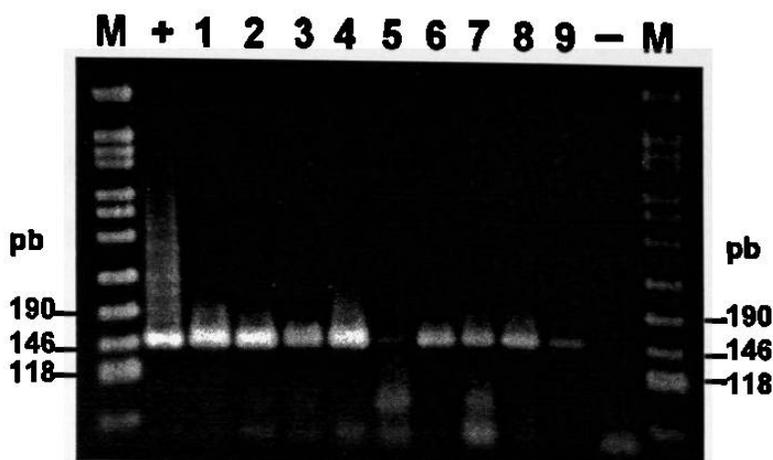


Figura 14. PCR en muestras de pacientes del grupo I de alta replicación viral. Se ejemplifican los PCRs de 9 sueros de pacientes (carriles 1 al 9), que muestran diferentes intensidades en la banda de 146pb. Se empleó pEco63 (1ng) como control positivo (+) y agua mili-Q como control negativo (-). M=pP500hPLA/*MspI*.

En las demás muestras, como en las del grupo II, es de llamar la atención que el 15.3% de los pacientes con replicación viral baja aparente (por serología), tienen replicación alta (DNA-VHB detectable por PCR), lo cual coloca a esta muestra de la población mexicana, como en incidencia intermedia en cuanto a infección crónica con el VHB (ver apéndice A). Ambos pacientes positivos en este grupo ya habían seroconvertido a Anti-Age, siendo claro que en estos casos la PCR es la única manera de establecer la replicación viral y por lo tanto el estado de infectividad.

Más aún, en los casos con marcadores atípicos o ausencia de estos (grupos III y IV), fué posible detectar la señal de 146pb (7.1% y 4.8%, respectivamente), estos constituyen la fracción de pacientes, que es diagnosticada VHB negativa por serología. Los dos pacientes que resultaron positivos a la PCR-VHB en el grupo III, curiosamente fueron únicamente positivos a anticore-total como el único marcador de protección. Un paciente de ellos fué referido a la Unidad de Hígado con el diagnóstico de cirrosis hepática.

4.5. La búsqueda del virus mutante "precore"

Cuando se emplearon únicamente los plásmidos pEco63 y el p970.1 (figura 15), el método resultó ser efectivo y diferenció al virus mutante "precore" del tipo silvestre, el cual no se digirió con la enzima *Bsu36I* y permaneció con su tamaño intacto de 146pb.

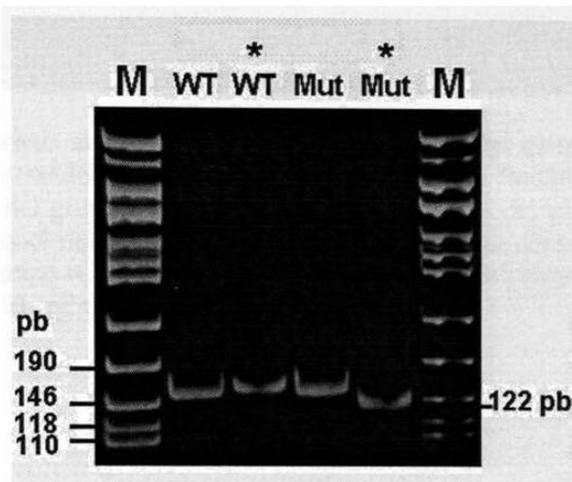


Figura 15. Diagnóstico diferencial entre VHB silvestre y VHB mutante "precore". Se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de los productos de PCR a partir de plásmidos como controles, intactos y digeridos (*) con la enzima *Bsu36 I*. Sólo se aprecia una banda de 122pb correspondiente al virus mutante precore en la digestión del p970.1 (Mut) y o en aquella del pEco63 (WT). M=pP500hPL4/*Msp I*.

En cuanto a las 26 reacciones de PCR de las muestras de pacientes que presentaron la señal de 146pb, como criterio de reacción positiva para el VHB, estas se sometieron a la detección del virus mutante "precore" como se describió anteriormente. Cada muestra digerida se sometió a electroforesis junto con su contraparte no digerida, para así poder apreciar las posibles proporciones entre los virus silvestre y mutante "precore".

Para la visualización en el gel de poliacrilamida en las muestras del grupo I, fué suficiente una reacción de PCR (figura 16), a diferencia de las muestras de los otros 3 grupos, donde se necesitaron 2 reacciones o hasta el aislamiento del DNA de la banda de 146pb y su posterior reamplificación (figura 17).

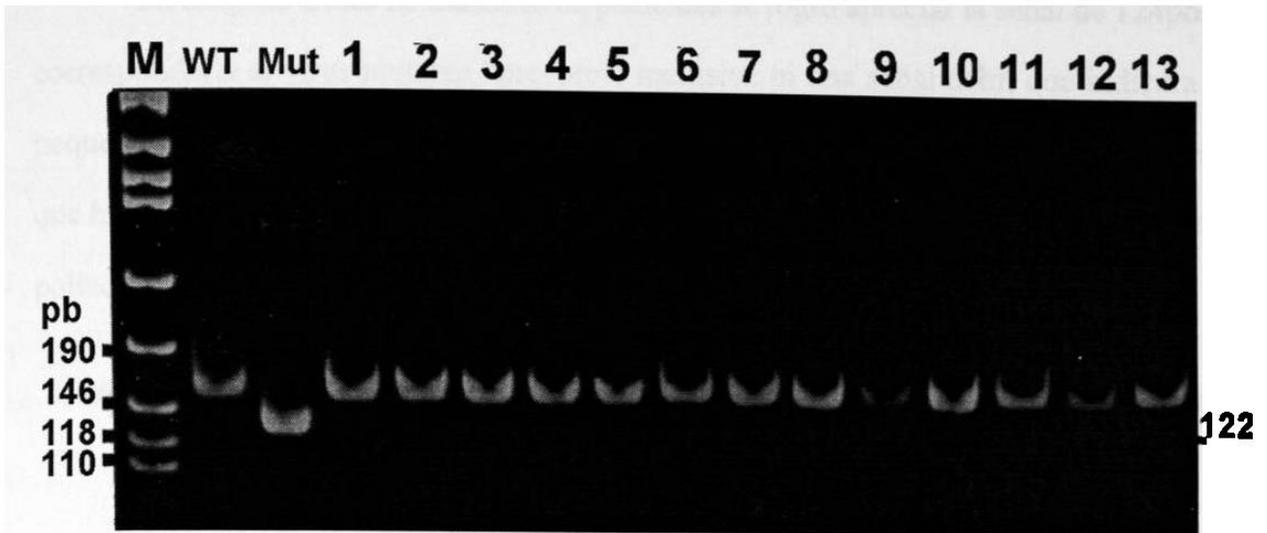


Figura 16. Detección del virus mutante “precore” en pacientes del grupo I. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% mostrando las digestiones enzimáticas con *Bsu36I*, de 13 productos de PCR pertenecientes a pacientes del grupo I (carriles 1 al 13), también la del plásmido pEco63 (WT) usado como control negativo y aquel del plásmido p970.1 (Mut) empleado como control positivo. Todas las muestras de suero de este grupo resultaron negativas a la presencia del virus mutante, evidenciado por la falta de la señal de 122pb. M=pP500hPLA/*Msp I*.

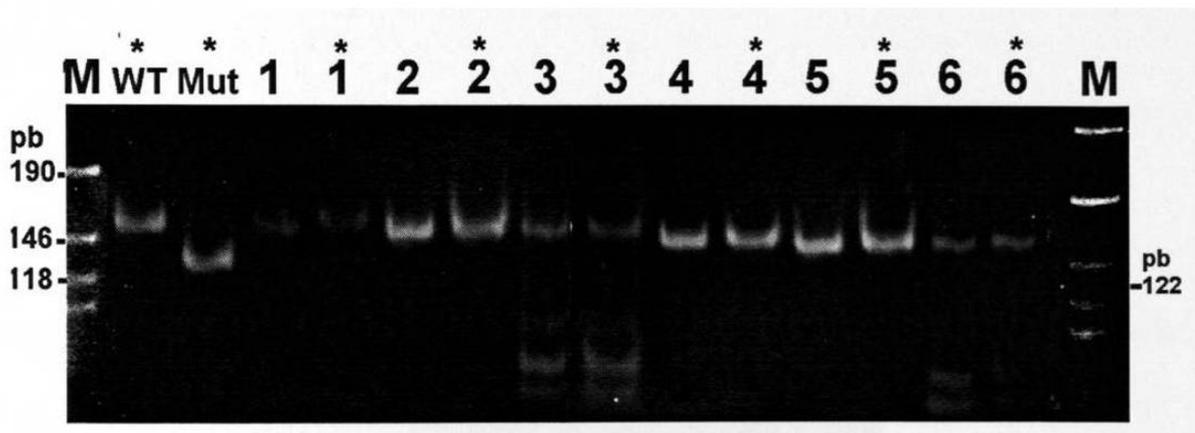


Figura 17. Búsqueda del virus mutante “precore” en pacientes de grupos I y IV. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de los productos de PCR intactos y digeridos con *Bsu36I* (*), provenientes de muestras de pacientes de los grupos I (1,2,4 y 5) y grupo IV (3 y 6). Estos últimos son reamplificaciones de 2 productos de la PCR. M=pP500hPLA/*Msp I*.

En ninguna de las 26 muestras de pacientes se logró apreciar la señal de 124pb que correspondería al virus mutante “precore”; inclusive ni una señal débil que indicara una pequeña proporción del mutante (lo cuál sería posible ya que siempre se tuvo cuidado de que hubiera una cantidad suficiente de producto de la PCR para ser visualizado en gel de poliacrilamida, aún si éste fuera digerido).

4.6. La comparación de los patrones de restricción de los productos de amplificación

Este tipo de análisis se practicó para descartar falsos positivos en aquellas muestras de suero positivas a la señal de 146pb, pero con resultados negativos o atípicos de infección por VHB; además del interés de conocer el patrón de restricción de un fragmento del genoma del VHB (o de los) que circula en el Noreste de México.

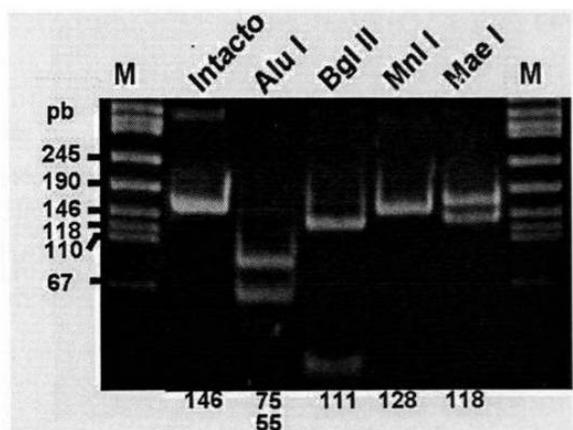


Figura 18. Patrón de restricción de los productos de PCR de los dos plásmidos utilizados como control negativo (pEco63) y positivo (p970.1) para la detección del virus mutante precore. Gel de poliacrilamida al 12%. Cada carril representa una quinta parte de una reacción de PCR digerida con cada una de las 4 enzimas seleccionadas. Para cada enzima se indica el tamaño de los productos esperados en la parte inferior de cada carril. Este patrón común a ambos plásmidos es: Alu I⁺, Bgl II⁺, Mnl I⁺ y Mae I⁺. M=pP500hPLA/MspI.

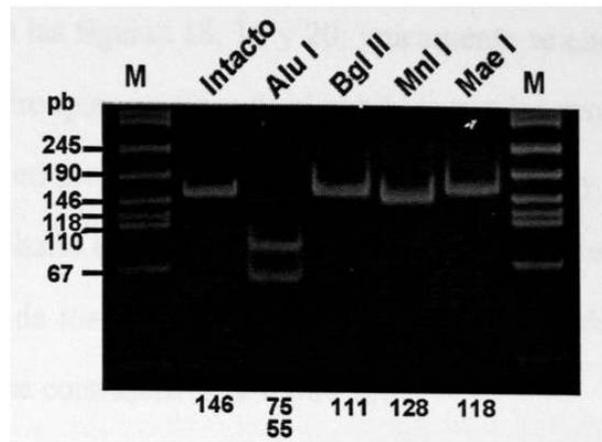


Figura 19. Patrón de restricción de los productos de PCR de pacientes con marcadores atípicos y negativos para VHB. Gel de poliacrilamida al 12%. Se ejemplifica el patrón de restricción hallado en 2 productos de PCR de 2 muestras de pacientes, uno del grupo II y otro del grupo IV. Cada carril corresponde a una reacción completa de PCR. Para cada enzima se indica el tamaño de los productos esperados en la parte inferior de cada carril. Tal patrón es:: *Alu I*⁺, *Bgl II*⁻, *Mnl I*⁺ y *Mae I*⁻. M=pP500hPLA/*Msp I*.

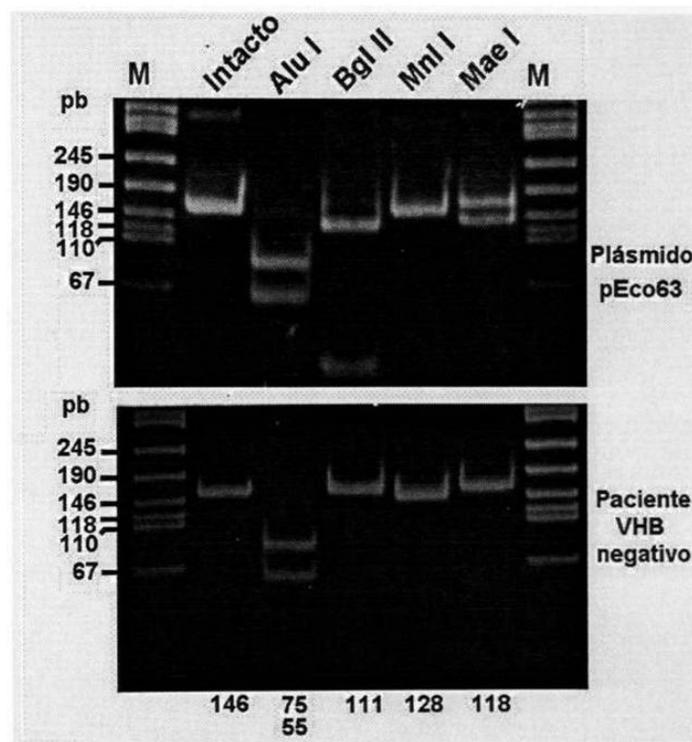


Figura 20. Comparación de los 2 patrones de restricción de los productos de PCR de plásmidos y de pacientes sin marcadores para VHB. Ambos patrones aunque diferentes, comparten el patrón de corte de las enzima *Alu I* (enzima muy recurrente) y *Mnl I*. M=pP500hPLA/*Msp I*.

Como muestran las figuras 18, 19 y 20; únicamente se encontraron dos patrones de restricción. El primero que corresponde al exhibido por los productos de PCR a partir de los dos plásmidos empleados como controles (figura 18) y el segundo patrón de restricción es es que se halló en dos de los productos de PCR correspondientes a muestras de suero de pacientes de los grupos III y IV (figura 19). Las diferencias entre ambos patrones de restricción se contrastan en la figura 20.

Al analizar 4 productos de PCR de muestras de pacientes del grupo I de alta replicación, se encontraron los dos patrones de restricción. En un paciente, el patrón coincidió con el exhibido por los plásmidos y en las restantes tres muestras, el patrón fué idéntico al de los pacientes atípicos.

CAPITULO 5

DISCUSION

Con los resultados obtenidos, el primer objetivo: "implementación de la PCR en el diagnóstico de infección por VHB", se cumplió cabalmente ya que el método se optimizó por medio de controles con DNA plasmídico y con sueros de un perfil serológico definido. En cuanto al método utilizado en el tratamiento de las muestras de suero, éste es sencillo, económico (tanto el HCl como el NaOH no son reactivos costosos), eficiente y reduce al mínimo la contaminación. Lo anterior es debido a que en un solo tubo y al utilizar una pequeña cantidad de muestra (18µl de suero), se realiza la desnaturalización de proteínas por alcali y la neutralización con ácido cuyos costos son mínimos considerando además que se emplean en poca cantidad (2 y 20µl respectivamente). La incubación se puede hacer en un baño de agua a 37°C y tan sólo se requiere una hora por lo que este paso resulta relativamente rápido. La centrifugación se realiza directamente en la muestra tratada y posteriormente el sobrenadante se recupera en un tubo nuevo, por lo tanto sólo se requiere abrir el tubo 3 veces para incluir un reactivo a la vez y sólo una vez al final se remueve la muestra que está lista para la PCR. Estos pasos bajo la campana de flujo laminar aseguran que el proceso este libre de contaminación, por lo que resulta más conveniente para establecerlo en un diagnóstico de rutina, que aquellos métodos de lisis-extracción con proteasas-solventes orgánicos y precipitación ulterior con alcohol, en donde la contaminación o pérdida del DNA viral puede darse en varios niveles: en la extracción, en la precipitación y en el secado.

Los resultados de la PCR concordaron perfectamente con los estudios serológicos en los pacientes del grupo I, donde 20/20 muestras fueron positivas. Esto corrobora que

en la presencia del Age , efectivamente hay replicación del VHB aún en coinfecciones con el VHC.

En contraste con lo anterior, los resultados PCR positivos para el VHB obtenidos en las muestras de los grupos II, III y IV, son hallazgos que ponen de manifiesto la necesidad de emplear ésta técnica en el diagnóstico de infección por VHB. Estos resultados concuerdan con varios reportes que han demostrado infección presente y replicación viral en presencia de marcadores atípicos y en ausencia de marcadores serológicos de replicación (Age) del VHB detectados con ensayos serológicos como el ELISA que se emplean para el diagnóstico rutinario^{35,54,57,66,80,90}. Se han sugerido varias explicaciones para estos resultados negativos por el método ELISA, como la existencia de complejos inmunes, la ausencia de antígenos VHB, la baja concentración de estos o bien a la débil respuesta inmune a ellos y finalmente la variación genética misma del VHB^{33,44,63}.

Los porcentajes de los casos PCR-VHB positivos del grupo II (15.3%) son semejantes a aquellos encontrados en el medio oriente (23%)⁶⁷ y en el sureste de Europa (20.8%)⁶⁷. Sin embargo, son mayores que aquellos encontrados en algunos países del primer mundo, como en el caso del Reino Unido de la Gran Bretaña (4.3%)⁷⁰, Australia (4.7%)⁶⁸ y países del norte de Europa (5.5%)⁶⁷. También son menores a los porcentajes de este patrón serológico de los países donde la hepatitis B es endémica, como es el caso de Italia (52.9%)⁶⁴ y Grecia (50%)⁶⁶, donde se describió primeramente este patrón serológico (ver apéndice A).

Los casos PCR positivos al VHB en el grupo III no han sido raros, pues se cuenta con varios reportes de infección persistente por VHB aún en pacientes con seroconversión y pérdida de marcadores espontáneamente o inducidos con terapia^{19,37,46,47,57,77}. En este grupo se encontró que un 7.1% fueron positivos al DNA-VHB; porcentaje similar a los hallados en Austria (8.1%)⁹², Hong Kong (6.8%)⁵⁴ y Francia (5.3%)⁶⁵ y que contrastan con los de países como en el Reino Unido de la Gran Bretaña^{54,70} y Australia⁶⁸ donde la

presencia de marcadores de protección, indican efectivamente que ya no existe la infección (DNA-VHB negativo) y con los altos porcentajes de positividad al DNA-VHB de países con hepatitis B endémica como China (26%)⁹⁷ y Portugal (81.8%)⁷⁶. (ver apéndice A).

Los 2 casos del grupo IV sin algún marcador positivo para el VHB que indicara contacto con el virus y que fueron positivos para la PCR ($2/41 = 4.8\%$), son realmente sorprendentes, pero tienen antecedentes en estudios realizados en pacientes durante la etapa crónica de la enfermedad y con el DNA-VHB positivo en el suero⁹¹, los hepatocitos⁷³ o en las células sanguíneas mononucleares periféricas.^{72,92} A diferencia de estos reportes, en el presente, el DNA se detectó en suero y no en células mononucleares periféricas; además los pacientes que resultaron positivos, no tenían antecedentes de alcoholismo como en aquellos reportes. De acuerdo al porcentaje encontrado en esta muestra (4.8%), éste superó al encontrado en Australia (2.9%)⁶⁸, pero quedó por debajo de lo reportado para China (8 y 5.8%)^{90,97} y Francia (8.9%)⁶⁹.

Se establece por lo tanto que la hepatitis B en México (Noreste), tiene una prevalencia intermedia entre países del primer mundo donde es muy baja y los países del lejano oriente y del mediterráneo donde es endémica (elevada) (ver apéndice A).

Para los objetivos perseguidos en este trabajo, los indicadores demostraron ser efectivos en el diagnóstico de la infección crónica por el VHB y en la producción de los fragmentos de la PCR que sirvieron para detectar al VHB mutante precore, diferenciándolo del VHB tipo silvestre, aunque esto haya sido únicamente en el caso de los plásmidos pEco63 y p970.1, empleados como controles de amplificación y no en las muestras de pacientes VHB positivas.

El hecho de no haber detectado la presencia de este virus mutante en ninguna de las 29 muestras analizadas, puede dar lugar a varias especulaciones; por ejemplo, que esto sea debido a una prevalencia muy baja o hasta nula de este virus mutante en las hepatopatías crónicas del Noreste de México, o que otras mutaciones diferentes a ésta provoquen los mismos resultados (imposibilidad de detección por serología) 21,31,34,35,37,38,40,45-

48,93,94. Se esperaba que como el virus mutante precore ha sido idéntico, independientemente del origen étnico del hospedero ³⁹ (ver apéndice B) y a que éste surge durante la infección crónica (hasta ser el virus predominante), pudiera haberse encontrado en cualquiera de las muestras positivas por la PCR de cualquier grupo, sólo o como una población heterogénea^{16,34,35,38}.

Esta mutación buscada resulta en un cambio de un nucleótido de la región ϵ (la cuál forma una estructura secundaria en el transcrito pregenómico), que puede debilitar la estructura helicoidal si se trata del genotipo A del VHB. Por lo tanto surge otra especulación basada en el hecho anterior, a saber: que el genotipo VHB circulante en México pudiera ser el genotipo A y por lo tanto dicha mutación no es favorecida, tal y como ocurre en Francia⁹⁵.

De las muestras estudiadas en el presente trabajo, las de mayor probabilidad de portar al virus mutante precore fueron las del grupo II (baja replicación viral), donde 9 de las 13 muestras ya habían seroconvertido a anti-Age . Con tal patrón serológico, se ha encontrado que el DNA-VHB es casi exclusivamente mutante. Las muestras del grupo I, tenían menor probabilidad de portar al virus mutante, dado que en este tipo de patrón lo que se encuentra es una población viral heterogénea con baja proporción del virus mutante. En las muestras PCR positivas de los grupos III y IV, la presencia de este mutante sólo aclararía la falta del Age, pero no de los demás marcadores serológicos. En estos últimos grupos no se esperaba encontrar tal mutación.

Cabe tener en cuenta que cada muestra representa a un paciente en una fecha determinada, por lo que pudiera haberse encontrado al paciente muy al inicio de la hepatitis B crónica, donde el virus mutante “precore” (o cualquier virus mutante) estuviera originándose y donde el VHB tipo silvestre es la población predominante. Si esto fuera cierto, un análisis de este virus mutante en muestras de diferentes fechas (seguimiento) de algunos pacientes podría revelar su emergencia a partir de una infección con un VHB tipo silvestre, como se ha demostrado en publicaciones de este tipo.

El análisis de restricción practicado a 2 reacciones de la PCR positivas a la señal de 146pb de una muestra atípica y otra negativa para el VHB por serología, además de 4 reacciones positivas del grupo I, reveló solo 2 patrones que coinciden con el mapa teórico de ésta región del genoma del VHB. Esto da una mayor validez a la presunción de infección por VHB (PCR positivos) en las muestras de suero positivas de los grupos II, III y IV. El hecho es que para *AluI* (una enzima muy recurrente), su patrón de restricción se conservó perfectamente en todas las muestras analizadas. En cuanto al patrón de restricción de las demás enzimas, se debe tener presente que el cambio en una sólo base (que pudiera originar una mutación silenciosa en el genoma del VHB) alteraría los sitios de restricción de más de una de ellas, ya que se encuentran muy próximos (figura 13).

La diferencia entre los patrones de digestión hallados entre los productos de la PCR de 146pb, puede ser sólo el reflejo de la mutación limitada en esa región del genoma del VHB que es altamente conservada en los VHBs, por formar la estructura secundaria ϵ en el pregenoma de RNA que sirve para iniciar la encapsidación y que además participa en la traducción de los dos marcos de lectura abiertos del gen C¹³.

No cabe duda que la determinación de la secuencia nucleotídica en las muestras PCR-VHB positivas mencionadas confirmaría de manera categórica la verdadera identidad de la señal de 146pb en relación a la infección por VHB. Lo que sí se descarta es la contaminación con DNA de cualquiera de los plásmidos, pues el patrón de restricción fué diferente al de los pacientes.

Este trabajo constituye el primer reporte en México acerca del virus mutante precore del VHB y el segundo en Latinoamérica, después de aquel realizado en Argentina⁹⁶.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1. Se optimizó la PCR para el diagnóstico de infección por VHB en muestras de suero.**
- 2. Se montó la técnica de diferenciación entre VHB tipos silvestre y mutante “precore”.**
- 3. La PCR concordó en el 100% de los casos de infección por VHB y replicación viral alta detectados por serología.**
- 4. Se encontraron casos de pacientes con marcadores atípicos (7.1%) y hasta negativos para VHB por serología (4.8%), que fueron positivos para el VHB por la PCR.**
- 5. No se detectó la presencia del VHB mutante “precore” en ninguna de las 30 muestras positivas en la PCR.**

CAPITULO 7

REFERENCIAS

- 1.- Margolis, HS, Alter MJ y Hadler SC. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Sem Liv Dis* 1991; 11(2):84-92.
- 2.- Tiollais P, Buendía MA. Hepatitis B virus. *Sci Amer* 1991:48-54.
- 3.- Robinson WS, Miller RH, Marion PL. Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication. *Hepatology* 1987;7(1 Supl.):64-73.
- 4.- Ganem D, Varnus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann. Rev. Biochem.* 1987;56:651-693.
- 5.- Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1989;9(2):322-327.
- 6.- Gerlich W. Hepatitis B surface proteins. *J Hepatology* 1991;13(4):90-92.
- 7.- Gerlich WH, Lu X, Heermann KH. Studies on attachment and penetration of hepatitis B virus. *J Hepatology* 1993;(3 Supl.):S10-S14.
- 8.- Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product. Domain structure and RNaseH activity. *J Virol* 1990;64(2):613-620.
- 9.- Will H. HBcAg and HBeAg expression: how, where, why or why not?. *J Hepatology* 1991;13 (4 Supl.):S66-S67.
- 10.- Spandau DF, Lee C-H. Trans-Activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988;62(2):427-434.
- 11.- Twu J-S, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:2046-2050
- 12.- Seifer M, Hohne M, Schaefer S, Gerlich WH. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBX protein. *J Hepatology* 1991;13(4 Supl.):S61-S65.

- 13.-Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO* 1992;11(9):3413-3420.
- 14.-Mason A, Wick M, White H, Perrillo R. Hepatitis B virus replication in diverse cell types during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1993;18(4):781-789.
- 15.-Shafritz DA, Kew MC. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1981;1:1-8.
- 16.-Brunetto MR, Giarin M, Oliveri F, Saracco G, Barbera C, et al. "e" Antigen defective hepatitis B virus and course of chronic infection. *J Hepatology* 1991;13(Supl 4):S82-S86.
- 17.-Lee J-H, Paglieroni TG, Holland PV, Zeldis JB. Chronic hepatitis B virus infection in an Anti-HBc-nonreactive blood donor: variant virus or defective immune response?. *Hepatology* 1992;16(1):24-30.
- 18.-Raimondo G, Campo S, Smedile V, Rodino G, Sardo MA, et al. Hepatitis B virus variant, with a deletion in preS2 and two translational stop codons in the precore regions, in a patient with hepatocellular carcinoma. *J Hepatology* 1991;13(4 Supl.):S74-S77.
- 19.-Bréchet C, Kremsdorf D, Paterlini P, Thiers V. Hepatitis B virus DNA in HBsAg-negative patients. Molecular characterization and clinical implications. *J Hepatology* 1991;13(4 Supl.):S49-S55.
- 20.-Alberti A. Do the single mutations result in clinically significant changes in hepatitis B virus pathogenicity?. *J Hepatology* 1990;10:268-270.
- 21.-Bonino F, Brunetto MR. Hepatitis B virus heterogeneity, one of many factors influencing the severity of hepatitis B. *J Hepatology* 1993;18:5-8.
- 22.-Milich DR. Immune response to hepatitis B virus proteins; Relevance of the murine model. *Semin in Liver Dis* 1991;11(2):93-112.

- 23.-Thomas HC, Carman WF. The host immune response may be responsible for selection of envelope and precore/core variants of HBV. *J Hepatol* 1991;13(4 Supl.):S108-S113.
- 24.-Szmuness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: Evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.* 1978;24:40-69.
- 25.-Esumi M, Aritaka T, Arii M, Suzuki K, Tanikawa K, et al. Clonal origin of human hepatoma determined by integration of hepatitis B virus DNA. *Cancer Res* 1986;46:5767-5771.
- 26.-Tokino T, Fukushige S, Nakamura T, et al. Chromosomal translocation and inverted duplication associated with integrated hepatitis B virus in hepatocellular carcinomas. *J. of Virology* 1987;61(12):3848-3854.
- 27.-Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, Terré S, D'Errico A, et al. Polymerase Chain Reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers patients negative for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1990;323(2):80-85.
- 28.-Casselmann WH, Meyer M, Schlüter V, Koshy R, Hofschneider PH. The pleiotropic hepatitis B virus MHBs transactivator exerts its effect via ubiquitous transcription factors. Poster P2-238:27th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Agosto 1992, Viena, Austria. EN; *J Hepatol* 1992;16(2 Supl.):S77.
- 29.-Levrero M, Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, Chirillo P, et al. Characterization of the hepatitis B virus transactivators: a possible direct role of the virus in the development of hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 1993; (Supl. 3):34-36.
- 30.-Twu J-S, Lee CH-H, Lin P-M, Schloemer RH. Hepatitis B virus suppresses expression of human β -interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:252-256.
- 31.-Purcell RH, Miller RH. The nature of genetic variation among viruses. *J Hepatol* 1991; 13(Supl.4):S2-S5.

- 32.-Wen Y-M. Hepatitis B virus precore and core gene mutations in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma patients. *J Intern Med* 1993; 234:441-445.
- 33.-Lee H-S, Ulrich PP, Vyas GN. Mutations in the S-gene affecting the immunologic determinants of envelope protein of hepatitis B virus. *J Hepatol* 1991; 13(4 Supl.):S97-S101.
- 34.-Takayanagi M, Kakamu S, Ishikawa T, Higashi Y, Yoshioka K, Wakita T. Comparison of envelope and precore/core variants of Hepatitis B Virus (HBV) during chronic HBV infection. *Virology* 1993; 196: 138-145.
- 35.-Miska S, Günther S, Vassilev M, Meisel H, Pape G, Will H. Heterogeneity of hepatitis B virus C-gene sequences: Implications for amplification and sequencing. *J Hepatol* 1993; 18: 53-61.
- 36.-Feitelson M, Duan L-X, Horiike N, Clayton M. Hepatitis B X Open Reading Frame deletion mutants isolated from atypical hepatitis B virus infections. *J Hepatol* 1991;13 (4 supl.): S58-S60.
- 37.-Brown JL, Carman WF, Thomas HC. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatol* 1992; 15(1):144-148.
- 38.-Hamasaki K, Nakata K, Nagayama Y, Ohtsuru A, Daikoku M, Taniguchi K. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. *Hepatol* 1994;20(1):8-13.
- 39.-Tur-Kaspa R, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of liver disease severity. *Hepatol* 1992;16(6):1338-1342.
- 40.-Sanantonio T, Junng MA, Miska S, Pastore G, Pape GR, Will H. High prevalence and heterogeneity of HBV preC mutants in anti-HBe-positive carriers with chronic liver disease in southern Italy. *J Hepatol* 1991; 13(4 Supl.):S78-S81.
- 41.-Liang TJ, Hasegawa K, Munoz SJ, Shapiro CN, Yoffe B, et al. Hepatitis B virus precore mutation and fulminant hepatitis in the United States a polymerase chain

- reaction-based assay for the detection of specific mutation. *J Clin Inv* 1994; 93: 550-555.
- 42.-Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosuda K y Ohto M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Eng J Med* 1991;324(24):1699-1704.
- 43.-Carman WF, Fagan EA, Hadziyannis S, Karayiannis P, Tassopoulos Nc, et al. Association of a precore genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1991; 14(2):219-222.
- 44.-Carman W, Thomas H y Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-353.
- 45.-Uchida T, Aye TT, Becker SO, Harishima M, Shikata T, Konine F, et al. Detection of precore/core-mutant hepatitis B virus genome in patients with acute or fulminant hepatitis without serological markers for recent infection. *J Hepatology* 1993;18:369-372.
- 46.-Féray C,Gigou M,Samuel D,Bernuau J,Bismuth H,Bréchet C. Low prevalence of precore mutations in hepatitis B virus DNA in fulminant hepatitis type B in France. *J Hepatology* 1993; 18:119-122.
- 47.-Baumert TF y Liang TJ. Precore mutants revisited (comentario). *Hepatology* 1996; 23(1):184-186. Comentario sobre: *Ann Intern Med* 1995; 122:241-248.
- 48.-Gerken G,Goergen B,Teuber G,Meyer Zum Büschenfelde KH. High prevalence of HBe-minus variants in anti-HBe positive chronic carriers in Central Europe.Poster P1-24:27Th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Agosto 1992, Viena, Austria. EN: *J Hepatology* 1992;16(Supl.1):S24-S25.
- 49.-Clementi M, Manzin A, Paolucci S, Menzo S, Bagnarelli P, Carloni G, Bearzi I, et al. Hepatitis B virus preC mutants in hepatocellular carcinoma tissues. *Res Virol* 1993;144:297-301.
- 50.-Raimondo G, Meucci G, Rodino G, et al. Detection of wild type and "e minus" HBV populations in liver tissues of chronic healthy HBsAg carriers. Poster P1-23:27Th

- annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Agosto 1992, Viena, Austria. EN: *J Hepatol* 1992;16(1 Supl.):S24-S25.
- 51.-Lok AS, Akarca US y Greene S. Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. *Hepatol* 1995; 21(1):19-24.
- 52.-Bréchet C, Degos F, Lugassy C, et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative test for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1985;312(5):270-276.
- 53.-Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Lioriot MA, Giostra E, Boyer N, et al. Persistence of hepatitis B virus DNA demonstrated by polymerase chain reaction in serum and liver after loss of HBsAg induced by antiviral therapy. *Ann Rev Med* 1991;112(3):227-228.
- 54.-Lo Y-M D, Lo E F-S, Mehal WZ Sampietro M, Fiorelli G, Ronchi G, et al. Geographical variation in prevalence of hepatitis B virus DNA in HBsAg negative patients. *J Clin Pathol* 1993; 46: 304-308.
- 55.-Gerken G, Kremsdorf D, Petit MA, Manns M, Meyer zum Büchenfelde K-H, Brechet C, et al. Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during HBV chronic infection. *J Hepatol* 1991; 13(4 Supl.): S93-S96.
- 56.-Harrison TJ, Hopes EA, Oon CJ, Zanetti AR, Zuckerman AJ. Independent emergence of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *J Hepatol* 1991;13(4 Supl.):S105-S107.
- 57.-Hou J, Karayiannis P, Waters J, Luo K, Liang C, Thomas HC. A unique insertion in the S gene of surface antigen-negative hepatitis B virus chinese carriers. *Hepatol* 1995; 21(2):273-278.
- 58.-Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin in Liv Dis* 1991;11(2):73-83.

- 59.-Muñoz-Espinosa LE. Interpretación de los marcadores virales de las hepatitis. *Rev Gastroenterol Mex* 1994;59(2 Supl.):53-58.
- 60.-Blumberg BS, Alter HJ, Vinich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;191 (7):541-546.
- 61.-Dane DS, Cameron CH and Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970:695-698.
- 62.-Kryger P, Aldershvile J, Mathiensen LR, Nielsen JO, Copenhagen Hepatitis Acuta Programme. Acute type B hepatitis among HBsAg negative patients detected by anti-HBc IgM. *Hepatol* 1982;2(1):50-53.
- 63.-Tanaka Y, Esumi M, Shikata T. Persistence of hepatitis B virus DNA after serological clearance of hepatitis B virus. *Liver* 1990;10:6-10.
- 64.-Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle R, Verme G, Gerin J. Hepatitis B virus DNA in the Sera of HBsAg carriers: A marker of active hepatitis B virus replication in the liver. *Hepatol* 1981;1(5):386-391.
- 65.-Scotto J, Hadchouel M, Hery C, Yuart J, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: Comparison with results for other viral markers. *Hepatol* 1983;3(3):279-284.
- 66.-Lieberman HM, LaBrecque DR, Kew MC, Hadziyannis SJ, Shafritz DA. Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridisation test: Comparison to HBeAg/Anti-HBe status in HBsAg carriers. *Hepatol* 1983;3(3):285-291.
- 67.-Karayiannis P, Fowler MJF, Lok ASF, Greenfield C, Mojardino J, Thomas HC. Detection of serum HBV-DNA by molecular hybridisation. Correlation with HBeAg/Anti-HBe status, racial origin, liver histology and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1985;1:99-106.

- 68.-Diegutis PS, Burnett L, Nightingale BN, Lowe SB, Giuney RC, et al. Relationship between hepatitis B virus DNA in blood and serological markers of hepatitis B infection. *Med J Aust* 1986;144:351-355.
- 69.-Nalpas B, Berthelot P, Thiers V, Duhamel G, Courouce AM, et al. Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers. A study of 146 chronic alcoholics. *J Hepatol* 1985;1:89-97.
- 70.-Weller IVD., Fowler MJF, Monjardino J, Thomas HC. The detection of HBV-DNA in serum by molecular hybridisation: A more sensitive method for the detection of complete HBV particles. *J Med Virol* 1982;9:273-280.
- 71.-Kuhns MC, McNamara AL, Perrillo RP, Cabal CM, Campbell CR. Quantitation of hepatitis B viral DNA by solution hybridization: Comparison with DNA polymerase and hepatitis B e Antigen during antiviral therapy. *J Med Virol* 1989;27:274-281.
- 72.-Bréchet C, Hadchouel M, Scotto J, Fonck SB, Potet F, et al. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and- negative liver diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981;78(6):3906-3910.
- 73.-Figus A, Blum HE, Vyas GN, DeVirgilis S, Cao A, et al. Hepatitis B viral nucleotide sequences in non-A, non-B or hepatitis B virus related chronic liver disease. *Hepatol* 1984, 4(3):364-368.
- 74.-Berninger M, Hammer M, Hoyer B, Gerin JL. An assay for the detection of the DNA genome of hepatitis B virus in serum. *Journal of Medical Virology* 1982;9:57-68.
- 75.-Pontisso P, Poon MC, Tiollais P, Bréchet C. Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *Britis Med J* 1984;288:1563-1566.
- 76.-Monjardino J, Velosa J, Thomas HC, Carneiro de Moura M. Serum HBV DNA detected by PCR in dot blot negative HBV chronic carriers with active liver disease. *J Hepatol* 1991; 13: 44-48.

- 77.-Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using de polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol* 1989;27(9):1930-1933.
- 78.-Bréchet C. Polymerase chain reaction for the diagnosis of hepatitis B and C viral hepatitis. *J Hepatol* 1993;17(3 Supl.):S35-S41.
- 79.-Birkenmeyer LG, Mushahwar IK. DNA probe amplification methods. *J Virol Meth* 1991;35:117-126.
- 80.-Norder H, Hammas B, Larsen J, et al. Detection of HBV DNA by PCR in serum from an HBsAg negative blood donor implicated in cases of post-transfusion hepatitis B. *Arch Virol* 1992; (Supl. 4):116-118.
- 81.-Yap EPH, Lo Y-MD, Flemming KA, McGee J. O'D. False-positives and contamination in PCR. En: Griffin HG, Griffin AM, editores. *PCR TECHNOLOGY Current Innovations*. Boca Raton: CRC Press, 1994:249-258.
- 82.-Erlich HA, Gefland D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; 252:1643-1651.
- 83.-Manzin A, Paolucci S, Lampertico P, Menzo S, Rumi MG, Colombo M, Clementi M. Direct detection of HBV preC mutants in heterogeneous viral populations by a modified DNA sequencing method. *Res Virol* 1993;144:303-306.
- 84.-Gramegna M, Lampertico P, Lobbiani A, Colucci G. Detection of the hepatitis B virus major pre-core mutation by amplification refractory mutation system technique. *Res. Virol.* 1993;144:307-309.
- 85.-Lo E S-F, Lo Y-M, Tse CH y Fleming KA. Detection of hepatitis B precore mutant by allele specific polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1992; 45: 689-692.
- 86.-Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed, 3 Vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

- 87.-Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman HM, Rutter WJ, et al. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1979;230:815-819.
- 88.-Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P y Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus gene (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979;281:646-650.
- 89.-Krugman S, Gocke DJ. *Hepatitis viral*. Primera edición. México: Interamericana, 1979.
- 90.-Wang J, Wang T-H, Sheu J-C, Shih L-N, Lin J-T, Chen D-S. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. *JID* 1991;163:397-399.
- 91.-Liang TJ, Blum HE y Wands JR. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B virus serological markers. *Hepatology* 1990; 12(2): 204-212.
- 92.-Baischer W, Brichta A, Pfeffel, Hajji M, Leither H, Lesch Q, Müller Ch, et al. Infection with hepatitis B or C virus of peripheral blood mononuclear cells in serologically negative chronic alcoholic patients. *J Hepatology* 1995; 23:481.
- 93.-Ackrill AM, Naumov NV, Eddleston A, Williams R. Comparison of pre-core/core hepatitis B virus region in liver tissue and serum from patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatology* 1992;16:224-227.
- 94.-Laskus T, Persing DH, Nowicki MJ, Mosley JW, Rakela J. Nucleotide sequence analysis of the precore region in patients with fulminant hepatitis B in the United States. *Gastroenterology* 1993;105:1173-1178.
- 95.-Li J-S, Tong SP, Wen Y-M, Zhang Q y Trépo Ch. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 1993;67(9):5402-5410.

- 96.-López JL, Telenta PF, Palacios J, Alonso AG, Lemberg A y Campos R. Detection and Characterization of pre-core mutants of hepatitis B virus (HBV) in chronically infected patients. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1995;25:85-90.
- 97.-Zhang Y-Y, Hansson BG, Kuo LS, Widell A y Nordenfelt E. Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg. *Hepatology* 1993,17(4):538-544.
- 98.-Ehata T, Omata M, Chuang W-L, Yokosuka O, Ho Y, Hosada K, Ohtho M, et al. Mutations in core nucleotide sequence of Hepatitis B virus correlate with fulminant and severe hepatitis. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:1206-1213.

APENDICES

APENDICE A

PREVALENCIA DEL DNA-VHB EN SUERO EN HEPATOPATIAS CRONICAS

APENDICE A

PREVALENCIA DEL DNA-VHB EN SUERO EN HEPATOPATIAS CRONICAS

Autores	Ags positivo			Ags negativo	Método	País
	Age +	Sist. e -/-	Anti-Age +			
Bonino 81 ⁶⁴	12/12 (100)	0/1	9/17(52.9)		Spot blot	Italia
Weller 82 ⁷⁰	36/36(100)	1/1(100)	1/23(4.3)	0/4	Spot blot	UK
Lieberman 83 ⁶⁶	28/28 (100)	1/1(100)	16/32(50)	0/23	Dot blot	Grecia
Scotto 83 ⁶⁵	72/80(90)	9/19(47.3)	7/13(53.9)	6/112(5.3)&	Spot blot	Francia
Karayiannis 85 ⁶⁷	109/120 (90.8)	4/19(21)	26/121(21.4) SEup(20.8) MOte(23) NEup(5.5) Africa(13.3)	1/151(0.6)	Spot blot	Varios
Nalpas 85 ⁶⁹	3/3(100)			9/101(8.9) [^] 5/41(12.1)	Dot blot	Francia §
Diegutis 86 ⁶⁸	101/133(76)	0/28	7/148(4.7)	3/101(2.9) [^] 0/136	Dot blot	Australia
Tanaka 90 ⁶³				1/16(6.2)	Southern blot	Japón ¶
Paterlini 90 ²⁷				Fran5/10(50) Africa6/8(75) ap1/1(100) Ital5/9(55.5)	PCR	Varios ¶
Wang 91 ⁹⁰				2/34(5.8) [^] 7/172(4)	PCR	China £
Mojardino 91 ⁷⁶	14/16(87.5)			27/33(81.8)	PCR-SB	Portugal
Lo 93 ⁵⁴				Ital2/18(11.1) HngK2/29 (6.8) UK0/70	PCR-Nested	Varios ¶
Baischer 95 ⁹²				3/37(8.1)	PCR	Austria §¥
Zhang Y-Y 93 ⁹⁷	91/91(100)	65/102 (64)	49/85(58)	1/13(8) [^] 34/132(26)	PCR-DB	China
Déctor 97	20/20(100)	0/7	2/9(22.2)	2/41(4.8) [^] 2/25(8)	PCR	México

Los valores en cada renglón están dados en relación al número de pacientes positivos por cada perfil serológico y los porcentajes están entre paréntesis. & 1/6 sin marcadores, £ donadores, ¥ en células mononucleares de sangre, ^ sin marcadores, § Alcoholicos, ¶ biopsias hepáticas.

Abreviaturas: SB= Southern blot, DB= Dot blot, Ital=Italia, UK= Reino Unido de la Gran Bretaña, HngK=HongKong, SEup=sur de Europa, NEup=norte de Europa, MOte=medio oriente, Ja=Japón, Fran=Francia.

APENDICE B

PREVALENCIA DEL VHB MUTANTE PRECORE EN HEPATOPATIAS CRONICAS

APENDICE B

PREVALENCIA DEL MUTANTE PRECORE EN HEPATOPATIAS CRONICAS

Autores	Ags positivo			Ags negativo	Método	País
	Age +	Sist. e +/-	Anti-Age +			
Sanantonio ⁹ 140			36/42 31/36mut (86.1) 2/36mez(5.5) 3/36otrasmu		PCR- Sec	Sur Italia
Brunetto 9116	22/145 Tol3/11mz(27.2) Elim3/5mut(60) Lat1/6mz(16.6)				PCR	Italia
Ackrill 92 ⁹³	0/4		3/5mut(60) 2/5mezcla(40)		PCR	UK
Gerken92 ⁴⁸			26/40mut(65) 7/40otrasmut		PCR	Alemania
TurKaspa92 39	0/4	12/12(100) mut β			PCR	Israel
Laskus 93 ⁹⁴	0/16	0/12	2/11mut(18)		PCR	EUA ^α
Manzin 93 ⁸³	1/18mut(5.5) 9/18mez(50)		12/18mut(66.6) 1/18mz(55.5)		PCR- Sec	Italia
Clementi 93 ⁴⁹	10/17mCys 4 mut (23.5)				PCR	Italia
Ehata 93 ⁹⁸	0/2 ^α , 0/1	3/3 ^α	9/9(100)		PCR	China
Feray 93 ⁴⁶	0/2	0/1	1/7(14.2)†		PCR	Francia ^α
Uchida 93 ⁴⁹				2/7(28.5 ^α) 5/20(25)	PCR	Japón
Hamasaki 94 ³⁸	8/27mut(29.6)		14/18mut (77.7)		PCR- RFLPs	Japón
Lok 95 ⁵¹	58/201 43otrasmut(21) 20mut(10) 13mez(6.4)				PCR	China
Baumert 96 ⁴⁷		36/37(97.2) ¥			PCR	Japón ^α
Déctor 97	0/24		0/2	0/4	PCR- RFLPs	México

Los valores en cada renglón están dados en relación al número de pacientes positivos al mutante precore (a menos que se indique lo contrario) por cada paciente VHB-DNA positivo del perfil serológico dado y los porcentajes están entre paréntesis. β 3 Marruecos, 3 Irán, 2 EsteEuropa, 1 Etiopía, 1 Turquía, 1 Israel, 1 Libia. α hepatitis fulminante, † en hígado, ¥ deducida.

Abreviaturas: mut = mutante precore, mez ó mz = mezcla de mutante con silvestre, mCys = mutante de cisteína en posición 15 de la región precore, Sec = secuenciación de ácidos nucleicos, Tol = fase de tolerancia, Elim = fase de eliminación, Lat = fase de latencia.

APENDICE C

TABLAS DE LOS GRUPOS DE PACIENTES DE ACUERDO A LOS MARCADORES SEROLOGICOS

TABLA 1
GRUPO DE PACIENTES CON REPLICACION ALTA DEL VHB

#	Fecha	Diagnóstico	Ags	Anti core total	Anti Ags	Age	Anti Age	VHC/VHD
1	9-VII-92	Portador VHB	+	+		+	-	-/
2	9-VI-89	Cáncer	+	+		+	-	-/
3	20-II-92	NI	+	+		+	-	-/
4	28-I-92	Cirrosis	+	+		+	-	-/
5	15-XI-88	Hepatopatía crónica	+	+		+	-	-/
6	12-V-92	Hepatopatía crónica	+	+		+	-	-/
7	10-XI-92	NI	+	+		+	-	-/
8	25-III-92	Cirrosis hepática	+	+		+	-	-/
*	27-VII-94	Cirrosis hepática	+	+		+	-	+/
9	17-IV-89	31X88Hemodiálisis	+	+		+	-	-/
*	17-II-92	NI	+	+		+	-	+/-
10	25-V-94	NI	+	+		+	+	-/
*	14-XI-88	Hemodiálisis	+	+		+	-	+/
11	21-VII-93	NI	+	+		+	-	-/
12	26-X-92	Cirrosis	+	+		+	-	-/
13	14-XI-88	Hemodiálisis	+	+		+	-	-/
14	14-IV-89	IRC	+	+		+	-	-/
15	8-XII-92	NI	+	+		+	-	-/
16	25-VIII-94	Cirrosis Hepática	+	+		+		-/
17	12-XII-94	Hepatopatía Crónica	+	+		+	-	-/
18	5-I-95	NI	+	+		+	-	-/
19	9-II-95	NI	+	+		+	-	-/
20	24-III-95	NI	+	+		+	-	-/

* Pacientes incluidos adicionalmente en los ensayos de PCR y en la búsqueda del VHB mutante "precore"
Tales pacientes no fueron incluidos en la presente tesis.

TABLA 2
PACIENTES CON REPLICACION BAJA DEL VHB

#	Fecha	Diagnóstico	Ags	Anti core total	Anti Ags	Age	Anti Age	VHC/VHD
1	18-II-85	Hepatocarcinoma	+	+	-	-	+	-/-
2	29-VII-88	Cirrosis hepática	+	+		-	+	-/-
3	15-VIII-88	Hepatitis	+	+		-	+	-
4	19-VIII-88	Tumoración epigástrica	+	+		-	+	-/-
5	25-X-88	Portador VHB	+	+		-	+	-/
6	21-VI-89	Portador VHB	+	+		-	+	-/
7	7-VI-90	Portador VHB	+	+		-	-	-/-
8	18-VII-91	Hepatopatía crónica	+	+		-	-	-/
9	14-X-92	NI	+	+		-	+	-/
10	1-II-94	NI	+	+		-	+	-/
11	4-II-94	Hepatocarcinoma	+	+		-	+	-/
12	2-V-94	Tumor hepático	+	+	-	-	-	-/
13	27-IV-95	Hepatocarcinoma	+	+		-	-	-/

TABLA 3
PACIENTES CON MARCADORES SEROLOGICOS ATIPICOS Y DE PROTECCION
CONTRA EL VHB.

#	Fecha	Diagnóstico	Ags	Anti core total	Anti Ags	Age	Anti Age	VHC/VHD
1	18-III-92	Cirrosis	-	+	-		-	-
2	29-VI-92	Hepatopatía crónica	-	+	-		-	-
3	1-IX-92	Portador VHB	+	-	-	-	-	-
4	24-XI-92	Alcohólica	+	-		-	-	-
5	22-X-93	Hepatopatía crónica	-	+	+	-	+	-
6	3-I-94	Hepatopatía DOAD	-	+	+	-	+	-
7	3-I-94	cirrosis hepática	-	+	-	-	-	-
8	4-I-94	Síndrome nefrótico	-	+	+	-	-	-
9	18-I-94	Cirrosis, alcoholismo	-	+	-	-	-	-
10	4-II-94	Cirrosis hepática	-	+	-	-	-	-
11	15-II-94	NI	-	+	-	-	-	-
12	28-II-94	Hepatopatía Cron. Alcoh	-	+	-	-	-	-
13	*19-IV-94	NI	-	+	-	-	-	-
14	27-IV-94	Cirrosis hepática	-	+	+	-	-	-
15	*18-V-94	Cirrosis hepática	-	+	-	-	-	-
16	18-VII-94	NI	-	+	+	-	+	-
17	18-VII-94	NI	-	+	-	-	+	-
18	11-VIII-94	Cirrosis, alcoholismo	-	+	+			-
18	23-VIII-94	Hepatopatía crónica	-	+	-			-
20	26-IX-94	Hepatopatía crónica	+	-		-		-
21	6-I-95	Hepatopatía crónica	-	+	-			-
22	7-II-95	NI	-	+	+			-
23	15-II-95	Hepatopatía crónica	-	+	+			-
24	1-III-95	Metastasis hepática	-	+	-			-
25	6-III-95	NI	-	+	-			-
26	9-III-95	NI	-	+	+			-
27	16-V-95	NI	-	+	-			-
28	6-VI-95	NI	-	+	-			-

* Positivos a la PCR

TABLA 4
GRUPO DE PACIENTES CON MARCADORES SEROLOGICOS NEGATIVOS A LA
INFECCION CON EL VHB.

#	Fecha	Diagnóstico	Ags	Anti core total	Anti Ags P	Age	Anti Age	VHC/VHD
1	19-II-92	Hepatopatía crónica	-	-	-	-	-	-/
2	25-X-93	Hepatopatía crónica	-	-	-	-	-	-/
3	7-IX-93	Hepatopatía crónica activa	-	-	-	-	-	-/
4	14-XII-93	Hepatopatía crónica	-	-	-	-	-	-/
5	4-X-93	Hepatopatía crónica	-	-	-	-	-	-/
6	12-I-94	Cirrosis hepática	-	-	-	-	-	-/
7	1-I-93	Probable hepatitis viral	-	-	-	-	-	-/
8	28-X-92	Hepatopatía crónica	-	-	-	-	-	-/
9	12-VIII-93	Hepatopatía crónica	-	-	-	-	-	-/
10	16-VIII-93	Hepatopatía crónica	-	-	-	-	-	-/
11	9-XI-92	Alcoholismo	-	-	-	-	-	-/
12	18-X-93	Hepatopatía crónica	-	-	-	-	-	-/
13	27-X-93	Cirrosis hepática	-	-	-	-	-	-/
14	11-IV-94	Hepatop.Crón. Alcoh	-	-	-	-	-	-/
15	30-XI-92	Cirrosis, alcoholismo	-	-	-	-	-	-/
16	15-II-94	Cirrosis hepática	-	-	-	-	-	-/
17	16-VI-94	NI	-	-	-	-	-	-/
18	I-IX-94	Cirrosis Hepática	-	-	-	-	-	-/
19	3-VI-94	Probable HCC	-	-	-	-	-	-/
20	11-XI-94	Cirrosis	-	-	-	-	-	-/
21	22-II-95	NI	-	-	-	-	-	-/
22	1-III-95	NI	-	-	-	-	-	-/
23	2-III-95	NI	-	-	-	-	-	-/
24	2-III-95	NI	-	-	-	-	-	-/
25	2-III-95	NI	-	-	-	-	-	-/
26	29-VIII-95	NI	-	-	-	-	-	-/
27	13-VII-95	NI	-	-	-	-	-	-/
28	14-VII-95	NI	-	-	-	-	-	-/
29	14-VII-95	Cirrosis por alcohol	-	-	-	-	-	-/
30	21-VII-95	NI	-	-	-	-	-	-/
31	4-VIII-95	NI	-	-	-	-	-	-/
32	11-VIII-95	Anterior Ags+vo. Vacuna	-	-	+	-	-	-/
33	14-VIII-95	NI	-	-	-	-	-	-/
34	14-VIII-95	NI	-	-	-	-	-	-/

35	17-VIII-95	NI	-	-	-			-/
36	17-VIII-95	NI	-	-	-			-/
37	22-VIII-95	NI	-	-	-			-/
38	25-VIII-95	NI	-	-	-			-/
39	30-VIII-95	NI	-	-	-			-/
40	7-IX-95	NI	-	-	-			-/
41	12-IX-95	Probable hepatitis B	-	-				-/

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Miguel Angel Déctor Carrillo

**Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Tesis: 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**

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Biografía:

Datos personales: Nacimiento en Rio Blanco, Veracruz el 23 de Agosto de 1968, hijo de Isaias Déctor López y Ma. Guadalupe Florentina Carrillo Arellano.

Educación: Licenciatura en Biología, especialidad en Biología Biomédica por la Universidad Veracruzana, en la Cd. de Xalapa de Enriquez, Veracruz. Titulación por promedio (9.0) por haber presentado todas las materias en caracter ordinario. Ceremonia de titulación el 5 de abril de 1991.

Experiencia profesional: Personal Profesional de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1993, asignado a la Unidad de Hígado del Servicio de Gastroenterología, Departamento de Medicina Interna. Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" y Facultad de Medicina.

