



UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD, BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Análisis de la Variabilidad genética del gen X del virus de la hepatitis B genotipo H

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Alicia Ruíz López

Asesor interno: Dra. Diana Elinos Calderón.

Asesor externo: Dr. en Ciencias Ma. Rosalía Lira.



Tabla de contenido

| | |
|-------------------------------|----|
| Agradecimientos | 2 |
| 1. Resumen | 3 |
| 2. Introducción | 4 |
| 3. Justificación | 18 |
| 4. Hipótesis | 19 |
| 5. Objetivos | 19 |
| 5. Metodología | 20 |
| 6. Resultados | 30 |
| 7. Discusión | 35 |
| 8. Conclusión | 38 |
| 8. Bibliografía | 40 |
| Anexos..... | 45 |

Agradecimientos

Agradezco a la UNADM por darme una nueva oportunidad para regresar al camino de la ciencia.

A la Dra. Ma. Rosalía Lira, por sus enseñanzas y preparación en este proyecto de investigación.

Al personal del Laboratorio de Virología de la UIMEIP del Hospital de Pediatría, CMN siglo XXI, por las facilidades, equipo e instalaciones que hicieron posible la realización de este proyecto.



1. Resumen

El virus de la Hepatitis B (HBV) es el causante de enfermedades hepáticas que van de la Hepatitis aguda a la crónica y hasta el Hepatocarcinoma en humanos. Pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, se constituye por una partícula de 42 nm de diámetro; presenta una cápside (envoltura lipoproteíca exterior) y nucleocápside interior que envuelve el ADN del virus.

3

El genoma del virus HBV es circular de ADN doble cadena con cuatro marcos de lectura abierta – ORF- (S, C, P y X), los cuales se encuentran traslapados. Cada ORF codifica para proteínas estructurales y funcionales biológicamente para el virus. En el ORF X, el gen x codifica la proteína HBx, la cual se asocia al desarrollo de la Hepatitis crónica y Hepatocarcinoma, por su actividad transactivadora.

La variabilidad genética del gen X incluye variaciones genotípicas específicas y mutaciones emergentes durante la infección crónica. Las mutaciones más frecuentes se presentan en la región basal del core las cuales afectan a la región X debido a su traslapamiento, las mutaciones que presenta esta región son muy comunes en los análisis de secuencia de los pacientes con hepatitis crónica, aunque aún se desconoce de qué manera estimulan la evolución de la enfermedad.

Dentro de las metodologías de diagnóstico para la hepatitis B aguda y crónica, se emplean los marcadores moleculares y la determinación de ADN vírico. La técnica *in vitro* más sensible y directas para amplificar las secuencias específicas del genoma, es la PCR, la cual puede ser de punto final o PCR en tiempo real y las cuales ayudan a determinar la cantidad de DNA en suero de pacientes.

En México, los casos de hepatitis B crónica son escasos, sin embargo, se ha reportado una alta incidencia en poblaciones indígenas, considerando



entonces que las técnicas de diagnóstico pueden no ser específicas para el genotipo H endémico de México y para HBV, lo que estaría enmascarando el problema.

Este proyecto terminal pretende llevar a cabo la amplificación y purificación del gen x de HBV en pacientes mexicanos con Hepatitis B crónica, como preliminar para en un futuro llevar a cabo la secuenciación del gen X de HBV y determinar si se encuentran mutaciones que puedan relacionarse con la evolución de la enfermedad en pacientes mexicanos.

Para la amplificación del ADN se utilizará la PCR de punto final semianidada; en la visualización de la separación de los fragmentos obtenidos de la PCR se usará una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente se purificarán estos fragmentos con un kit comercial y se cuantificará el ADN vírico.

El proceso permitirá establecer la PCR como técnica para la amplificación de la región X en el genotipo H de pacientes mexicanos con Hepatitis crónica y permitirá posteriormente obtener la secuenciación y el análisis de las mutaciones en esta región, que permitan establecer un diagnóstico más específico para esta enfermedad en México.

2. Introducción

El virus de la Hepatitis B (HBV), fue descubierto por Baruch Blumberg en 1963, denominándolo antígeno australiano “Au”. Posteriormente se demostró la asociación de este antígeno con la hepatitis B y se desarrollaron test específicos para la identificación de la Infección por el HBV (Prince & et. al, 1982).

En 1970 se detecta el virión completo de la Hepatitis B, partícula de 42 nm de doble envuelta, con una cubierta externa y un core interno, denominada partícula de Dane (Dane et al, 1970).

El virus de la Hepatitis B es un virus hepatotrópico que afecta solo al ser humano, se encuentra dentro de la familia *Hepadnaviridae*, genero *Orthohepadnavirus*, junto con los virus de la hepatitis de la marmota americana, de hepatitis de la ardilla y de la hepatitis del pato.

El virus del HBV está constituido por una partícula esférica de 42 nm de diámetro (partícula de Dane), rodeada de una envoltura lipoproteica de 7 nm de espesor, conteniendo las proteínas virales de superficie (HBsAg). En el interior del virión se encuentra la nucleocápside icosaédrica, compuesta por el antígeno core (HBcAg), el cual rodea al ADN genómico que en el extremo 5' de la cadena negativa lleva unida covalentemente a la polimerasa viral (**figura 1**) (Venegas et al, 2010).

5

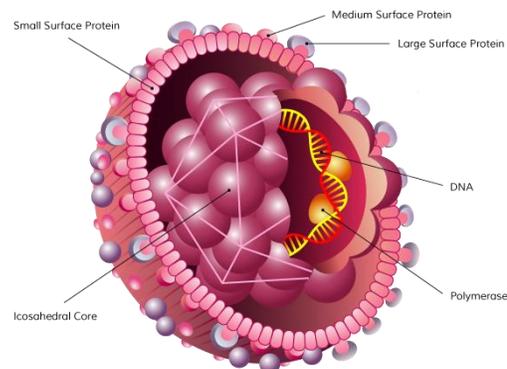


Fig.1. Partícula de Dane (virus completo); se aprecia la cubierta lipoproteica que recubre la nucleocápside icosaédrica que contiene el ADN viral y fuertemente unida la polimerasa.

Tomado de <https://contravir.com/crv431/>

El genoma viral del HBV, es un ADN circular de pequeño tamaño, parcialmente de doble cadena: una cadena larga, de unas 3200 bases (cadena negativa) y una cadena corta (positiva) de 1700 a 2800 bases. El genoma se mantiene en conformación circular a pesar de no estar cerrado covalentemente (ADNrc) debido a una pequeña región cohesiva que solapa la región situada entre los extremos 5' de ambas cadenas (Bock & et. al, 2007).



Estas regiones de cohesión, se denominan DR1 para la cadena negativa y DR2 para la cadena positiva, estas secuencias positivas, se encuentran implicadas en la replicación e integración del genoma del virus en los hepatocitos. Además, en los ORF C y P se encuentran dos regiones incrementadoras o enhancers de la transcripción.

En la cadena negativa (-) se han identificado 4 marcos de lectura abiertos de transcripción (ORF), S, C, P Y X; conservados entre los diferentes subtipos del HBV, que representan los genes codificantes. El virus de hepatitis B incrementa su capacidad codificante al existir un solapamiento entre los distintos ORF. El marco de lectura S codifica las 3 proteínas virales de superficie: HBsAg: L (large, LHBsAg), M (middle, MHBsAg) y S (small, SHBsAg), las que comparten idénticos extremos C terminales en sus secuencias primarias. La proteína S es la más abundante, en ella se encuentra el denominado *loop* antigénico “a”, frente al que se produce la respuesta primaria de anticuerpos neutralizantes anti-HBs. La proteína preS1 parece reconocer los receptores de la superficie celular, colaborando con la especificidad del virus por un huésped determinado

El gen C (o core) incluye las regiones precore y core. Además del promotor basal del core (PBC), cuya secuencia es suficiente para iniciar la transcripción, también contiene secuencias que actúan como lugares de unión de los factores incrementadores de la transcripción. El ORF C codifica para la proteína core o HBcAg, unidad estructural de la cápside y también para el HBeAg, dependiendo de la región en donde se inicia la traducción (Rodríguez-Frías et al, 2008).

La polimerasa viral se codifica en el marco de lectura P y esta funcionalmente dividida en 3 regiones: en el extremo aminoterminal se encuentra el dominio proteína terminal (PT), el cual está involucrado en la encapsidación e iniciación de la síntesis de la cadena negativa de ADN; en medio de la proteína, el dominio transcriptasa reversa (TR), que cataliza la síntesis del genoma viral; y en el extremo carboxiterminal, el dominio de RNAsas H (RH), que degrada el ARN pregenómico en el intermediario híbrido ARN/ADN y facilita la replicación del genoma viral (Liang, 2009).

El gen X, de unas 0.7 kb, fue el último ORF en ser identificado y se le asignó la letra X debido a que la proteína que codificaba no presentaba homología con ninguna otra proteína viral o celular y su función se desconocía (Feitelson & et al, 1997).

El gen X del virus HBV, codifica una proteína pequeña (proteína X o HBx) de 154 aminoácidos, que tiene un peso molecular aproximado de 17.5 KDa (**figura 2**).

7

Figura 2.

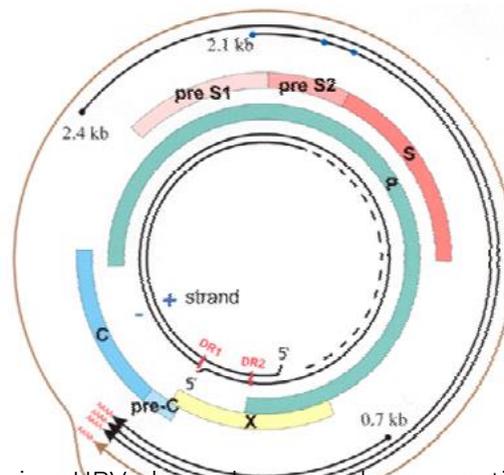


Fig. 2 Genoma del virus HBV, dos cadenas una larga negativa, compuesta por cuatro marcos de lectura abierta (ORF): gen S, gen P, gen C y Gen X, y cadena corta positiva. Así como dos regiones de cohesión DR1 y DR2. Tomado de <http://www.laboratoriocentralmm.com.br/manual-de-exame-h/>

Proteína X

Debido a la falta de resultados de la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear, se sabe poco de la estructura tridimensional de HBx. Los análisis comparativos de las secuencias del gen x de HBV de hepadnavirus de mamíferos de diferentes especies, revelaron áreas de alta conservación, incluidos los supuestos dominios helicoidales situados en la región amino y carboxilo terminales y un motivo potencial de espiral enrollada (Colgove et al., 1989; Kodam et al., 1985).



Dentro de sus múltiples funciones de la proteína HBx en el virus HBV, se ha demostrado que los aminoácidos 52 a 148 son esenciales para la actividad biológica de la proteína.

Además, la eliminación del fragmento amino-terminal de 1-50 aminoácidos aumenta las funciones transcripcionales de HBx, lo que sugiere puede ser un elemento regulador negativo. Adicional a estas funciones, se atribuye la transducción intracelular de señales, reparación del ADN e inhibición de la degradación proteica (Kumar y Sakar, 2004) (**figura 3**).

Se ha establecido que esta proteína es necesaria para una infección productiva por HBV *in vivo* y está asociada con las patogénesis de las enfermedades relacionadas con el HBV, especialmente en la aparición de carcinoma hepatocelular (HCC) en pacientes crónicos (Chen & et al, 2000; Koike, 2009).

Esta asociación se da, según investigaciones realizadas en tumores del HCC analizados, la mayoría de los genes del HBV en el HCC, no se expresan, sin embargo, HBx o las versiones truncadas de esta proteína pueden seguir expresándose, por lo que es posible que esta proteína tenga otra función, aparte de la sensibilización de células frente a estímulos mutagénico, en el desarrollo de HCC o la subsiguiente supervivencia y proliferación de células tumorales (Tu & et. al., 2001).

Durante la infección viral aguda, la expresión de HBx es baja y se relaciona directamente con el nivel de replicación, sin embargo, al evolucionar hacia Hepatitis crónica, cirrosis y Hepatocarcinoma el ADN viral se integra en el genoma del huésped y la expresión la proteína X se desregula, convirtiéndose en la única proteína viral detectada en pacientes con carcinoma hepatocelular (Feitelson & et al, 1997).

Figura 3.

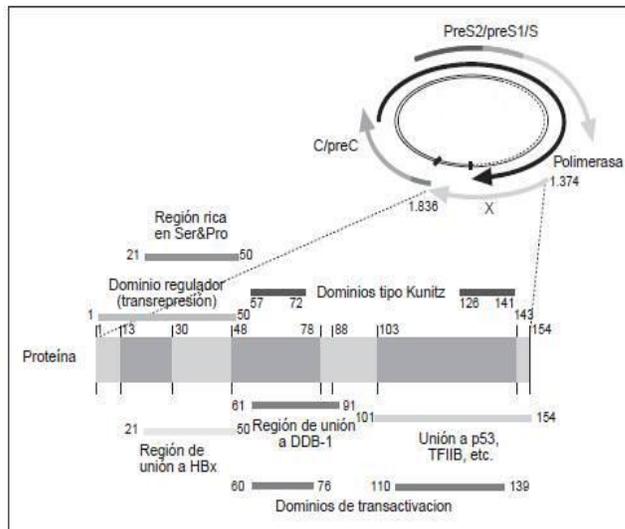


Fig. 3 Estructura de la proteína HBV-X. La capacidad activadora de la transcripción se encuentra en el extremo terminal C de la proteína (aa 110-139) y entre los aminoácidos 60-76. Estas dos regiones son también responsables de la interacción de HBV-X con numerosas proteínas celulares. Además, posee la capacidad de interactuar consigo misma, a través de los aminoácidos 21-50. Tomado de Lara-Pezzi & et. al, 2003.

9

Replicación:

Una de las características principales de la familia *Hepadnaviridae*, es el proceso en el cual llevan a cabo la síntesis de su ADN en el núcleo de la célula, mediada por una transcripción reversa en la cual interviene el ARN viral, conocido como ARN intermediario (Ganem et al, 2004).

La infección de la célula hepática se inicia con la interacción del HBV con un receptor, todavía desconocido, de la membrana del hepatocito. La interacción depende del preS1, una vez adherido el virus HBV, se introduce por endocitosis, al entrar libera la nucleocápside y se transporta desde el citoplasma al núcleo, conducida por la señal de localización nuclear presente en la proteína del core (Stoeckl et al, 2006).

Ya en el núcleo, al ADN viral, se modifica a una forma circular cerrada covalentemente (ADN_{ccc}), la cual sirve como molde para la transcripción de los ARN virales, por medio de la polimerasa viral y enzimas de la célula



huésped. Del núcleo los ARN se transportan al citoplasma en donde funcionan como ARNm traduciendo en las diferentes proteínas que requiere el virus para las síntesis de sus estructuras.

Sin embargo, uno de los ARN, el ARN core, además funciona como ARN pregenómico y sirve como molde para la retrotranscripción por medio de la retrotranscriptasa de la proteína P, sintetizándose el genoma del ADN parcialmente de doble cadena.

También el ARN pregenómico interactúa con las proteínas C y P para formar las cápsides, en las cuales se lleva a cabo la retrotranscripción, la síntesis de la cadena negativa y posteriormente la cadena positiva.

La nucleocápside que contienen el nuevo ADN viral sintetizado, pueden ser conducidas de nuevo al núcleo en un proceso de realimentación que aumenta el reservorio de ADNccc nuclear o bien se recubren en el retículo Endoplásmico con una envuelta lipídico-proteína que contiene el HBsAg, son transportadas al aparato de Golgi y de allí son liberadas al espacio extracelular, en forma de nuevos viriones (Mangus & et. al, 2003) (**figura 4**).

Figura 4.

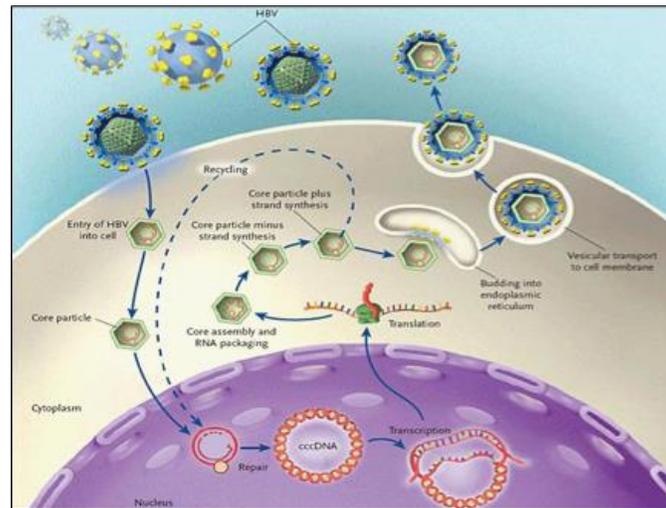


Fig. 4 Ciclo infeccioso y replicativo del HBV. Interacción del virus HBV con el hepatocito, su Integración en el núcleo y el proceso de replicación que lleva a cabo en la célula huésped, hasta su conversión en virión. Tomado de Ganem & et. al, 2004.

Genotipo

La clasificación genética de HBV, basada en el análisis y comparación de secuencias de genomas completos, ha identificado 8 genotipos que van desde la A hasta la H. Sus diferencias se dan sobre una divergencia intergrupo de al menos 8% en la secuencia nucleotídica completa.

Análisis filogenéticos muestran que la mayoría de estos genotipos, pueden ser subdivididos en subgenotipos, los cuales se diferencian entre sí en no más de un 4% en sus secuencias completas, lo que muestra la alta variabilidad de este agente viral (Schaefer, 2007) (**Figura 5**).



Figura 5.

| GENOTIPO | SUBTIPO | DISTRIBUCION GEOGRAFICA PREDOMINANTE |
|----------|--|--|
| A | adw2, ayw1 | Noroeste de Europa, Norteamérica y África Central |
| B | adw2, ayw1 | Sudeste de Asia, China, Japón |
| C | ayr, adr ^{q+} adr ^{q-} adw2 | Sudeste de Asia, China y Japón |
| D | ayw2, ayw3 | Sur Europa, Oriente Medio e India |
| E | Ayw4 | África |
| F | Adw4q | Nativos Americanos, Polinesia, América Central y Sur |
| G | Adw2 | Francia y Estados Unidos |

El interés de los genotipos, aparte del epidemiológico, es su relación con ciertos aspectos evolutivos y terapéuticos del virus. Así la mutación más frecuente de HBV es la G1896A que determina la falta de formación del HBeAg y se asocia solo con los genotipos B, C y D, pero nunca con el genotipo A, debido a la necesidad de mantener la encapsidación del virus

Fig. 5. Genotipos y subgenotipos de HBV y zonas geográficas en donde se ubican.
 Tomado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/viromicromol/VHBrev.pdf>

(Simmonds & et al, 2005). Estos genotipos muestran diferente geografía a nivel global, el genotipo A prevalece más en el noroeste de Europa, Norte América, India y África, los B y C en Asia, el D es mundial, pero predomina en el mediterráneo, el E se encuentra en África Occidental, mientras que los genotipos F y H son detectados en América del sur y Central (Simmonds et al, 2005).

En México se considera prevalece el genotipo F y G, sin embargo, estudios recientes, han detectado una endemidad del genotipo H. (Román & et. al, 2013).

Variabilidad genética:



La variabilidad genética ocurre en todos los virus, aunque los virus ADN son más estables que los virus ARN. Así, se debe considerar que a pesar de que HBV es un virus ADN, se comporta intracelularmente como un retrovirus (virus ARN), con una tasa de mutación del orden de los virus ARN ($1,4-7,9 \times 10^{-5}$ sustituciones/sitio/año), mutaciones en respuesta a una etapa de retrotranscripción en el ciclo replicativo y al solapamiento de genes de HBV (Osioy, et al, 2006).

Como consecuencia de esta variabilidad, el virus circula como una mezcla de variantes genéticas (alteraciones genéticas en el genoma viral en replicación: mutaciones puntuales, deleciones e inserciones), constituyendo una especie compleja que evoluciona a lo largo de la infección según la presión evolutiva de factores como la respuesta inmunológica y los tratamientos antivirales.

Las mutaciones en la región del core a menudo afectan al gen X debido al solapamiento de los genes en el genoma del HBV. Casi todas las deleciones/inserciones en la región basal del core (que es la región en la que más comúnmente ocurren las mutaciones en el virus HBV), ocasionan en el gen X, una proteína truncada, es decir, una sustitución de los aminoácidos 130 y 131 en la proteína X; esta proteína carece de un dominio en C- terminal que está altamente conservado en el HBV y que aun con mutaciones en la proteína X no afecta su función transactivadora *in vitro* (Rodríguez-Novoa, 2013). La infección por cepas VHB con mutaciones en el gen X cursa con ausencia de marcadores serológicos de infección por VHB, provocan una disminución de la expresión del HBeAg y que han sido asociadas a un aumento de la replicación viral y a una progresión de la enfermedad hepática a formas más graves.

Debido a la recesión de los efectos antiproliferativos y apoptóticos sobre los hepatocitos infectados, esta condición contribuye al desarrollo de la Hepatitis crónica y puede evolucionar a hepatocarcinoma. El diagnóstico requiere siempre técnicas de amplificación genómica de dicho gen (PCR) (Jardi et al, 2004).



La PCR de punto final es una metodología por la cual se amplifican regiones específicas de un genoma, antes de llevarla a cabo se requiere determinar la carga viral con la que cuenta la muestra, ya que se requieren de 10-20 ng, se deben obtener al menos 5 ng/UL de ADN de cada muestra, si se recuperan 50 UL el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 ng, suficiente para llevar a cabo de manera óptima la PCR; una cantidad menor la dificultaría (Vargas-Córdoba, 2016).

De igual manera en la purificación de los fragmentos obtenidos producto de la PCR, se debe llevar a cabo una cuantificación y una evaluación de la pureza del producto, así como su calidad, por medio de una espectrofotometría. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de absorbancia a 260 y 280 nm, una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas.

Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230 de absorbancia y los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0-2.2, si la relación es menor indica la presencia de contaminantes, como carbohidratos, fenol o sílica (Alejos-Velázquez & et al., 2015)

Además de conocer la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría es importante conocer si el ADN que se obtuvo de la purificación es integro. La integridad del ADN se puede observar mediante una electroforesis en gel de agarosa; si el ADN esta integro se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN, si está fragmentado, se observara una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (**Figura 6**) (Alejos-Velázquez et al., 2015)

Todos estos aspectos, junto una carga viral adecuada (de 20 a 40 ng), se llevará a realizar una secuenciación optima del gen y los cambios que en esta se pudieran presentar (mutaciones).

Figura 6.

Hepatitis crónica

La infección crónica por el virus de la

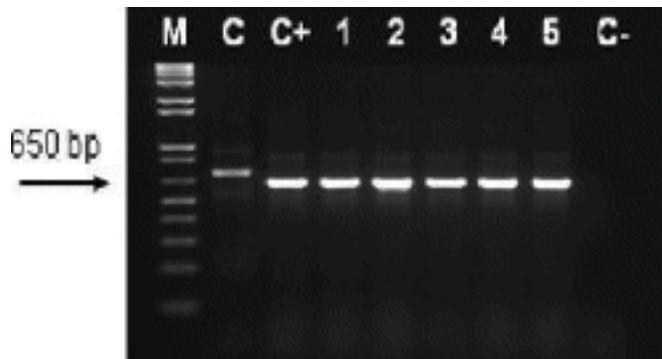


Fig.6Integridad del ADN, se observa una banda característica
Integridad del ADN, se observa una banda característica del fragmento cercana al pozo y en cada carril la banda es luminosa.

Tomado de
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2307-96062013000100003&script=sci_arttext

hepatitis B HBV, supone un problema de salud pública importante, aproximadamente existen en el mundo 350 millones de portadores del virus.

En conjunto la infección es responsable de 1.5 millones de muertes anuales por cirrosis y carcinoma hepatocelular HCC.

Alrededor del 10% de adultos infectados crónicos por HBV presentan antígenos HBs y HBe y de estos un 20% desarrollan hepatitis crónica activa, con riesgo elevado de cirrosis, HCC o ambos. En un 5-10% de estos pacientes se produce una seroconversión espontánea antiHBe (Alcaraz-Soriano, 2003).

En el 2005, en México, la prevalencia de Hepatitis B (HBV), diagnosticada con la presencia de antígeno de superficie (HBsAg positivo) era de 0.001% de acuerdo con la encuesta nacional de salud y de 0.36-0.52% con base en los reportes en donadores sanos del centro nacional de Transfusión sanguínea, sin embargo, los datos no muestran exactitud existiendo duda sobre los resultados epidemiológicos disponibles y en particular sobre la prevalencia en diferentes grupos de riesgo (masculino/femenino) que es similar 1:1.39.

Los pacientes con Hepatitis viral B crónica son HBsAg positivos. Cuando la replicación es alta se detecta positividad al HBeAg y cargas virales altas (HBV_ADN > 10⁶) Los portadores con carga viral baja tienen un perfil similar a los pacientes con mutación precore, sin embargo, estos últimos



presentan cargas virales típicamente altas (HBV-ADN $>10^4$). Las pruebas más sensibles para identificar presencia de replicación viral es la PCR (Marín-López, 2005).

Entre 2000 y 2007, en México se reportaron 192,588 casos de hepatitis virales de las cuales 3.3% eran HBV, sin embargo, el HBV podría estar subdiagnosticado, ya que hay zonas de alta endemia en poblaciones indígenas, existen limitaciones en la sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas y podría ser común la Hepatitis oculta (Panduro & et al., 2011).

México se ha considerado una zona de baja endemia, no obstante, recientemente se ha demostrado que en el país existen zonas de alta endemia, principalmente en poblaciones indígenas.

En poblaciones indígenas se ha descrito una alta frecuencia de Hepatitis B oculta, en México. Esto confirma estudios previos en donde se han detectado zonas geográficas de alta prevalencia del anti-HBc, pero bajas prevalencias del HBsAg y diferencias en el estado de seropositividad para HBsAg en función de la zona y/o grupo de estudio analizado (Román & et al., 2009).

Puesto que la población indígena en México, rebasa los 12 millones, el impacto epidemiológico del HBV podría ser mayor de lo considerado hasta la fecha. Los estudios epidemiológicos más recientes y de revisión de la literatura muestran que en el país hay por lo menos 3 millones de personas adultas que se han infectado (antiHBc positivos) y de estos un mínimo de 300,000 portadores activos (HBsAg positivos) podrían requerir tratamiento (Román & et al., 2009).

Si se considera a la población indígena como zona de alta endemia, entonces el número de pacientes que se ha infectado podría aumentar hasta 7-8 millones de mexicanos y a cerca de un millón de portadores activos. De confirmarse esta situación la infección por HBV sería mayor que la del HCV en México (Panduro et al., 2011).



Desde 1976 la seroprevalencia del HBV en México se ha mantenido estable y baja, debido a dos factores específicos: limitaciones de sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas que se han utilizado. En México predomina el genotipo H del HBV a diferencia de otras regiones del mundo, la variabilidad genética de este genotipo podría ser la causa que explicará la poca sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas utilizadas hasta la fecha, ya que las mismas se han diseñado, al igual que la vacuna contra HBV con base en los genotipos D y A, los cuales no son los que más prevalecen en nuestro país (Román et al., 2010).

No se ha logrado un control real de los factores de riesgo en la población. En México, a diferencia de otros países, la transmisión de HBV se debe a la exposición de las personas a fluidos biológicos y material quirúrgico contaminado en quirófanos y consultorios dentales (52.2%) así como las relaciones sexuales sin protección. Así la falta de sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas de diagnóstico y una falta de control de los factores de riesgo podrían explicar la baja y estable prevalencia de HBV (Román et al., 2009).

De igual manera habría que investigar la respuesta inmunológica del paciente mexicano al HBV genotipo H, con el objeto de determinar si el paciente infectado resuelve la infección más fácilmente con el genotipo H que con los otros genotipos que predominan en diferentes regiones del mundo. Por ello la importancia del estudio de la infección de HBV en el genotipo H y su respuesta o progresión de la infección, la cual no ha sido evaluada (Arauz et al., 2002).

Debido a que en México la literatura sobre el análisis de la Hepatitis B crónica, su amplificación, purificación y secuenciación es escasa, así como su diagnóstico con genotipo H y la relación de las mutaciones del gen x en la Hepatitis crónica, este proyecto se enfocó en la realización de la amplificación y purificación del gen X, genotipo H en pacientes mexicanos con Hepatitis crónica, esperando aportar mayor información de este padecimiento y mejorar así el diagnóstico específico y la creación de vacunas para pacientes mexicanos.



3. Justificación

La Hepatitis crónica en México se considera de baja endemicidad, sin embargo, en poblaciones indígenas se ha presentado una alta incidencia, lo cual podría explicarse por el hecho que las técnicas de diagnóstico se basan en los tipos virales predominantes HBA y HBC y los genotipos F y G que no corresponden a la población mexicana.

18

Aunado a ello, se debe considerar para la evolución de la enfermedad de la etapa aguda a crónica, que el gen x tiene una relevante participación, ya que presenta variaciones genotípicas y mutaciones emergentes. Estas son el resultado de la superposición que presentan los marcos de lectura abierta (ORF), las mutaciones que presenta la región basal de core (PBC), donde son comunes, le afectan al gen x, produciendo una proteína trunca, hecho que se relaciona con el desarrollo de este padecimiento.

En México son escasos los reportes concernientes al virus HBV, su amplificación, purificación, carga viral y secuenciación, considerando su genotipo H y la relación que pueda tener el gen X con la evolución de la enfermedad.

Por ese motivo, este proyecto terminal se enfocara en realizar la amplificación del gen x a partir del DNA de muestras de plasma de pacientes mexicanos diagnosticados con Hepatitis B crónica, mediante la técnica de PCR de punto final semianidada, la purificación del producto de PCR y finalmente se cuantificará el DNA obtenido para determinar la carga viral, que en un futuro permitirá elaborar la secuenciación de este gen, permitiendo el análisis de la variabilidad genética de este gen x, sus mutaciones y qué relación podrían tener en la evolución del padecimiento. Hecho que permitirá ampliar la información sobre la Hepatitis crónica en México, dará pauta para establecer un diagnóstico específico para el genotipo H de los pacientes mexicanos, se podrá crear una vacuna recombinante específica y de esa manera dilucidar cuál es la incidencia real de HBV crónica en nuestro país.



4. Hipótesis

Con base en la realización de la PCR de punto final semianidada será posible obtener el fragmento correspondiente al gen x del genoma del virus de la Hepatitis B, además de la carga viral producto de la purificación de los fragmentos de ADN.

19

5. Objetivos

Objetivo general

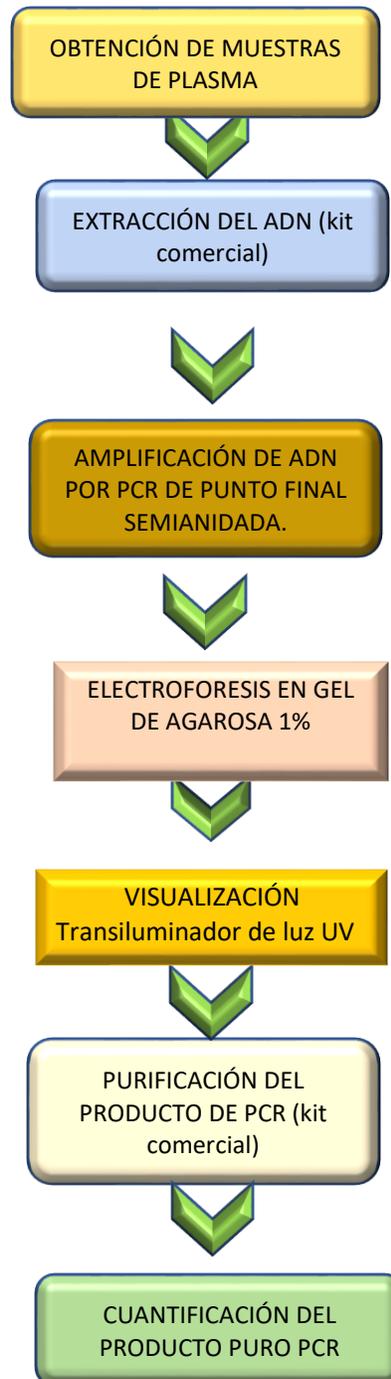
Amplificar por PCR de punto final semianidada, el gen X del genoma viral de HBV, de pacientes mexicanos infectados con el virus de la Hepatitis B.

Objetivos particulares

1. Amplificar el gen X a partir de DNA viral de muestras de plasma de pacientes mexicanos con HBV crónica.
2. Purificar el fragmento del genoma viral de HBV que contiene el gen x, producto de la PCR de punto final de las muestras de pacientes.
3. Determinar la carga viral del fragmento purificado, del producto de la PCR que contiene el gen X.

5. Metodología

Diagrama de flujo



Muestras

Se analizaron 15 muestras de plasma pertenecientes a pacientes diagnosticados con el virus de Hepatitis B del Banco Histórico de laboratorio de virología del Hospital de Infectología del CMN “La Raza”, las cuales se encuentran en custodia en el laboratorio de virología, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del CMN siglo XXI.

Extracción de ADN

Se realizó con el método NASBA, utilizando el kit comercial *FavorPrep Viral Nucleic Acid Extraction Kit I* de FAVORGEN.

1. Para las 15 muestras, se prepararon cuatro volúmenes diferentes de Buffer de lisis (900, 950, 970 y 980 μ l) y se agregaron cuatro volúmenes diferentes de muestra (100, 50, 30 y 20 μ l) con 2 controles, negativo y positivo para completar un volumen final de 1000 μ l y se mezclaron con vortéx.
2. A la mezcla se agrega 50 μ l de Sílica (la sílica atrapa los ácidos nucleicos cuando ya se ha llevado a cabo el lisado), cada que se agregó la sílica a los tubos, se mezclaron para evitar la sedimentación.
3. Se incubaron los tubos 10 minutos a Temperatura ambiente, mezclando cada 2 minutos con vortéx
4. Concluida la incubación se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 2 minutos, se sacó el sobrenadante con pipeta de globo tratando de no tocar la sílica.
5. Se agregó Etanol 70% (previamente preparado: 22 μ l de etanol + 8 μ l de Agua bidestilada estéril), se mezcló con vortéx.



6. Se centrifugaron a 14000 rpm por 2 minutos. Y se retiró el sobrenadante.
7. Se lavaron con Buffer wash 1 μ l =primer lavado= (Wash buffer BioMereux), se mezclaron con vortéx.
8. Centrifugación a 14000 rpm 2 minutos, retirando el sobrenadante.
9. Se agregó 1 μ l de buffer wash =segundo lavado= y se mezcló en vortéx.
10. Centrifugación a 14000 rpm por 2 minutos retirando el sobrenadante.
11. Se agregó Etanol 70% 1 μ l = segundo lavado y purificado=.
12. Centrifugación a 14000 rpm por 2 minutos. Se retiró sobrenadante.
13. Se agregó 1 μ l de acetona (pureza grado molecular 100% laboratorios Merck) mezclar. =Última purificación=.
14. Se incubaron los tubos a 56°C, destapados y cubiertos de con una gasa estéril (irradiada previamente con luz UV), para la evaporación de la acetona.
15. Posterior a la incubación se agregó el buffer de Elusión (BioMerieux), 60 μ l para las muestras con volumen de 100 μ l y 30 μ l para el resto de volúmenes.
16. Se incubaron los tubos tapados a 56°C, por 10 minutos, pasados 5 minutos se mezclaron con vortéx.
17. Centrifugación a 14000 rpm por 2 minutos.
18. Por peso, después de la elusión, el DNA se queda en el sobrenadante, el cual se colectó de la siguiente manera: para la muestra con volumen de 100 μ l se colectó el DNA en 3 tubos, y el resto de volúmenes se colectó el DNA en 2 tubos.

19. Los tubos se cuantificaron por NanoDrop (1000 Techno científico) y se guardaron en refrigeración a -20°C hasta su uso en la amplificación.

Estandarización de la PCR

Antes de realizar la PCR semianidada, se realizaron pruebas de estandarización del proceso probando dilución de primers y primers con ACTINA-3. Se probaron también diferentes grados de temperatura y ciclos para la amplificación, obteniendo las siguientes condiciones:

Dilución de primers: 1:10 1 μ de primera concentración 100 μ M + 9 μ l de H₂O inyectable.

Enzima Kapa dio buenos resultados

Amplificación: Temperatura: 95° C 3 minutos, 95° C 30 seg., 60° C 30 seg., 72° C 30seg., 72° C 5 min. con 35 ciclos para PCR externa y 30 ciclos con las mismas temperaturas para PCR interna; las cuales fueron aplicadas al proceso de PCR de punto final semianidada.

PCR de punto final semianidada

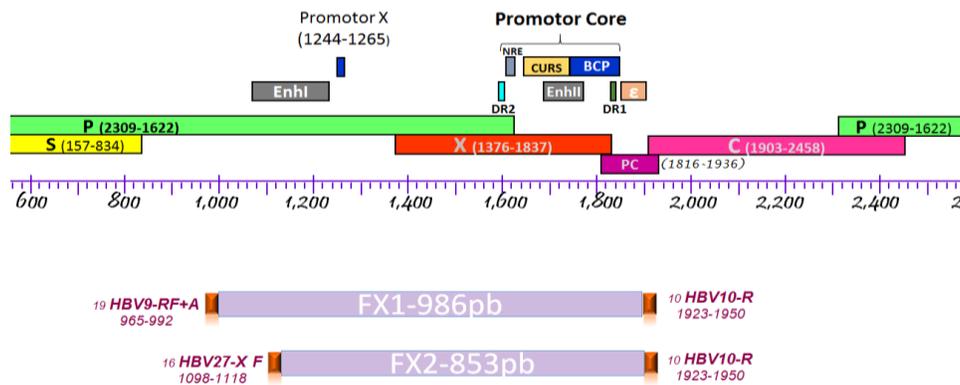
La PCR semianidada consiste en dos PCR continuas con dos pares de primers específicos en cada ronda.

En la primera PCR (PCR externa) se utilizaron los Primers externos HBV 9-RF-A (Forward)/ HBV 10-R (Reverse) de 986 pb,
secuencia 5'- ATCGACCCATTGATTGGAAAGTCTGTCA-3' /
5'GAGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATT-3'

En la segunda PCR (PCR interna) se utilizan los primers internos HBV 27-X-F (Forward) /HBV 10 R (Reverse) de 853 pb,
secuencia 5'- CTCGCCAACTTACAAGGCCTTTCTCTGT-3' /
5'- GAGAGTAACTCCACAGAAGCTCCAAATT-3'

Los primers fueron diseñados por CINVESTAV Irapuato del IPN.

Ubicación de los primers en el genoma de HBV.



1) Se limpió con alcohol el material a utilizar en la preparación de los reactivos, así como la campana de flujo laminar en donde se prepararon. Tanto la campana con el material como el área de trabajo se irradió con luz UV, lo que redujo la contaminación con amplicones externos al ADN a analizar. (ANEXO I)

2) Se elaboró la Master mix de la Primera PCR (externa), con los reactivos siguientes y en el orden que marcaba el protocolo diseñado (ANEXO II):



| X1 | X6rxn 's | Reactivo | | |
|------------------------|--|-------------------------------|-----------------------------|------|
| [Inicial] | Vol. μ l | Vol. μ l | | |
| [Final] | | | | |
| - | H ₂ O inyectable | - | 8.25 | 49.5 |
| 10X | Taq Buffer (1.5 mM MgCl ₂) | 1X | 1.25 | 7.5 |
| 10mM | dNTP 's | 0.2 mM | 0.25 | 1.5 |
| 10 μ M | Primer Forward HBV 9 F+A | 0.2 μ M | 0.25 | 1.5 |
| 10 μ M | Primer Reverse HBV 10 R | 0.2 μ M | 0.25 | 1.5 |
| 5U/ μ l | Enzima Kapa Taq DNA Pol Biosystem | 0.1 U | 0.25 | 1.5 |
| - | *DNA | - | 2 | - |
| Volumen Final = | | 12.5 μl | 63 μl | |

*DNA
agregado

posteriormente

3) La master mix, se llevó al laboratorio y se agregaron 2 μ l de cada una de las muestras de ADN en los tubos que se amplificarían (ANEXO III).

4) Se introdujeron los tubos al termociclador (BIOMETRA T PROFESIONAL), utilizando el programa [AMR Program 19 prueba X], el cual presento las siguientes condiciones (ANEXO IV):



Tiempo aprox. de duración
 proceso: 1:26 hrs.

| | | | |
|---------------------|---|-------------|----------|
| 35 ciclos | { | 95°C | 3 |
| | | | minutos |
| | | 95°C | 30 |
| | | | segundos |
| | | 60°C | 30 |
| | | | segundos |
| | | 72°C | 30 |
| | | segundos | |
| | | 72°C | 5 |
| | | minutos | |
| | | 4°C | ∞ |

5) Cuando concluyó la primera PCR (PCR externa), los productos de esta se utilizaron para la segunda PCR (PCR interna), el procedimiento para preparar la master mix, fue el mismo, salvo que el volumen total fue de 25 µl (ANEXO V).

6) Se amplificaron los productos de la PCR externa, con las mismas temperaturas que la primera PCR, pero en 30 ciclos:

Tiempo aprox. de duración
 del proceso: 136 Hrs.

| | | |
|---|------|---------|
| { | 95°C | 3 |
| | | minutos |
| | 95°C | 30 |

30 segundos

ciclos **60°C** 30

7) Concluida la
 tubos se retiraron
 centrifugaron
 (Centrifuge 5418
 A 14000 rpm para
 electroforesis.

| | | |
|----------|------------------------|-------------|
| segundos | amplificación | los |
| 72°C 30 | del termociclador y se | |
| segundos | | |
| 72°C 5 | Eppendorf) | por 30 seg. |
| minutos | después | llevarlos a |
| 4°C ∞ | | |

Electroforesis

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1%, con cámara horizontal.

<Se pesaron 0.25 g de agarosa y se midieron 25 ml de buffer TBE 0.5x, los cuales se agregaron a la agarosa mezclando suavemente.

< Para disolver completamente, se calentó la mezcla en horno de microondas hasta observar una mezcla transparente y sin residuos.

< Se enfrió 10 minutos a temperatura ambiente, a continuación, se agregaron 10µl de Hydragreen (sustituyendo al Bromuro de Etidio que es cancerígeno) para teñir.

< Previa preparación de la cámara de electroforesis (se acomodó cama de electroforesis, barras de contención y un peine), se vació el gel en la cama de la cámara y se colocó otro peine, se cerró la cámara y se tapó con papel aluminio para evitar la reacción de tinción.

Se dejó gelificar 30 min.

< Solidificado el gel se agregó buffer TBE 0.5x hasta cubrir la placa por lo menos 1 mm con el buffer.

< Se cargaron los productos de la PCR y los controles en la cámara de gel con buffer LB 0.2xc y se colocó un marcador de peso molecular de 100 pb o el Quick Load (1000 pb) y se conectó a una fuente de poder con 100 volts por 27 minutos.

< Realizada la corrida de las muestras en la placa de gel, se retiró de la cámara de electroforesis y se trasladó a un visualizador para observar la separación de los fragmentos amplificados correspondientes a las muestras analizadas. (ANEXO VI)

28

Purificación

La purificación se llevó a cabo con el kit FavorPrep GEL/ PCR Purification

1. Se preparó un gel de agarosa al 2% para la electroforesis.
2. Se pesaron 0.6 g de agarosa y se disolvieron en 30 ml de TBE 0.5 X.
3. Se disolvió al microondas la mezcla y se dejó enfriar 10 min.
4. Se agregó Hydragreen 0.8 μ l y se vació en la cámara de electroforesis ya preparada.
5. Se dejó gelificar 30 min.
6. Agrego Buffer de electroforesis TBE 0.5 X y se cargaron las muestras.
7. La carga del producto de PCR interna fue con buffer de carga LB 6X.
8. Se corrieron las muestras a 100 volt por 40 min.
9. Se colocaron en el visualizador para observar las bandas de los fragmentos que correspondían a los productos internos de la PCR y los cuales se purificarían (ANEXO VII).
10. ya identificados los fragmentos se cortaron en un transiluminador de Luz UV y se pusieron en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles, previamente pesados.



11. Se pesó el tubo y el fragmento de gel para saber su peso no debe rebasar los (≤ 0.3 g).
12. Agregó 500 μ l de FADF Buffer y se mezcló con vórtice.
13. Se Incubaron 10-15 minutos a 55°C con agitador hasta disolver.
14. Enfriaron los fragmentos de ADN a T° Ambiente.
15. Transfiriendo una columna de FADF a un tubo de recolección.
16. Se Transfiere el fragmento a la columna, máximo 800 μ l.
17. Centrifugación a 14,000 xg (centrifuge 5418 Eppendorf) por 30 seg.
18. Descartando el filtrado.
19. Se Agregó 750 μ l de Wash buffer y centrifugó a 14000 xg por 30 seg..
20. Descartando el filtrado.
21. Se regresó la columna al tubo y centrifugó 3 minutos adicionales.
22. Se secó la columna en un concentrador (Concentrator 5301 Eppendorf).
23. Se colocó la columna en un tubo estéril de 1.5 ml (desechando el tubo de recolección que contiene el filtrado).
24. Se agregar 40 μ l de agua inyectable en el centro de la columna.
25. Dejando reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
26. Centrifugado a 14000 xg 2 minutos.
27. Cuantificado en NanoDrop (1000 Techno científico).
28. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%, con marcador de masa para verificar la integridad de ADN (ANEXO VIII).



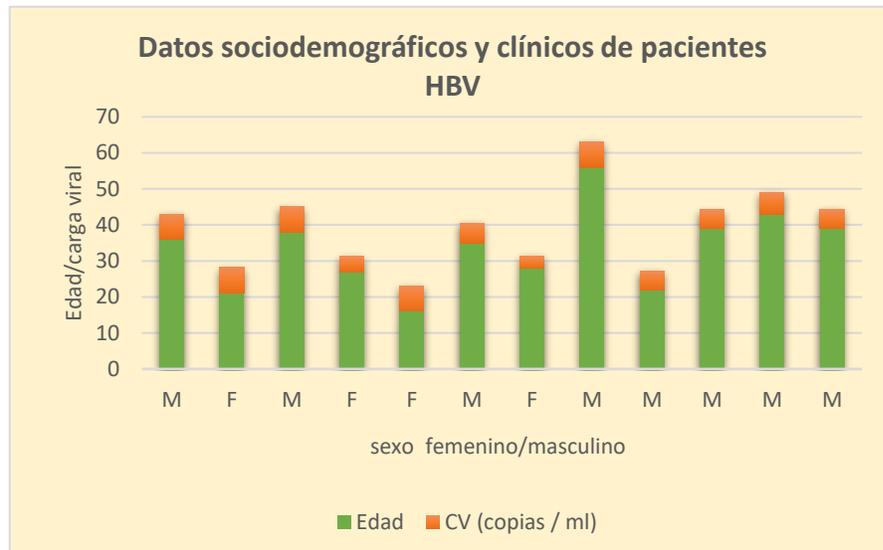
6. Resultados

Las 15 muestras analizadas pertenecían a pacientes del Hospital Centro Medico la Raza, en donde fueron diagnosticados como HBV crónicos, siendo positivos todos para HBsAg, los datos sociodemográficos y clínicos se presentan a continuación (**Tabla 1**).

30

| Radio | M-F | 10-5 |
|--|-----|-------------|
| + | | |
| Rango de edad (años) | | 16-58 |
| Transfusiones sanguíneas | | 10 Sí/ 2 No |
| Rango de HVB-DNA en Plasma (carga viral) | | |
| Pacientes HBV | | |
| Infectados | | n=12 HBsAg |

Tabla 1. Datos sociodemográficos y clínicos de la población de estudio (pacientes diagnosticados con HBV crónica). Tres de los pacientes no dieron autorización para la disponibilidad de estos datos.



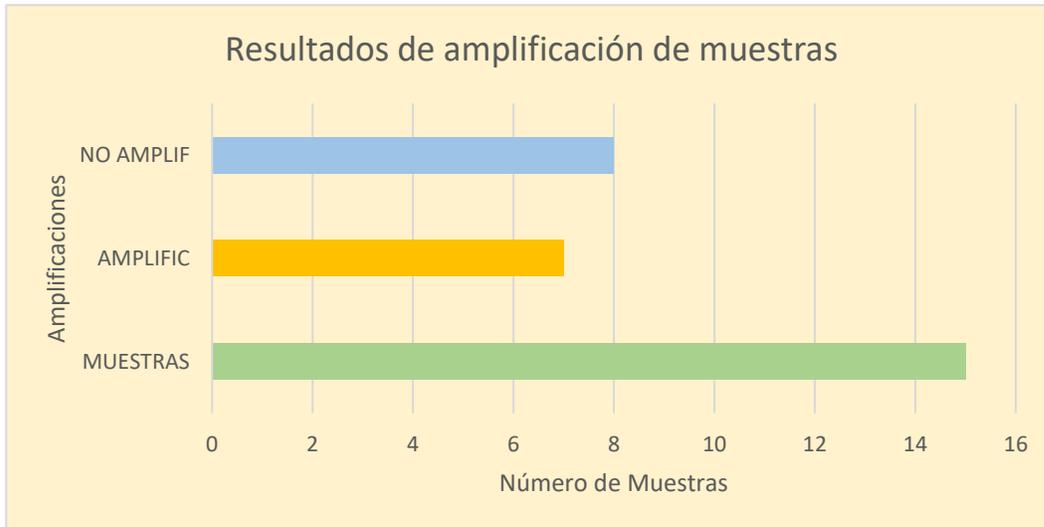
Gráfica 1. Datos de pacientes que forman parte de la población de donde se observa que predominan los de sexo masculino, y en donde la carga viral también es relativamente mayor que en el sexo femenino.

Se logró amplificar el fragmento del genoma de HBV en las muestras HBV91, HBV-130, HBV 143, HBV-85, HBV-132, HBV-133 y HBV-154, mediante PCR semianidada para el gen x. Mediante la estrategia con primer externos e internos se pudo apreciar en el gel de agarosa las bandas correspondientes al fragmento de 853 pb el cual se esperaba. Cuatro de las muestras analizadas se contaminaron con ADN externo, lo cual apareció al visualizarlos, por lo que ya no fueron considerados para una repetición.

La visualización de las placas de gel, se muestran en ANEXO IX

| Numero de Muestras n (15) | PCR Amplificada (+) | PCR No Amplificada (-) |
|---------------------------|---------------------|------------------------|
| 15 | 7 | 8 |

Tabla 2. Resultados de la amplificación de los productos de PCR interna, mediante PCR de punto final semianidada, región X del HBV.



Gráfica 2. Resultados obtenidos de amplificación por PCR de punto final semianidada, en donde se observa que casi la mitad de las muestras Resultaron positivas para la amplificación.

Las amplificaciones obtenidas muestran que la metodología para la PCR si funciona, aunque las muestras son menos de la mitad del total, se debe de considerar que cuatro de ellas se contaminaron, hecho que es ajeno a la metodología aplicada en cuanto a la amplificación, por lo que en realidad se podría tomar como que el porcentaje de positividad fue mayor que el de negatividad.

| | M | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | mm |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---------------|
| 900 | | | | | | | | | 10 ng-1000 pb |
| 800 | | | | | | | | | 7 ng – 700 pb |
| 500 | | | | | | | | | 5 ng - 500 pb |



Visualización del gel de agarosa de los fragmentos purificados de HBV, con marcador.

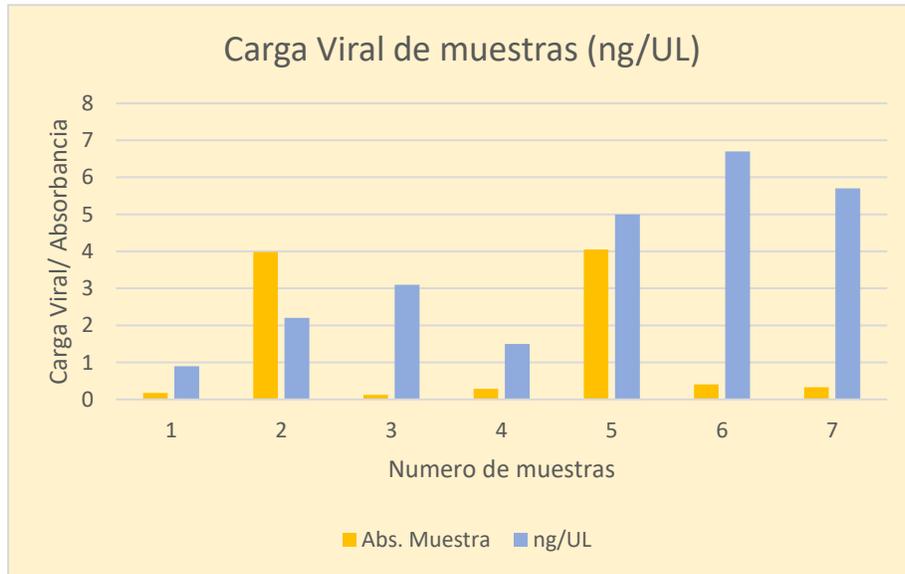
De masa. M: marcador de 100 pb; 1: HBV91; 2: HBV-130; 3: HBV143; 4: HBV85;5

HBV-132; 6: HBV-133; 7: HBV154; mm: Marcador de masa. Rendimiento de los fragmentos y carga viral.

De la purificación de los fragmentos que correspondían al producto de la PCR de interna, se obtuvo la cuantificación mediante NanoDrop (1000 techno) (Espectrofotometría) como sigue:

| Muestra | λ | Abs. | ng/uL |
|-------------------|-----------|-------|------------|
| 1. HBV-91 | 230 | 0.177 | 0.9 |
| 2. HVB-130 | 230 | 3.987 | 2.2 |
| 3. HBV-143 | 230 | 0.122 | 3.1 |
| 4. HBV-85 | 230 | 0.288 | 1.5 |
| 5. HBV-132 | 230 | 4.046 | 5.0 |
| 6. HBV-133 | 230 | 0.412 | 6.7 |
| 7. HBV-154 | 230 | 0.332 | 5.7 |

Tabla 3. Resultados de cuantificación de productos de PCR interna de HBV purificados, mediante NanoDrop (1000 techno científico).



Gráfica 3. Carga viral obtenida de los fragmentos purificados de Productos PCR interna de HBV.

De la gráfica, observa que la mayor carga viral la tiene en las muestras HBV-133, HBV 154 y HBV 132, por lo que habría que hacer una revisión del corte de fragmentos preparados para la purificación, para descartar que se hubiese tomado más bandas de las tomadas en las primeras muestras, lo que reflejaría entonces una carga viral más real.



7. Discusión

En el presente estudio se describe qué en efecto, la determinación de la presencia del padecimiento, se obtiene por la aparición de marcadores serológicos como el antígeno HBsAg, el cual es un antígeno de superficie del virus HBV, que se detecta a partir de la cuarta semana de infección mediante el análisis de ELISA (Sera-Desfilis, 2003).

Además, los pacientes se catalogaron en nivel de Hepatitis crónica debido a que presentaban diagnóstico con HBsAg positivo superior a 6 meses, padeciendo en promedio desde la adquisición de la enfermedad, 12 años, en los cuales se ha dado diferentes tratamientos.

Su DNA-HBV, otro marcador tuvo como promedio 5.54 (log 10) copias / por ml, lo que confirma el diagnóstico ya que, considerando la literatura ((Sera-Desfilis, 2003), el DNA-HBV se considera crónico cuando es $>10^5$ copias/ ml. Estos niveles para el DNA vírico, consideran clínicamente una replicación viral positiva, la cual puede ser mejor analizada con diferentes técnicas, como la hibridación del ADN ramificado o por la que hasta ahora ha resultado la mejor opción por el poco tiempo de espera y la sensibilidad en sus resultados, la PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Para llevarla a cabo se requiere exista un límite de detección con esta técnica que es de 10^2 y 10^3 copias/ ml, sin diferenciación en los distintos genotipos (Sera-Desfilis, 2003).

Para que la PCR sea una técnica funcional, es recomendable realizar una estandarización, en el caso de este proyecto se realizó un protocolo de experimentación en donde se probaron varias enzimas y concentración en los primers de la master mix.

En cuanto a la enzima los ensayos se realizaron con el primer actina-3, de 332 pb, encontrando que la concentración eficiente para los primers era



de 1:10: 1µl de Primer + 9 µ de agua inyectable. En cuanto a la enzima, la más eficiente resulto ser la enzima Kapa en una concentración de 0.1 U/µl. La concentración de Buffer taq Kapa fue de 1x con 1.5 mM de MgCl₂ y dNTPs 0.2 mM concentraciones muy similares a las que marca la literatura (Sambrook & Russell, 2001).

De igual manera se probaron gradientes de temperatura y diluciones de DNA, para optimizar la amplificación, encontrando los gradientes más eficientes que se muestran en los protocolos utilizados y se decidió no realizar diluciones en el DNA manteniendo su concentración de origen. (Sambrook & Russel, 2001).

Varias mutaciones en el genoma de HBV han sido fuertemente asociadas con el desarrollo de la Hepatitis crónica y del Hepatocarcinoma (HCC). Varias evidencias apuntan a mutaciones genéticas específicas como factores virales esenciales que contribuyen a estos padecimientos y que podrían servir como biomarcadores pronóstico de la enfermedad.

Hasta ahora, las mutaciones más comunes en la región basal del core que se han reportado han sido la (A1762) en la cual ocurre una sustitución de A por T en el nucleótido 1762 y la otra es la (G1764A) en la que la G sustituye a una A en el nucleótido 1764, estas mutaciones han sido asociadas con una mayor incidencia de HCC (Lee et al., 2016)

Debido a que la región basal del core e encuentra traslapada con la región x en el genoma del virus HBV, estas mutaciones afectan al gen x y le ocasionan que produzca una proteína truncada, la proteína HBx, la cual tiene una sustitución de aminoácidos 130 y 131 y que se considera tiene un papel fundamental en la evolución de la enfermedad hepática de aguda a crónica e incluso hasta el Hepatocarcinoma (Rodríguez et al., 2016).

Los pacientes que cursan una hepatitis crónica presentan como característica común integración de los fragmentos del genoma de HBV en el genoma de la célula huésped, la mayoría de estas secuencias integradas incluyen el gen x, el cual codifica la proteína x truncada, y que, aunque presenta esta condición su actividad transactivadora e mantiene.



Se considera que la proteína x, representa una parte fundamental en la replicación del virus, y en las señales intracelulares que activan la apoptosis de la célula huésped logrando que esta condición le beneficie en cuanto a la replicación y por tanto, se considera que es un factor importante en el paso de la hepatitis aguda a crónica, aunado a que la mayoría de las proteínas codificadas, en el padecimiento crónica bajan de concentración y solo la proteína x permanece e incluso sube su concentración (Bouchard & Schneider, 2004).

Para determinar la importancia del gen x y si las mutaciones, si es que las hay, se requiere identificar si se encuentra presente el gen x en los pacientes con hepatitis crónica y si efectivamente presenta mutaciones que se puedan asociar a este padecimiento, por lo que la literatura sugiere se realice una PCR como técnica sensible para la amplificación de genomas, en este caso el gen X, para posteriormente y con las condiciones adecuadas de purificación y carga viral se realice una secuenciación que pueda mostrar si efectivamente el gen x presenta mutaciones y estas puedan de alguna manera ser factores importantes en la condición crónica del paciente.

Como etapa preliminar a una secuenciación, en este proyecto, se llevó a cabo una PCR semianidada, de 15 muestras de pacientes diagnosticados con Hepatitis crónica, las cuales fueron amplificadas, de manera óptima en 7 de los casos, en los cuales las bandas de los fragmentos obtenidos eran visiblemente claras, y el fragmento amplificado obtenido fue de 853 pb tal y como se esperaba, con lo cual se demuestra que en efecto para este gen X, la técnica fue efectiva, tal y como lo refiere la literatura en cuanto a la detección y análisis del virus de HBV en pacientes crónicos con PCR (Hijar et al., 2000).

Continuando con el procedimiento, se purificaron los fragmentos del producto de la PCR interna, en donde las franjas en el gel de agarosa se identificaron óptimamente y con ello pudo realizarse la purificación y cuantificación, determinando el rendimiento del proceso mediante espectrofotometría, en el caso del ADN genómico o de doble cadena, la densidad óptica equivale a 50 ug/ ml. Y para obtener la concentración de



ng/UL se debe diluir, sin embargo, en el NanoDrop no es necesario diluir la muestra ya que el equipo proporciona directamente la concentración en ng/UL, considerando que para llevar a cabo una PCR de secuenciación se requiere de 10 a 200 ng, se debe obtener al menos 5 ng/UL de DNA en cada muestra, si se recuperan 50 uL, el rendimiento neto de la purificación será de 0.25 ug, si se tiene concentraciones menores no podrá tenerse un buen rendimiento en la PCR (Alejos et al., 2015). Es el caso de este proyecto en donde solo en 3 muestras se encontró un volumen suficiente para continuar el proceso de secuenciación, por lo que se considera que los cortes en las bandas de los fragmentos no fueron suficientemente eficaces, por lo que se sugiere una mayor eficacia en este paso para obtener resultados más óptimos.

38

8. Conclusión

En conclusión, el gen x se encuentra presente en el análisis de plasma de los pacientes que cursan Hepatitis crónica en México, lo cual fue comprobado con las amplificaciones obtenidas de las muestras analizadas de pacientes con esta enfermedad.

La técnica de PCR es una metodología adecuada para la amplificación de fragmentos del genoma de HBV, en este caso del gen X, como lo muestran los resultados obtenidos, también es relevante destacar el uso de una estandarización de la PCR para obtener buenos resultados en el análisis y además también se destaca el cuidado que debe tenerse en el proceso de preparación, tanto de master mix, como de la muestra a amplificar, así como la electroforesis y la purificación, ya que se comprobó son fáciles de contaminar por amplicones externos.

Los pasos preliminares, PCR y Purificación, son de suma importancia para la continuación hacia una secuenciación, ya que además de aislar el fragmento de ADN de interés, se debe obtener una carga viral adecuada para que se tenga suficiente material con el cual trabajar la metodología inherente a la secuenciación.



El hecho de identificar el gen X en los pacientes con HBV, con la técnica de PCR, abre nuevas posibilidades en el estudio de este padecimiento, no solo para hacer más específico el diagnóstico, sino para ampliar el análisis de la variabilidad genética del gen x que se considera forma parte importante de la evolución de la enfermedad, además esta nueva información aporta elementos para tratar a los pacientes en México y con el genotipo endémico H del país, lo que ayudará a implementar nuevos tratamientos que sean más efectivos para los nativos de este país y sobre todo en las poblaciones indígenas que suelen permanecer indiferentes a los programas de salud.



8. Bibliografía

Alcaraz-Soriano (2003) Virus de la Hepatitis B: estructura genómica y marcadores clínicos. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (Seimc)

40

Alejos- Velázquez L, Aragón-Martínez M, Cornejo-Romero A. (2015) *Extracción y Purificación de ADN*. 1st ed. México: [E-book]: 1-25. Disponible en <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/710/extraccion.pdf>

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, and Magnius LO. (2002) Genotype ^[L]_[SEP]H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*; 83:2059-2073.

Bock C, Schwin S, Locarnini S, Fife J, Manns M, Trautwein C. et al. (2001) Structural Organization of the hepatitis B virus minichromosome. *Journal Mol. Biol.*; 307: 183-6.

Bouchard M J, Schneider R J. (2004) The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *Journal Virol.* 78: 12725-12734.

Carman W, Jacyna M, Hadziyannis S, et al. (1989) Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*; ii: 588-591.

Chen W, Oon C, Leong A, Koh S, Teng S. (2000) Expression of integrated hepatitis B virus X variants in human hepatocellular carcinomas and its significance. *Biochem Biophys Res Commun*; 276:885–892. ^[L]_[SEP]

Colgrove, R., G. Simon, and D. Ganem. 1989. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene



product in cells permissive for viral replication. *J. Virol.* **63**:4019–4026.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. (1970) Virus-Like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*; 1 (7649): 695-8.

Feitelson MA, Duan LX. (1997) Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of the hepatocellular carcinoma. *Am Journal Pathol*; 150:1141-57.

Ganem D, Prince MA. Hepatitis B virus infection Natural history and clinical consequences. *Journal Medicine*; 350(11): 1118-29.

Hijar G, Padilla C, Cabezas C, Suárez C, Romero G, Montoya Y. (2000) Estandarización de la PCR para el diagnóstico de la Hepatitis B en el Perú. *Rev. Med. Exp.*; 15(1-2)

Jardi R, Rodríguez F, Buti M, Costa X, Valdez X, Allende H et al (2004) Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *Journal Hepatol*; 40: 507-14

Kodama, K., N. Ogasawara, H. Yoshikawa, and S. Murakami. 1985. Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: evolutionary relationship between hepadnaviruses. *J. Virol.* **56**:978–986.

Koike, K. (2009) Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis. *Cancer Lett*; 286:60–68. [1]
[SEP]

Kumar V. y Sarkar D.P. (2004). Hepatitis B virus X protein (HBx): structure–function relationships and role in viral pathogenesis. Springer-Verlag, Berlin.166: 377-407.



- Lee D, Lyu H, Chung Y, Kim J, Mathews P, Jafree E, Zheng L, Yu E, Lee Y, Hyung Ryu S. (2016) Genomic change in Hepatitis B virus associated with development of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterology*; 22(23): 5393-5399.
- Liang, T. (2009) Hepatitis B: Virus and Disease *Hepatology*; 49: S-21
- Mangus DA, Evans MC, Jacobson A. Poly (A)-building proteins: multifunctional scaffolds for the post transcripcional control of gene expression. *Genome Biol.*; 4: 223.
- Nassal M, Schaller H. (1997) Hepatitis B replication: an update. *Journal Viral Hepatology*; 3: 217-26.
- Osiowy C, Giles E, Tanaka Y, Mizokami M, Minuk GY. (2006)Molecular evolution of hepatitis B over 25 years. *Journal Virology*; 80: 10307-14.
- Panduro A, Escobedo-Meléndez G, Fierro N, Ruiz-Madrigal B, Zepeda-Carrillo E, Román S. (2011) Epidemiology of viral hepatitis in México. *Salud Pública Mex*; 53 supl. One: S37-S45.
- Prince A, Ikram H, Hopp T. (1982) Hepatitis B virus vaccine: identification of AgHBs/a and Ag-HBs/d but not Ag-HBs/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide, *Proc Nat Acad Sci USA*; 79: 579-582.
- Rodríguez-Frías F, Jardí R. (2008) Virología molecular del virus de la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 26 Supl 7:2-10.
- Rodríguez-Novoa, S. (2003) Analisis Metodológico en la caracterización molecular del virus de la Hepatitis B: Genotipo y Detección de Resistencia al tratamiento (Tesis de Doctorado) Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.



- Rodríguez I, Loureriro C, León R, Kay-Valero S, Senior M, Devesa M, Pujol F. (2016) Mutaciones K130M y V 131I del gen x en aislados venezolanos de Hepatitis B; 36: 63-67.
- Roman S, Panduro A. (2013) HBV Endemicity in México Is Associated With HBV Genotypes H and G. *World J. Gastroenterology*; 19(33): 5446-5453.
- Román S, Panduro A, Aguilar-Gutiérrez Y, Maldonado M, Vázquez-VanDick, Martínez-López et al. (2009) A low steady HBsAg seroprevalence is associated with low incidence of HBV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in México: a systemic review. *Hepatology*; 3: 343-355.
- Román E, Takara Y, Khan A, Kurbanov F, et al. (2010) Occult Hepatitis B in the genotype H-infected Nahuas and Huichol native Mexican population. *J. Med. Virol.*; 82: 1527-1536.
- Venegas M, Villanueva R, Brahm J. (2010) Variabilidad genética del virus hepatitis B y su significado clínico. *Rev. Hosp. Univ. Chile*; 21:154-61.
- Sambrook J. & Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Vol. II (3er. Ed.). E.U.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Orozco L, Panduro-Cerda A. (2005) Genómica y Proteómica del virus de la Hepatitis B. *Investigación en salud*; Vol. VII (1): 12-18.
- Schaefer, S. (2007) Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterology*; 13:14-21.
- Simmonds P, Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of the Hepatitis B virus genotypes. *Journal Virology*; 80: 10307-14.
- Stoeck L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H et al. (2006) Identification of a structural motif crucial for infectivity of Hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103:6730-4.



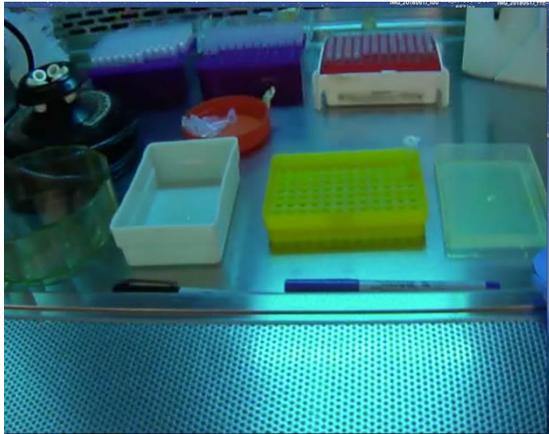
Tu H, Bonura C, Giannini H, Mouly P, Soussan M, Kew , Paterlini-Brechot P, Brechot C, Kremsdorf D. (2001) Biological impact of natural COOH-terminal deletion of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res.* 61: 7803-7810.

Vargas-Córdoba M. (2016) *Virología Médica (2ª Edición)* Colombia: Manual Moderno.



Anexos

ANEXO 1.



46

Campana de flujo Laminar y área de trabajo irradiada con luz UV

ANEXO II.

Preparación de master mix en campana de flujo laminar: los reactivos deben permanecer en temperatura refrigerante (-18°C) mientras no se usen. Antes de mezclarlos se deben centrifugar para que tengan su concentración óptima. Los reactivos no se irradian con luz UV porque pierden sus propiedades. La enzima kapa no se centrifuga porque se activa.

47



ANEXO III.

| Tubo | Muestra | Master mix (μl) | Vol (μl) |
|------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | Negativo campana | 5.25 | 1 de H ₂ O |
| 2 | Negativo Laboratorio | 5.25 | 1 de H ₂ O |
| 3 | C ⁺ HBV-91 | 5.25 | 1 DNA |
| 4 | HBV -156 | 10.5 | 2 |
| 5 | HBV-160 | 10.5 | 2 |
| 6 | HBV-163 | 10.5 | 2 |
| 7 | HBV-164 | 10.5 | 2 |
| 8 | HBV-86 | 10,5 | 2 |
| 9 | HBV-104 | 10.5 | 2 |
| 10 | HBV-130 | 10.5 | 2 |
| 11 | HBV-143 | 10.5 | 2 |
| 12 | HBV-152 | 10.5 | 2 |
| 13 | HBV-155 | 10.5 | 2 |
| 14 | HBV-85 | 10.5 | 2 |
| 15 | HBV-132 | 10.5 | 2 |
| 16 | HBV-133 | 10.5 | 2 |
| 17 | HBV-154 | 10.5 | 2 |

Protocolo de preparación de mezcla master mix-ADN en laboratorio para la amplificación.

Preparación de mezcla Master mix-ADN y controles para la amplificación

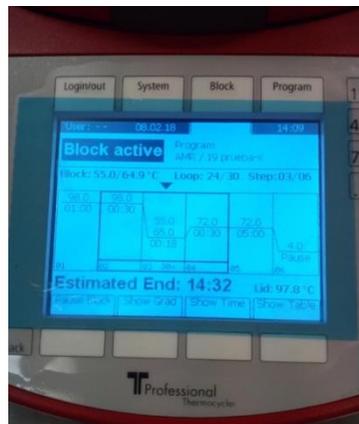
49



ANEXO IV.

50

En la pantalla del termociclador (BIOMETRA T PROFESIONAL), en modo gráfica se pudo ver el proceso, en que paso se encontraba y cuantos ciclos se habían realizado, además del tiempo restante.





| X1 | X5.3rxn ´s | Reactivo | [Final] | |
|-------------|----------------|--|---------|------------------------|
| Vol.µl | [Inicial] | | | |
| | Vol. µl | | | |
| - | | H ₂ O inyectable | - | 16.5 |
| 10X | | Taq Buffer ((1.5 mM MgCl ₂)) | 1X | 2.5 |
| 10mM | | dNTP ´s | 0.2 mM | 0.5 |
| 10 µM | | Primer Forward HBV 27-X-F | 0.2 µM | 0.5 |
| 10 µM | | Primer Reverse HBV 10R | 0.2 µM | 0.5 |
| 5U/µl | | Enzima Kapa Taq DNA pol Biosystem | 0.1 U | 0.5 |
| - | | PRODUCTO PCR 1* | - | 4 |
| | | | | Volumen Final = |
| 25µl | 111.5µl | | | |

ANEXO V.

52

Protocolo para la preparación de la master mix de la PCR interna.

*El producto de la PCR externa se agrega a la master mix en el laboratorio



| Tubo | Muestra | Master mix(μ l) | Vol. μ l |
|------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| 1 | Negativo campana | 5.25 | 1 de H ₂ O |
| 2 | Negativo Laboratorio | 5.25 | 1 de H ₂ O |
| 3 | Producto PCR1 C ⁺ HBV-91 | 5.25 | 1 |
| 4 | Producto PCR1 HBV-156 | 21 | 4 |
| 5 | Producto PCR1 HBV-160 | 21 | 4 |
| 6 | Producto PCR1 HBV-163 | 21 | 4 |



| | | | |
|----|------------------------------|----|---|
| 7 | Prod. de PCR1 HBV- 164 | 21 | 4 |
| 8 | Prod. de PCR1 HBV- 86 | 21 | 4 |
| 9 | Prod. de PCR1 HBV- 104 | 21 | 4 |
| 10 | Prod. de PCR1 HBV- 130 | 21 | 4 |
| 11 | Prod. de PCR1 HBV- 143 | 21 | 4 |
| 12 | Prod. de PCR1 HBV- 152 | 21 | 4 |
| 13 | Prod. de PCR1 HBV- 155 | 21 | 4 |
| 14 | Prod. de PCR1 HBV- 85 | 21 | 4 |
| 15 | Prod. de PCR1 HBV- 132 | 21 | 4 |
| 16 | Prod. de PCR1 HBV- 133 | 21 | 4 |
| 16 | Prod. de PCR1 HBV- 154 | 21 | 4 |

Protocolo de preparación de tubos con el producto de PCR externa para amplificar.

ANEXO VI

Proceso de electroforesis:

a) Preparación de cámara de electroforesis

54

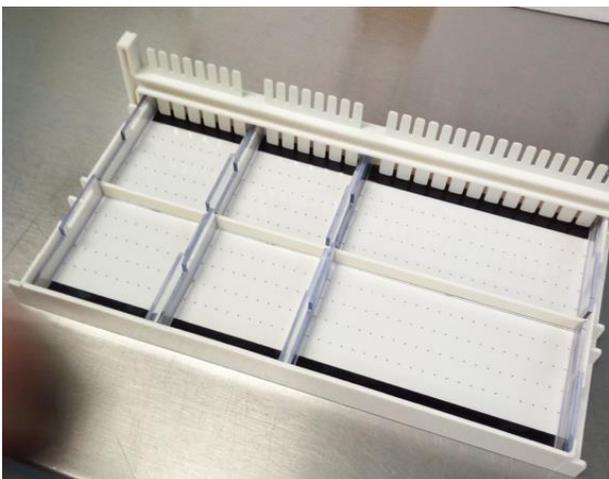
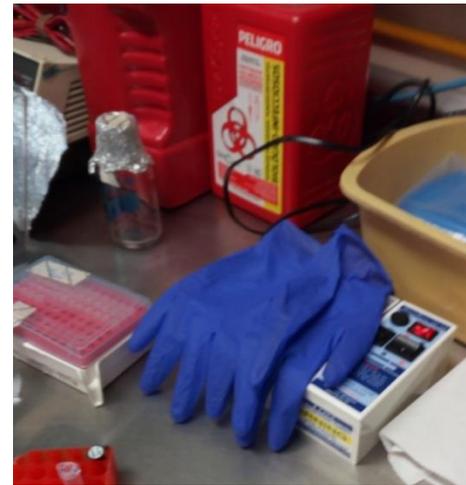


b) Carga de productos de PCR para agregar el gel a solidificar interna y buffer de carga



c) Aplicación de voltaje para el corrimiento

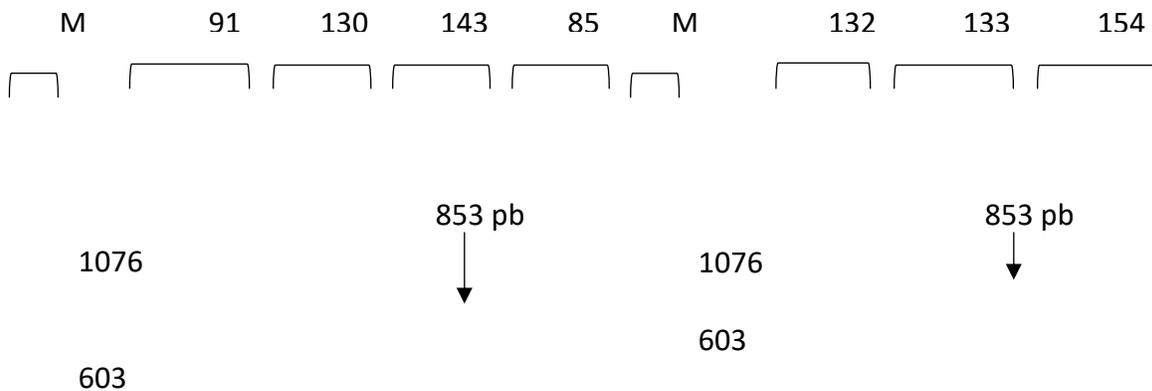
d) Visualización de la placa de los productos de PCR en el gel.
Gel con los fragmentos de los productos de PCR interna



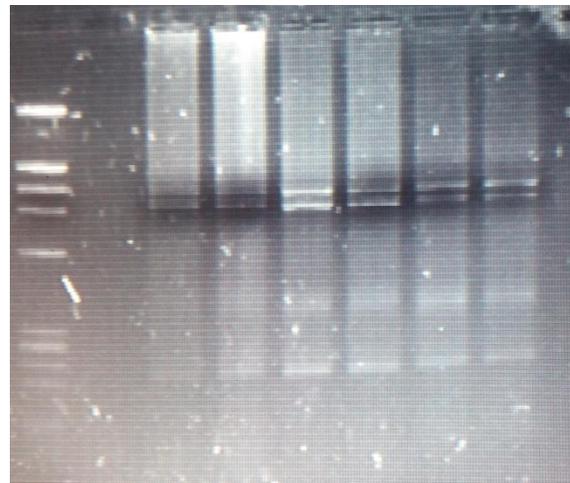
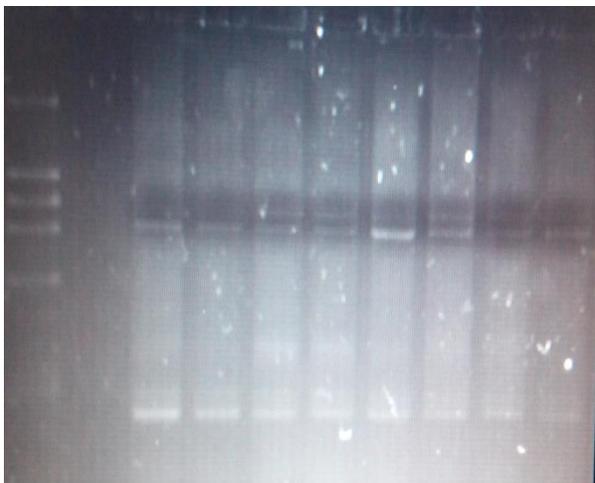
ANEXO VII

- a) Gelificado de gel de agarosa 2% y cargado de
- b) Corrimiento de fragmentos a purificar muestras en cámara de electroforesis con de HBV, con voltaje de 100 volt. Buffer de carga LB6x.

56



- c) Visualización de las bandas correspondientes a los fragmentos a purificar de la región x del genoma HBV, de los productos de la PCR interna.



ANEXO VIII

Procedimiento de purificación y cuantificación de los fragmentos de ADN a purificar:

57



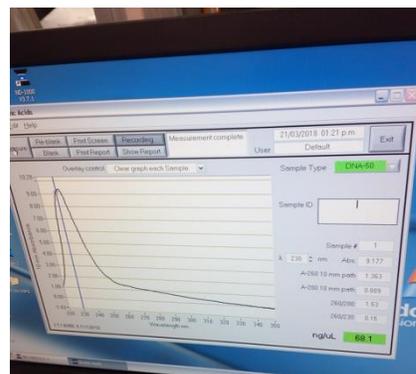
a) Fragmentos de ADN en proceso en concentrador de purificación



b) Secado de columnas

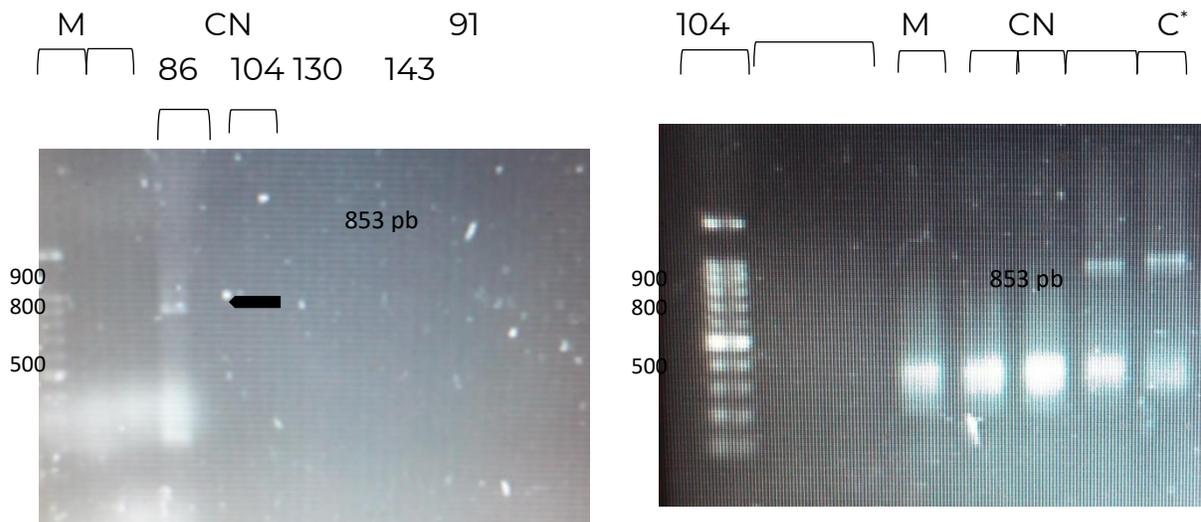
c) Cuantificación de los fragmentos de ADN purificados por espectrofotometría en NanoDrop 1000

58



ANEXO IX

Visualización de la amplificación de los productos de PCR interna de las muestras de pacientes con HBV crónica.



a) Visualización de la amplificación de producto
gel con amplificación de PCR interna de HBV. M: marcador
Producto de PCR interna de HBV. M:

CN: control neg.; 91: HBV-91; 104: HBV-104
molecular 100 pb; CN:

Amplificada HBV91.

+ HBV-91; 86

130: HBV-130;

últimas,

b) Visualización del
gel con amplificación de PCR interna de HBV. M: marcador
Producto de PCR interna de HBV. M:

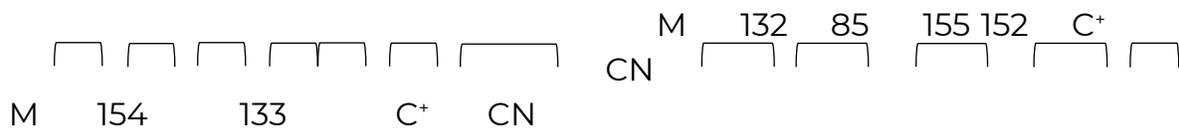
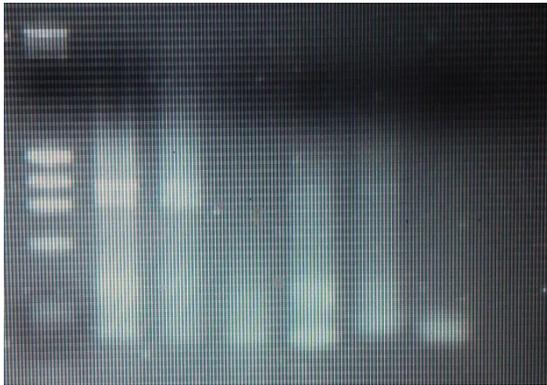
marcador de peso

controles neg.; C⁺ control

HBV-86; 104: HBV-104;

143: HBV-143, estas dos

amplificadas.



c) Visualización del gel de amplificación de
 1078 853 pb producto de
 603 HBV. M: de producto
 marcador QL; 132: HBV-132; 85: HBV-85
 133: HBV-
 (amplificadas) 155: HBV-155; 152:
 HBV-152; C⁺: HBV9]; CN: control neg.
 amplificados.

d) Visualización del gel con
 amplificación 853 pb
 PCR interna de
 PCR interna de HBV. M:
 marcador QL; 154: HBV-154;
 133; C⁺: HBV-9]; CN: control neg.
 Todos los fragmentos