

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE
LA POLIMERASA PARA DETECCIÓN DEL VIRUS DE
HEPATITIS B

PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO
DE:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

EMILIA ALEJANDRA ESPÍN JARAMILLO

Director: DR. EDMUNDO ESTÉVEZ

Codirector: DR. ÁNGEL GUEVARA

SANGOLQUÍ, MARZO DE 2008

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Sra. EMILIA ALEJANDRA ESPÍN JARAMILLO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, Marzo de 2008

DR. EDMUNDO ESTÉVEZ

DR. ÁNGEL GUEVARA

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

EMILIA ALEJANDRA ESPÍN JARAMILLO

COORDINADOR DE LA CARRERA

DRA. MARBEL TORRES

SANGOLQUÍ, MARZO 2008

DEDICATORIA

Hay hombres que luchan un día y son buenos,
Hay otros que luchan un año y son mejores,
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos,
Pero hay quienes luchan toda su vida,
esos son los imprescindibles.

Bertolt Brecht

Para mi madre, mi hijo, mi amigo y esposo por quienes lucharé toda mi vida.

Emilia Espín

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial para todas personas que participaron en este proyecto:

Dr. Vinicio Navas responsable del laboratorio de biología molecular en la Universidad Tecnológica Equinoccial, por abrirme las puertas y darme todo su apoyo.

Dr. Víctor Hugo Espín por darme la oportunidad de realizar este proyecto y apoyarme, aconsejarme y confiar en mi.

Dr. Edmundo Estévez por tomar la dirección de este proyecto y el apoyo siempre abierto del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador.

Dr. Ángel Guevara por transmitir su conocimiento, como codirector del presente proyecto.

A los laboratorios colaboradores especialmente a Baxter porque muy pacientemente accedieron a donar muestras de sus pacientes.

Ing. Giovanni Vergara por ayudarme en todo lo posible y crear un camino de lucha y perseverancia.

Ing. Andrés Izquierdo por transmitir sus conocimientos conmigo para el presente trabajo.

Un gran agradecimiento para personas muy allegadas a mi y que también ayudaron a que pueda realizar mi carrera y mi tesis:

Mi hijo por ser mi fuente de fe y lucha.

Mi madre por apoyarme y confiar en mi sin medida.

Sarita Cedeño porque siempre puedo contar con su apoyo y ayuda.

Mis compañeros que me ayudaron en mi carrera y en momentos especiales vividos en estos años.

Emilia Alejandra Espín Jaramillo

INDICE DE CONTENIDOS

1. CAPITULO 1:	1
Justificación e importancia	1
Objetivos	2
Objetivo General	2
Objetivos Específicos	2
Marco Teórico	2
1.3.1 Virus de Hepatitis B	2
1.3.1.2 Genotipos y Mutaciones	3
1.3.1.3 Replicación Viral	4
1.3.1.4 Transmisión, causas, incidencia y factores de riesgo	6
1.3.1.5 Marcadores Serológicos	7
1.3.1.5.1 Antígeno de Superficie	7
1.3.1.5.2 DNA del Virus de Hepatitis B	8
1.3.1.5.3 Antígeno de core	9
1.3.1.5.4 Antígeno e	9
1.3.1.6 Anticuerpos frente al antígeno	9
1.3.1.6.1 Anticuerpo frente a core	9
1.3.1.6.2 Anticuerpo frente a core tipo IgM	9
1.3.1.6.3 Anticuerpo frente a Antígeno de superficie	10
1.3.1.6.4 Anticuerpo frente a Antígeno e	10
1.3.1.7 Manifestaciones clínicas	11
1.3.1.7.1 Hepatitis Aguda	11
1.3.1.7.2 Hepatitis Crónica	11
1.3.1.7.3 Portador Asintomático	14

1.3.1.8	Análisis de resultados en la evolución de la infección	15
1.3.1.9	Infección oculta por el Virus de Hepatitis B	16
1.3.1.10	Epidemiología	17
1.3.2	Métodos de Biología Molecular	18
1.3.2.1	Reacción de polimerasa en cadena	18
1.3.2.1	Electroforesis	21
2.	CAPITULO 2: Materiales y Métodos	21
2.1	Toma de muestras y estudio de la población	21
2.2	Extracción de ADN	21
2.3	Amplificación del ADN	24
2.4	Visualización de ADN en gel de agarosa	28
3.	CAPITULO 3: Resultados	31
4.	CAPITULO 4: Discusión	34
5.	CAPITULO 5: Conclusiones	35
6.	CAPITULO 6: Recomendaciones	37
7.	CAPITULO 7: Bibliografía	39
8.	ANEXOS	41

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de los genotipos según la zona geográfica.

Tabla 2. Pruebas primarios y secundarios para el diagnóstico y monitoreo de la infección del Virus de Hepatitis B.

Tabla 3. Marcadores serológicos de la hepatitis B en diferentes fases de la infección.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Casos de Hepatitis B en el Ecuador, Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

Figura 2. Genoma del virus de Hepatitis B. Genómica y proteómica del virus de Hepatitis B.

Figura 3. Construcción y replicación del virus de Hepatitis B.

Figura 4. Características de evolución de la infección crónica del virus de hepatitis B.

Figura 5. Pacientes susceptibles a tratamientos

Figura 6. Curso de los marcadores serológicos en la infección aguda de hepatitis B con resolución.

Figura 7. Distribución geográfica de hepatitis B crónica

Figura 8. Reacción de Polimerasa en cadena

Figura 9. Termociclador progene.

Figura 10. Gel de Agarosa 2%. *Emilia Espín.*

Figura 11. Carga del ADN amplificado en el gel de agarosa previa corrida electroforética. *Emilia Espín.*

Figura 12. Esquema de Marcador Molecular de 100pb. *Emilia Espín.*

Figura 13. Gel de Electroforesis Horizontal, corrida electroforética de ADN amplificado. *Emilia Espín.*

Figura 14. DyNa Light Dual Intensity UV Transilluminator.

Figura 15. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-5= pacientes con Hepatitis B, 6=vacunado, 8=no vacunado, C-=Control Negativo. *Emilia Espín.*

Figura 16. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-5= pacientes con Hepatitis

B, 6=vacunado, 8=no vacunado, C=Control Negativo. Comparación entre dos concentraciones de cloruro de magnesio, 1,8mM y 2mM respectivamente se observa en la segunda gráfica bandas más claras como se observa en la figura 15. *Emilia Espín*.

Figura 17. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-3= pacientes con Hepatitis B, V=vacunado, C=Control Negativo. *Emilia Espín*.

Figura 18. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-3= pacientes con Hepatitis B, V=vacunado, C=Control Negativo. Un paciente amplifica la banda de 447pb Luego de tres días de ser almacenada a $-20^{\circ}C$. *Emilia Espín*

Figura 19. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-9= pacientes con Hepatitis B, 10=vacunado, 11=no vacunado, C=Control Negativo. *Emilia Espín*

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Vacunación en Ecuador Incluye Vacuna para Hepatitis B a partir del año 2003.

Anexo 2. Kit de Extracción de ADN/ARN INVITROGEN.

RESUMEN

En el presente trabajo se busca desarrollar la técnica reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificar virus de hepatitis B (VHB). Por su sensibilidad y especificidad, la PCR se basa en la amplificación de una región específica del genoma del virus cientos de veces y de esta forma poder visualizar este ADN por medio de bandas electroforéticas en geles de agarosa (2%). En el ensayo tomamos muestras sanguíneas de 28 pacientes de hospitales y laboratorios de la ciudad de Quito, los cuales se les diagnosticó hepatitis B y se realizaron pruebas de antígeno de superficie y antígeno de envoltura del virus por medio de ELISA.

Resultados: el 100% de los pacientes resultó positivo a la prueba de elisa para antígeno de superficie, el 57% resultó positivo para antígeno de envoltura, un porcentaje mayor al 80% resulta positivo en PCR, y presenta una banda de 447pb en gel de agarosa al 2%.

Palabras claves: Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR), Antígeno de Superficie (HBsAg), Antígeno de envoltura (HBeAg), Virus de Hepatitis B (VHB).

ABSTRACT

In the present project we used polymerase chain reaction (PCR) to detect hepatitis B virus (HBV) in human blood samples. PCR is a sensitive and specific for amplifying a sequence of HBV DNA hundreds of times allow us DNA visualization in 2% agarose gel electrophoresis. Samples from 28 patients infected by HBV and confirmed by ELISA to detect antibodies to hepatitis B surface antigen (HBsAg) and e-antigen (HBeAg).

Results: 100%, which were considered positive for surface antigen, 57% were considered positive for e-antigen, and 81% were positive for PCR, showing 447bp in agarose gel (2%).

Key words: Polymerase Chain Reaction (PCR), Antigen Surface (HBsAg), e-Antigen (HBeAg), and Hepatitis B Virus (HBV).

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

Justificación e importancia

El virus de hepatitis B según el ministerio de salud pública del Ecuador ¹es causante de infectar a 3658 personas desde el año 1996 hasta el 2005, en la figura 1 se representa un crecimiento de casos en los últimos años (18).

La identificación inicial del virus es por medio de pruebas serológicas de inmunoensayo como ELISA, la biología molecular nos ofrece una técnica sensible a bajas cantidades de ADN y específica para el virus de interés como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el desarrollo de técnicas como esta son utilizados como complemento para otras pruebas, seguimiento de la infección, y respuesta a tratamientos antivirales.

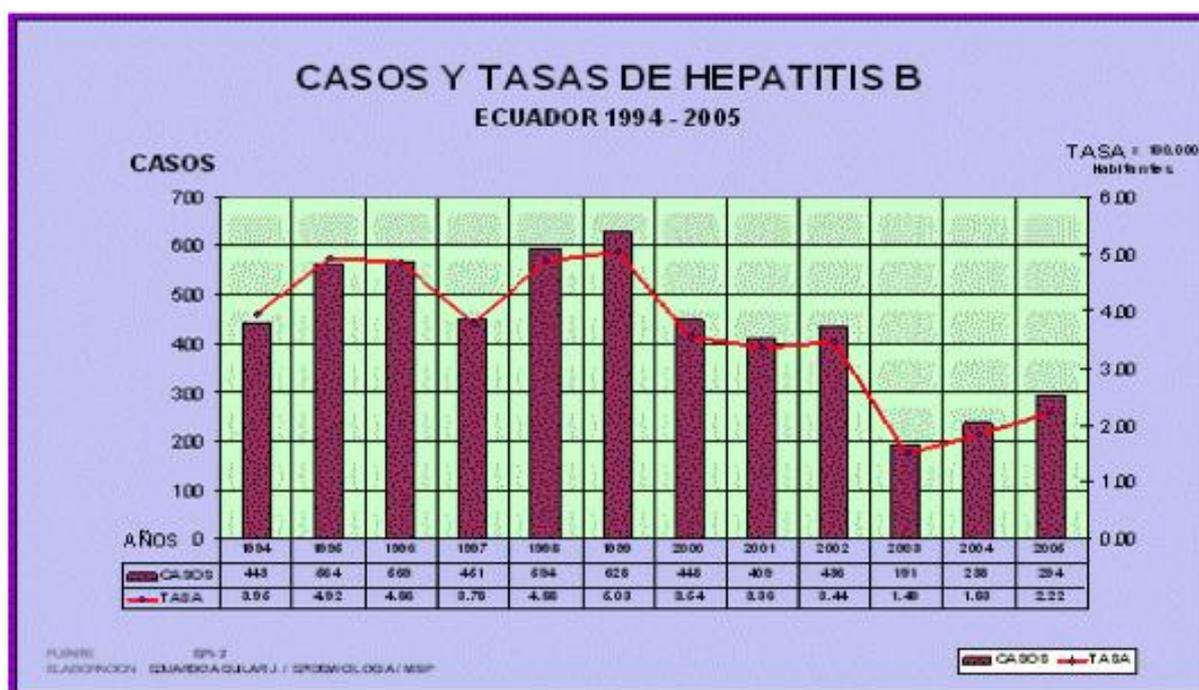


Figura 1. Casos de Hepatitis B en el Ecuador, Ministerio de Salud Pública del Ecuador (18).

¹ <http://www.msp.gov.ec/web/informacion.asp?cod=24>

Objetivos

Objetivo General

Estandarizar un protocolo de detección del ADN del virus de Hepatitis B mediante la técnica PCR.

Objetivos Específicos

- Optimizar las temperaturas, concentraciones, ciclos para correcta amplificación de ADN viral en PCR.
- Localizar pacientes diagnosticados con hepatitis B que sean positivos en pruebas de inmunoensayo para los antígeno de superficie y antígeno e del virus.
- Realizar la extracción de ADN del virus de sangre periférica de pacientes con Hepatitis B.
- Determinar los amplicones para amplificación de ADN viral.
- Visualizar el ADN amplificado y bandas específicas en gel de agarosa.
- Determinar parámetros de muestra como selección y manejo de la misma.

Marco Teórico

1.3.1 Virus de Hepatitis B

Pertenece a la familia de hepadnaviridae, es exclusivamente un virus de ADN, posee aproximadamente 3,200 pb, que constituyen una doble cadena siendo una de ellas más corta que la otra, a su genoma se lo ha dividido en cuatro regiones: S, C, P y X (Figura 2) estos fragmentos de lectura abierta contienen los genes necesarios para codificar las proteínas de envoltura viral, cápside, antígeno e, polimerasa y proteína X (1).

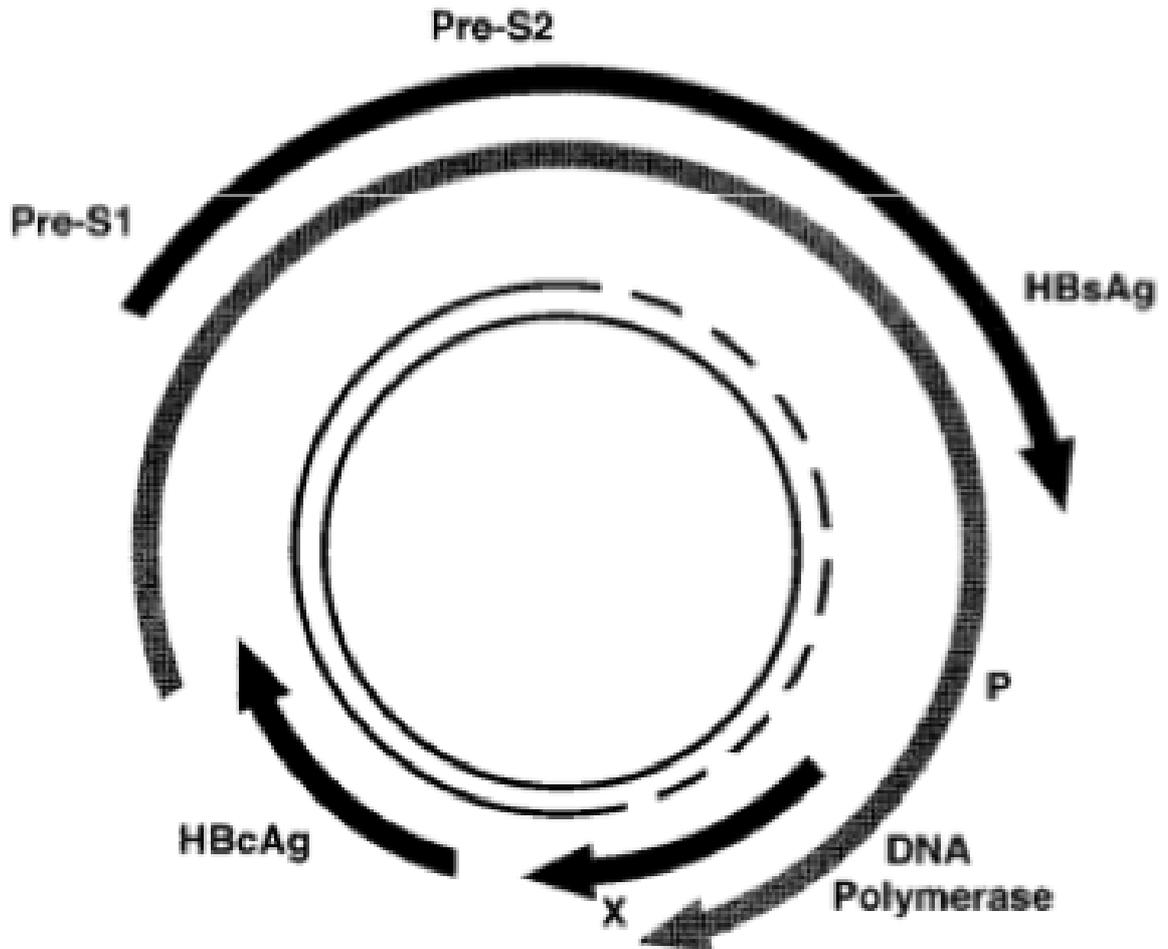


Figura 2. Estructura y organización del genoma de Virus de Hepatitis B (6).

Este virus no es citolítico y la destrucción de las células no depende de la actividad propiamente dicha del virus sino por el contrario de la respuesta de los linfocitos T citolíticos a la infección viral, de esta forma provocando la lesión tisular (4), por lo que el virus causa infección noncytotoxic* crónica (3).

1.3.1.2 Genotipos y mutaciones

Se presentan 7 tipos de genotipos de acuerdo con una divergencia entre ellos mayor al 8%, así son denominados desde la letra A a la G, estos se presentan en correspondencia el área geográfica como se puede observar en la Tabla 1(2).

* La respuesta inmunológica provocada por el virus puede resultar de la relación entre citocinas u otras sustancias con potencial antiviral, sin necesidad de causar daño a la célula infectada.

Tabla 1. Prevalencia de los genotipos según la zona geográfica. *Serra Miguel A.(2)*

Genotipo	Subtipo	Distribución geográfica predominante
A	<i>Adw2, ayw1</i>	Noroeste de Europa Norteamérica y África Central
B	<i>Adw2, ayw1</i>	Sudeste de Asia, China y Japón
C	<i>ayr, adrq+, adrq- adw2</i>	Sudeste de Asia, China y Japón
D	<i>Ayw2, ayw3</i>	Sur Europa, Oriente Medio e India
E	<i>Ayw4</i>	África
F	<i>Adw4q-</i>	Nativos americanos, Polinesia, América Central y Sur
G	<i>Adw2</i>	Francia y Estados Unidos

En la actualidad se habla de la importancia de estos genotipos en el desarrollo de la enfermedad ya que cada uno al parecer tiene una diferente forma de desarrollar daño hepático, en la seroconversión y respuesta a tratamientos(2).

1.3.1.3 Replicación Viral

Los hepatocitos constituyen el medio celular en el cual se da la replicación del VHB, el primer evento es la conversión del rcDNA (ácido desoxirribonucleico circular relajado)² viral a cccDNA (ácido desoxirribonucleico circular covalente)³, esta transformación mediada por mRNA viral constituye el inicio de la infección a nivel de las primeras 24 h de exposición. La ligación de las cadenas de DNA se valen de la transcriptasa reversa desde el extremo 5' catalizada por la polimerasa del propio virus, seguido de una hidrólisis o endonucleasa para cerrar el extremo 5'. Este paso puede ocurrir tanto antes como después de la translocación del DNA viral a través de la membrana nuclear. El RNA viral incluye un RNA pregenómico (pgRNA), el cual sirve como modelo para la transcripción reversa como también para la traducción de las

² Siglas en inglés "relaxed circular deoxyribonucleic acid".

³ Siglas en inglés "covalently closed circular deoxyribonucleic acid"

proteínas de envoltura, posteriormente generando la cadena complementaria y la producción de proteínas virales (3).

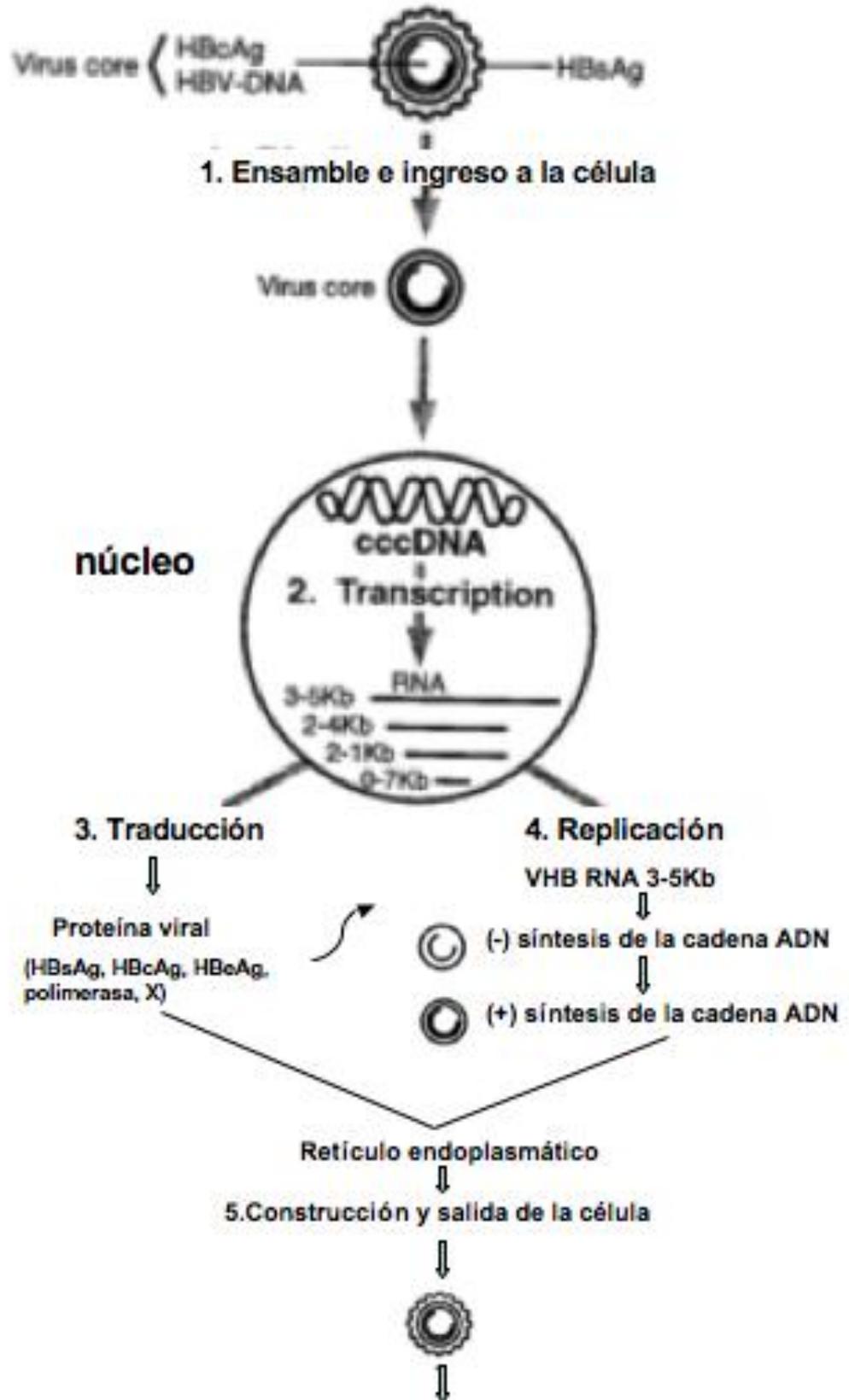


Figura 3. Construcción y replicación del virus de Hepatitis B (6).

Tanto en la hepatitis aguda como crónica existen dos transcripciones predominantes una de 2,1kb y otra de 3.5kb (23).

- 2,1kb RNA: tiene varios sitios de iniciación de transcripción con envergaduras para la iniciación del codón de traducción para el desarrollo de proteínas como de sitios de poliadenilación en el genoma del virus, en esta región se codifica la mayor parte de las proteínas de antígeno superficie (23).

- 3,5kb RNA: posee también sitios de iniciación y envergaduras de iniciación del codón para secuencia precore, las cuales preceden a fragmentos de lectura abierta de HBcAg. Antes de la iniciación del codón se produce la proteína HBeAg/P18, mientras que después de la iniciación del codón precore codifica HBcAg/P21 la cual es la mayor proteína de la nucleocápside, a su vez aquí podemos encontrar los RNAs que codifican la VHB ADN polimerasa (23).

Otras transcripciones de 0,7kb se presume son la iniciación de fragmentos de lectura abierta para el gen X, que es sintetizado en algún estado durante la infección, se sugiere por pruebas en virus de hepatitis B en patos y ratones que el gen X posee una importante función en el ciclo de vida del virus (23).

Una de las mutaciones más importantes es aquella que se produce en la región precore-core, debido a que esta región es la responsable de la síntesis de la proteína core, el cual interviene en la ausencia de la producción del antígeno de envoltura (HBeAg). A nivel de los codones 1856, 1898, 1899 responsables del mismo cambio serológico como también de la ausencia de la proteína core, por lo tanto de la ausencia de anticuerpos anti-HBc. Una mutación que afecta y condiciona la forma viral frente a los anticuerpos inducidos por vacunación no protege al individuo vacunado esta en la posición 145 que afecta a la proteína S. Un factor influyente el las mutaciones han sido los diferente tratamientos antivirales produciendo resistencia a los fármacos dando lugar a la replicación viral y daño histológico. (2).

1.3.1.4 Transmisión, causas, incidencia y factores de riesgo

Transmisión:

Por *vía parental* a través de transfusiones o de productos sanguíneos, cualquier fluido o secreción corporal puede transmitir el VHB si contiene sangre o suero. En adolescentes y adultos la *transmisión sexual* constituye un mecanismo frecuente de transmisión, por *vía vertical o materno-fetal* de una madre con infección aguda o lo que es más frecuente portadora crónica a su hijo, el momento del parto al entrar en contacto el neonato con la sangre o secreciones maternas contaminadas por el VHB, si la madre es HBsAg(+) o HBeAg(+) la probabilidad de transmisión es de 60-90%, si es HBsAg(+) o HBeAg(-) la probabilidad de transmisión es de 5-30%, la *transmisión horizontal* entre personas que conviven en el mismo espacio, se debe al contacto de sangre o fluidos orgánicos contaminados. La transmisión a través de transfusiones de sangre y hemoderivados es muy poco probable por las medidas que se toman en los bancos de sangre, también la acupuntura, tatuajes, perforaciones y piercing constituyen medios de transmisión (22).

La mayoría de las infecciones de hepatitis B son resultado de la actividad sexual, uso e ingestión de drogas, o exposición laboral. Otras causas, pero menos frecuentes de la infección incluyen contacto dentro de la familia, hemodiálisis, transmisión por una cirugía, y trasplante de órganos o productos de la sangre. No se encuentran claros factores de riesgo en un 29 o 30% de los pacientes, tal vez por el bajo reporte que existe de otras posibilidades de contacto como mucosa u otra no reconocida ruta de infección. Teniendo en cuenta el VHB esta presente en el suero por grandes cantidades (10^8 a 10^{10} viriones por mililitro), por lo que no es sorprendente detectarlo en semen, saliva, secreciones cervicales, y leucocitos (5).

1.3.1.5 Marcadores Serológicos

1.3.1.5.1 Antígeno de Superficie (HBsAg)

Su aparición denota una clara infección, en caso de hablar de una hepatitis B crónica se deben realizar otros marcadores y se puede repetir la prueba en seis meses (8). Puede resultar negativo en tres casos especiales, cuando la infección es reciente a

penas un mes de exposición, segundo cuando el HBsAg a desaparecido y aún no ha aparecido su correspondiente anticuerpo anti-HBsAg, y finalmente si existe alguna mutación que evita la síntesis de HBsAg (2).

En la tabla 2 el HBsAg puede aparecer en el período de incubación, infección aguda o crónica, y constituye el inicial marcador serológico para determinar un diagnóstico.

Tabla 2. Pruebas primarias y secundarias para el diagnóstico y monitoreo de la infección del Virus de Hepatitis B, †puede ser positivo en pacientes con infección crónica, ‡pacientes con infección Crónica, §técnicas para detección difieren en sensibilidad y estandarización.(8).

	Marcador	Período de incubación	Infección Aguda	Infección Pasada	Infección Crónica	Vacunación
Diagnóstico primario	HBsAg	±	+	-	+	-*
	Anti-HBs	-	-	+	-	+
	Anti-HBc Total	-	±	+	+	-
	Anti-HBc IgM	-	+	-	±†	-
Pronóstico o monitoreo	HBeAg	±	+	-	±	-
	Anti-HBe	-	-	±	±‡	-
	HBV-DNA	±§	+	±§	±§	-

1.3.1.5.2 DNA del virus de hepatitis B

La presencia de ADN en suero indica actividad replicativa del virus, dependiendo de la carga viral, esta relacionada con la infectividad del paciente. Se lo usa para valorar pronóstico y evolución de tratamientos antivirales(8).

1.3.1.5.3 Antígeno core

Se puede detectar su presencia en la biopsia hepática por medio de técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa, en el núcleo celular, sin embargo debido al desarrollo de técnicas moleculares para detección de ADN, esta proteína es de poca utilidad clínica(2).

1.3.1.5.4 Antígeno e (HBeAg).

Este marcador resulta de la unión de la proteína core y precore, por lo que puede llegar a medir de 25 a 17 kDa, su positividad por métodos de enzimoanálisis va unida casi invariablemente con la replicación viral, sin embargo se puede relacionar la presencia de este antígeno e con ciertos estados de la enfermedad, *HBeAg* +: Cepa salvaje, *HBeAg* -: Mutante pre-core ya que por ello no es sintetizado, *HBeAg* +: portado inactivo (2).

1.3.1.6 Anticuerpos frente al antígeno

1.3.1.6.1 Anticuerpo frente a Antígeno core (anti-HBc).

Aparece en respuesta al HBcAg casi seguido de la aparición de HBsAg, es muy sensible a pruebas de inmunoanálisis y es un claro indicativo de la infección puede durar hasta dos años después su aparición(2).

1.3.1.6.2 Anticuerpo frente a antígeno core tipo IgM (anti-HBc IgM).

Este antígeno constituye un indicativo usado para determinar hepatitis B aguda, algunas veces aparece cuando hay replicación viral en hepatitis B crónica. Como también en algunos pacientes con ausencia de otros marcadores serológicos, lo

cual puede deberse a que el paciente esté en un período de ventana⁴, una reacción inespecífica a componentes séricos, o respuesta inmunitaria incompleta(9).

1.3.1.6.3 Anticuerpo frente a Antígeno de superficie (anti-HBs).

Presente debido a una infección pasada, como también se presenta en sujetos vacunados, puede permanecer varios años activo, se detecta por pruebas de inmunoensayo y su titulación superior a 10 UI, se lo considera como protección para el individuo (9).

1.3.1.6.4 Anticuerpo frente a antígeno e

Su presencia denota un poca o nula actividad replicativa, y se lo ha utilizado en conjunto con marcadores de DNA viral en respuesta a la infectividad (9), decisiones terapéuticas o para identificar cepas mutantes (2).

En la figura 4 podemos observar la parición de los antígenos y sus respectivos anticuerpos según el transcurso del tiempo se puede observar que el HBsAg permanece por años, lo cual nos permite establecerlo como factor para segregación de pacientes.

⁴ período entre la desaparición del HbsAg a su respectivo anti-HBs.

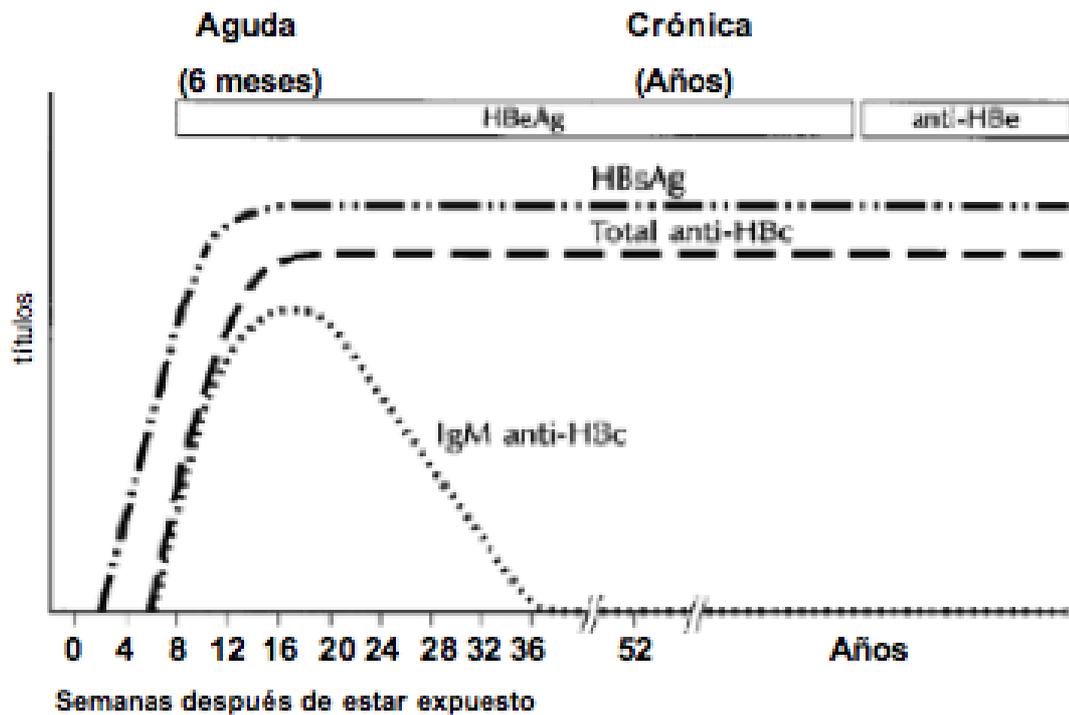


Figura 4. Características de evolución de la infección crónica del virus de hepatitis B (6).

1.3.1.7 Manifestaciones clínicas

1.3.1.7.1 Hepatitis Aguda

Se estima que se dan de 140000 a 400000 nuevos casos de hepatitis B aguda ocurren anualmente en Latinoamérica (7). Las consecuencias de la infección aguda por VHB son altamente variables. Los rangos del período de incubación van desde 6 semanas a 6 meses, y el desarrollo de manifestaciones clínicas es altamente dependiente de la edad. Recién nacidos generalmente no desarrollan ningún signo o síntoma, solo el 5 a 15 % desarrolla la enfermedad entre 1 y 5 años de edad. Niños mayores y adultos presentan síntomas entre 33 a 50%. Infecciones sintomáticas varían desde un leve o terminal desarrollo de la enfermedad. Síntomas y signos clínicos de la infección aguda por VHB incluyen fiebre, anorexia, náusea, malestar, vómito, ictericia, orina oscura, palidez y dolor abdominal. Otras manifestaciones no muy comunes son dermatitis (sarpullido), dolor de las articulaciones y artritis. La hepatitis fulminante ocurre aproximadamente del 1 a 2% de personas con enfermedad aguda y casos de

muerte de 63 a 93% (6). Los pacientes con hepatitis aguda resultan ser positivos al antígeno de superficie y se requiere la presencia de anticuerpo anti-HBc tipo IgM como una segunda prueba esencial (2).

1.3.1.7.2 Hepatitis Crónica

Según el instituto Nacional de Salud (siglas en inglés NIH), define a hepatitis crónica como una enfermedad necroinflamatoria⁵ de el hígado causada por persistencia de infección por parte del VHB. También a su vez la divide HBeAg positivo y HBeAg negativo. Se puede considerar como crónico después de pasar 6 meses de aparición de HBsAg, como también de la ausencia de anti-HBc tipo IgM. Aproximadamente el 5% de los adultos que adquieren la infección desarrollan hepatitis B crónica (6).

Hablando del caso en que HBeAg positivo suele venir acompañado de replicación viral constante, muchos de estos pacientes pueden terminar como portadores asintomáticos sin considerable daño hepático, puede seguirse de la conversión de HBsAg a su respectivo anti-HBs. Para aquellos HBeAg negativo reúnen todas las características de un paciente con hepatitis crónica pero debido a la mutación no es posible la síntesis de este antígeno(2).

Se puede reconocer tres fases evolutivas de replicación viral:

- Fase de elevada replicación viral: se caracteriza por la presencia de HBsAg, HBeAg, y de ADN del VHB con aumento de los niveles de transaminasas y una actividad inflamatoria en la histología hepática moderada, suele existir un riesgo elevado de desarrollar cirrosis (19).
- Fase de replicación viral baja: se asocia con la desaparición en suero de la disminución de la actividad inflamatoria en la histología hepática, esta seroconversión ocurre entre un 10 a un 20 % anualmente y se asocia con mejor pronóstico (19).

⁵ De acuerdo al “grado de enfermedad”, se asigna una puntuación numérica en base a: inflamación de tractos portales, necrosis y apoptosis del parénquima y fibrosis hepática.

- Fase de ausencia de replicación: en la que los marcadores en suero están ausentes y también la inflamación hepática, si ya se ha establecido cirrosis ésta persistirá indefinidamente (19).

Tratamiento

Existen al menos cinco opciones de tratamiento para la hepatitis B crónica, que incluyen interferón y antivirales lamivudina, adefovir, etecavir y clebudina, para iniciar un tratamiento se debe considerar los antecedentes clínicos y de laboratorio del paciente, como una decisión compartida entre el médico y el paciente (20).

- Interferón:

Para su uso están aprobados interferón alfa-2a y el interferón alfa-2b, poseen propiedades antivirales, inmunomoduladores y antiproliferativas (19).

El interferón es una sustancia normalmente producida por las células inmunes del organismo frente a infecciones, este medicamento se usa en inyecciones subcutáneas (20).

Es un tratamiento que puede tener bastantes efectos adversos, entre ellos está el denominado síndrome-flu, consiste en fiebre, mal estar, cansancio, artralgias y disminución de los leucocitos y de la plaqueta en el hemograma, también es frecuente depresión, insomnio, pérdida de peso, alopecia e irritabilidad (19), a pesar de ello cuando se logra una respuesta, ésta habitualmente es sostenida en el tiempo, no se puede usar cuando el paciente tiene una cirrosis descompensada⁶ (20).

- Lamivudina:

Este medicamento inhibe directamente al virus interfiriendo con la replicación viral, por su debido uso a largo tiempo puede causar la aparición de virus resistentes (mutación de la región YMDD de la polimerasa) (20), esta mutación deberá sospecharse cuando los niveles de ALT y de la AST aumenten de forma significativa

⁶ Caracterizada por la presencia de un dramático y complicado cuadro clínico que amenaza la vida del paciente como son la hemorragia por várices del esófago, ascitis, peritonitis bacteriana espontánea o encefalopatía hepática (21).

después de iniciar un descenso con la introducción del fármaco o con la reaparición del DNA del VHB (19).

- Adefovir:

De manera similar a la anterior inhibe la polimerasa viral, tiene potencial de dañar la función renal, por lo que debe vigilarse con exámenes periódicos, la posibilidad de generar mutantes en menor (20).

- Entecavir:

Posee una potente actividad antiviral y bajo desarrollo de resistencia, es bien tolerado, y se ha demostrado que tiene actividad contra virus HIV (20).

- Clevudina:

Constituye el más nuevo de los antivirales orales inhibidores de la polimerasa viral, su potencial antiviral no parece ser superior al adefovir y entecavir (20).

- Otros antivirales:

Incluyen emtricitabina, famciclovir, telbivudina, tenefovir y otros (20).

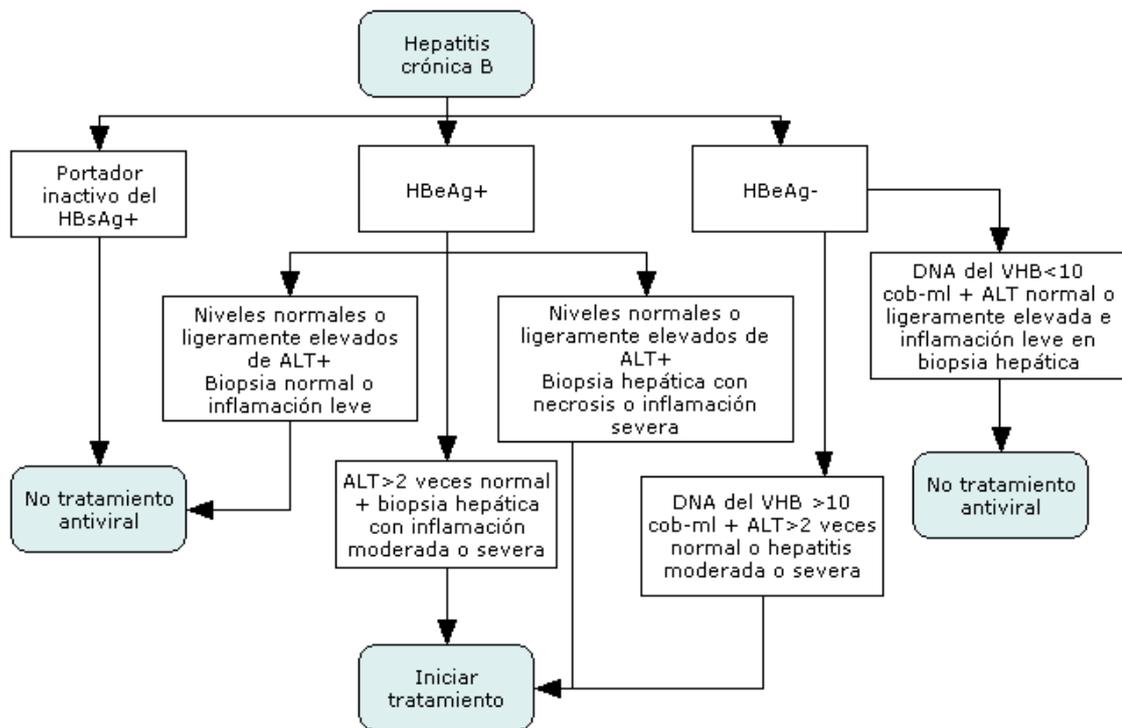


Figura 5. Pacientes susceptibles a tratamientos (19).

1.3.1.7.3 Portador Asintomático

Constituye un estado en el cual no se reflejan síntomas, puede mantener el HBsAg como HBeAg o su respectivo anti-HBeAg sin actividad necroinflamatoria aparente, aproximadamente del 1 al 2 % de estos pacientes pueden dejar su estado de portador y desarrollar daño hepático(2).

1.3.1.8 Análisis de resultados en la evolución de la infección

Un rol importante en el análisis de resultados esta los valores de transaminasas que pueden ser evaluados tanto en un inicio, sospecha como también en el transcurso de los diferentes manifestaciones clínicas (10); a continuación se puede observar la parición de las transaminasas (ALT) en valores representativos durante la hepatitis B aguda.

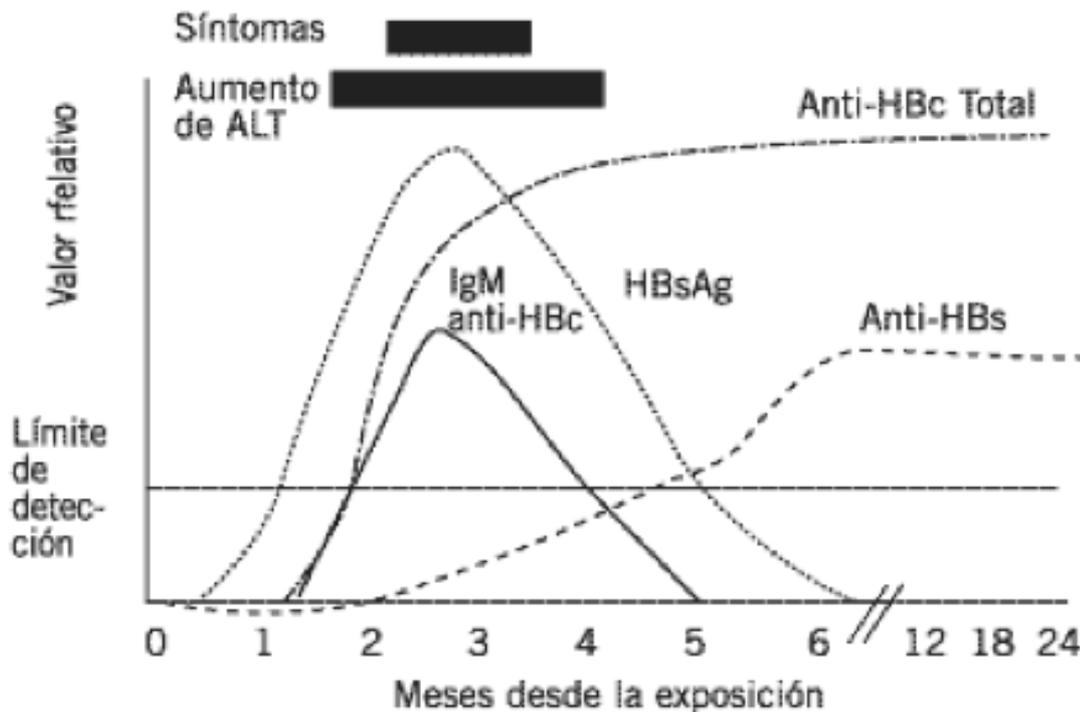


Figura 6. Curso de los marcadores serológicos en la infección aguda de hepatitis B con resolución (10).

“El primer marcador de la infección es HbsAg, luego de la exposición, aproximadamente 1-2 meses más tarde, la primera respuesta de anticuerpos son anticuerpos IgM para el antígeno core de la hepatitis B (IgM anti-HBc), generalmente alrededor del tiempo de incremento en las actividades de AST (Aspartato Aminotransferasa) y ALT en plasma. En el momento de aparición de la ictericia, la mayoría de los pacientes tienen ambos HBsAg y IgM anti-HBc. Con la eliminación del virus el anti-HBs se hace detectable. En un pequeño porcentaje de pacientes, suele haber un período de transición en el que no se pueden medir ni HBsAg ni anti-HBs, el único marcador comúnmente presente en este tiempo es IgM anti-HBc, un patrón denominado la “ventana core”. Con la recuperación de la infección HBV, anti-HBc y anti-HBs persisten durante toda la vida en la mayoría de los individuos”(10).

En la tabla 3 se resume un análisis para reconocer la fase de la infección de acuerdo con la presencia o ausencia de marcadores serológicos.

Tabla 3. Marcadores serológicos de la hepatitis B en diferentes fases de la infección (11).

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

1.3.1.9 Infección oculta por el Virus de Hepatitis B

Constituye un estado en el cual no existe presencia de marcadores serológicos y suele aparecer DNA viral en suero o más frecuentemente en células del hígado, en este estado se puede explicar la reaparición viral en momentos de inmunodeficiencia como la transmisión de hepatitis B por medio de trasplantes. Se puede retribuir la ausencia de antígeno de superficie a cambios en el genoma y en la expresión de la proteína S (2).

1.3.1.10 Epidemiología

Aproximadamente el 45% de la población mundial vive en áreas de prevalencia de hepatitis B crónica ($\geq 8\%$ de la población es HBsAg positivo), 43% vive en áreas de prevalencia moderada (2-7% de la población es HBsAg positivo), y el 12% vive en áreas de baja prevalencia (2% de la población es HBsAg positivo)(6). Figura 6.

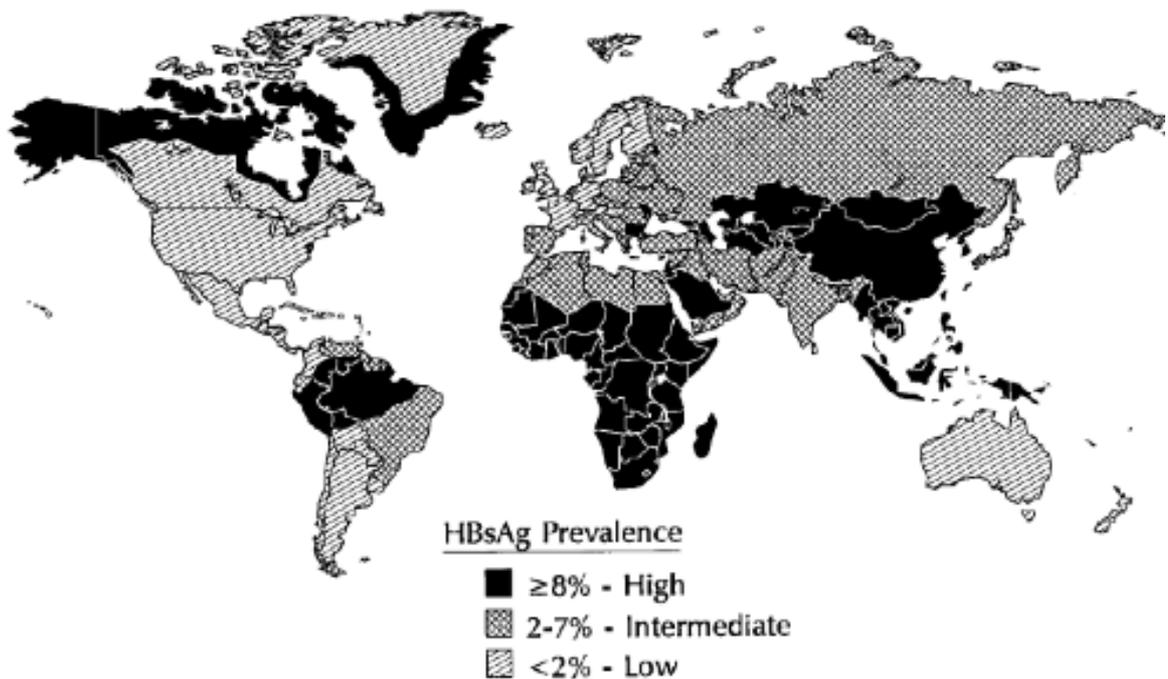


Figura 7. Distribución geográfica de hepatitis B crónica (6).

En áreas de alta prevalencia, el riesgo de contraer infección es del 60%, y la mayoría de infecciones ocurren en el nacimiento o durante los primeros años de vida, justamente cuando es riesgo de contraer hepatitis crónica es el más grande. Debido a que a temprana edad la mayoría de infecciones son asintomáticas allí es pequeña la apreciación de enfermedad aguda, el índice de enfermedad crónica al hígado y cáncer es alta. Áreas de alta prevalencia incluyen la mayor parte de Asia (a excepción de Japón e India), la mayoría de Medio Oriente, la Cuenca Amazónica de Sudamérica, la mayoría de islas del Pacífico, también otra especial población como nativos de Alaska, Aborígenes de Australia, y Maoris en Nueva Zelanda. En áreas de alta prevalencia donde el HBeAg entre mujeres embarazadas es baja (África, Suramérica y Medio oriente), problemas en el nacimiento contribuyen poco a la transmisión de HBV de niños infección crónica como temprana transmisión después del nacimiento. Generalmente en estas áreas del 1 a 2% de infantes desarrollan infección crónica y del 10 a 20% de infecciones crónicas entre niños resulta en el momento de nacimiento. Un grupo de alto riesgo incluye los homosexuales, uso de drogas intravenosas, personas quienes hayan tenido contacto heterosexual con múltiple parejas, contacto dentro de casa de personas con hepatitis, hemofílicos, pacientes de hemodiálisis y personal,

pacientes de largo tiempo con facilidad de contagio, persona con exposición a sangre y fluidos infecciosos, y personas ingresadas por incapacidad mental(6).

La vacunación ha permitido frenar el desarrollo de esta enfermedad en el mundo en nuestro país se implanta la vacuna pentavalente que incluye Difteria, tosfeina, tétanos, hepatitis B, Haemophylus influenzae tipo B, a partir del año 2003, sin embargo se debe tener en cuenta llevar un monitoreo para el anti-HBsAg, este anticuerpo nos permite reconocer si la persona esta inmunizada, la dosis de refuerzo son indispensables debido a que ciertas personas no desarrollan el anticuerpo aún después del tercer refuerzo, Anexo 1.

1.3.2 Métodos de biología molecular

1.3.2.1 Reacción de polimerasa en cadena

Mediante esta técnica se pueden obtener millones de copias de secuencias de ADN deseadas, debido a que estas secuencias se pueden encontrar en muy poca cantidad y son indetectables sin la previa amplificación(12).

La técnica de PCR (siglas en inglés) básicamente consta de tres fases principales:

- Desnaturalización: entre una temperatura de 93°C a 95°C el ADN se separa en cadenas sencillas(12).
- Alineamiento (hibridización o Annealing): es necesario que existan dos cebadores que serán los iniciadores de la síntesis de oligonucleótidos, generando la cadena complementaria tanto en el extremo 3` como 5`. Esta temperatura puede variar entre 50°C a 70°C dependiendo de la temperatura de fusión (Tm)⁷(12).

⁷ Tm de un oligonucleotido duplex se refiere a la temperatura en la cual el oligonucleótido esta 50% templado con su cadena complementaria (13).

- Extensión: los oligonucleótidos sintéticos actúan como iniciadores para que la ADN polimerasa sintetice el resto de la cadena con ayuda de los dNTP, esta temperatura puede variar entre 70°C a 75°C (12).
Figura 6.

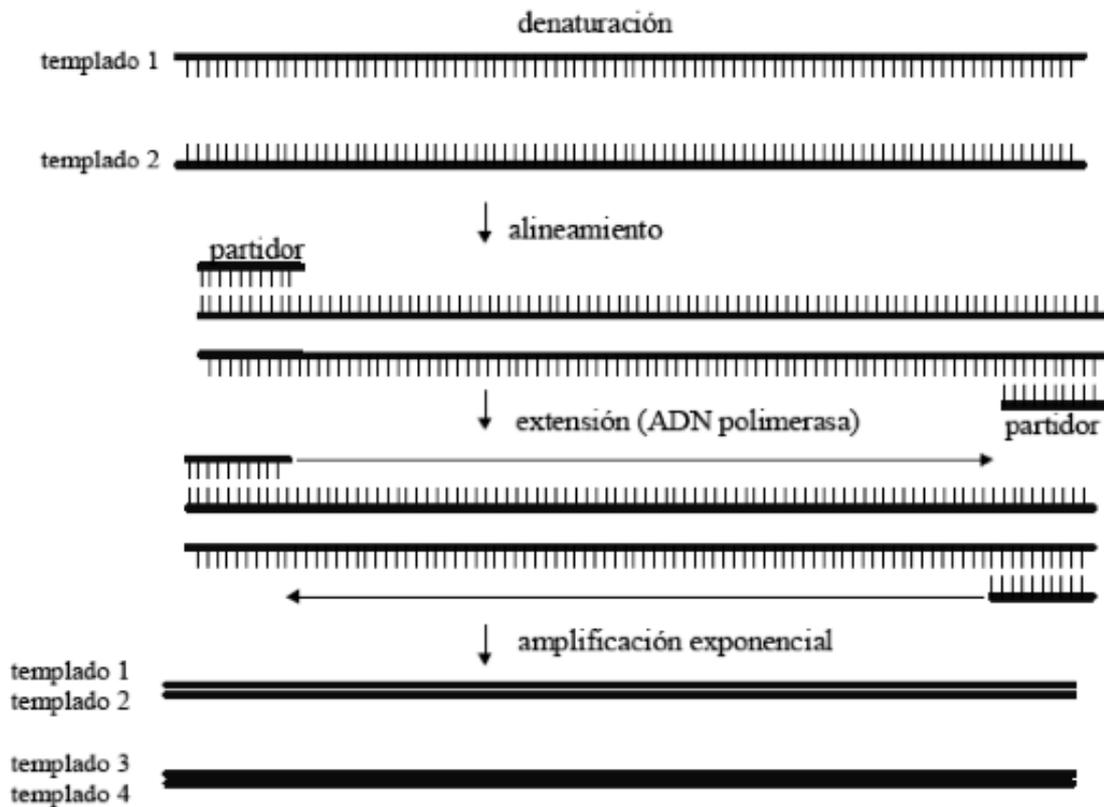


Figura 8. Reacción de Polimerasa en cadena (15).

Cada PCR requiere de una específica optimización para una optima PCR total. La falta de optimización puede resultar en varios problemas, como:

- Productos no detectables de PCR,
- Baja eficiencia en la amplificación de cada unión de bases,
- La presencia de bandas no específicas (smeary background),
- La formación de primer dimers, que compiten con la unión de primer en la amplificación, o como también mutaciones causadas por errores en la incorporación del nucleótido.

Es por lo tanto de particular importancia la optimización de la PCR para poder usarla con su respectivo diagnóstico o procedimiento analítico donde una correcta amplificación es importante(14).

La optimización de una particular PCR puede consumir tiempo y verse complicada porque existe varios parámetros que están involucrados. Algunos de ellos incluyen:

- Calidad y concentración del ADN modelo.
- Diseño y concentración de primers
- Concentración de iones de Magnesio.
- Concentración de los cuatro desoxiligonucleótidos (dNTPs).
- Buffer para PCR.
- Selección y concentración de DNA polimerasa.
- Condiciones térmicas de los ciclos de PCR.
- Adición y concentraciones de aditivos o cosolventes de PCR.
- Técnica de Hot-star⁸.

La PCR puede verse afectado de cada uno de estos parámetros individuales, como también de la combinación de efectos independientes de algunos de estos parámetros (14).

1.3.2.1 Electroforesis

Por métodos de gel de electroforesis podemos separar por longitud o pureza las moléculas de ADN que han sido amplificadas, así por ejemplo para nucleótidos de hasta un solo nucleótido o de diferente longitud puedan separarse en geles de poliacrilamida. En el caso de moléculas de ADN muy grandes podemos utilizar geles de agarosa, los fragmentos migran con mayor rapidez, se mueven por el campo eléctrico gracias a las cargas negativas de sus fosfatos, se puede utilizar concentraciones de 0,2 a 3%. Para poder visualizar estas bandas es necesario que sean teñidas por algún método fluorescente como bromuro de etidio que permite observar la bandas a la luz ultravioleta. Para la apreciación del tamaño de la molécula es necesario comparar con un marcador de peso molecular el cual nos determina un patrón modelo para distinguir nuestra banda de interés (14).

⁸ Esta técnica reduce amplificaciones no específicas, manipulando Tm (melting temperatura) antes de la adición de polimerasas (http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction).

CAPITULO 2: Materiales y métodos

2.1: Toma de muestras y estudio de la población

La población con la cual se realizó el estudio fueron pacientes diagnosticados con hepatitis B a los cuales se les determinó pruebas de HBsAg y HBeAg mediante ELISA. La toma de muestra deberá realizarse en tubos sin anticoagulante y proceder inmediatamente a obtener el suero.

Las muestras fueron recolectadas a partir de laboratorios y hospitales de Quito entre los cuales están: La Cruz Roja Ecuatoriana, Hospital Carlos Andrade Marín, Baxter Ecuador (centro de Hemodiálisis), Laboratorios Zurita y Zurita, Hospital de niños Baca Ortiz, mediante un consentimiento oral de autorización por parte de los pacientes en el caso de Baxter, en cuanto a la cruz roja Ecuatoriana no se realiza un consentimiento ya que son sueros de paciente donantes positivos para HBsAg, en cuanto al Hospital Vaca Ortiz constituyen niños con cáncer que muchas veces poseen defensas bajas y son propensos a hepatitis B crónica, y en cuanto a laboratorios Zurita constituyen restos de muestras en el área inmunológica que resultaron positivos para HBsAg sin conocer la paciente. Una vez realizado el ensayo y utilizado el suero la muestras son desechadas y destruidas sin quedar residuos de muestras contaminadas.

2.2: Extracción de ADN

Para la extracción se utilizó PureLink Viral RNA/DNA Kits (Anexo 2), según las especificaciones del fabricante, la muestra de suero debe ser centrifugada en caso de que existan precipitados o restos pequeños de hielo si la muestra haya sido congelada.

Recomendaciones del kit:

- Luego de colectar la muestra debemos proceder inmediatamente a la extracción, si la muestra fue congelada a 4°C debe hacerse por corto tiempo (4 horas máximo) o congelada a -20°C o -80°C por más tiempo.
- No descongelar la muestra más de una vez.

- Usar el sobrenadante limpio en caso de que haya sido centrifugado por la presencia de crioprecipitados.

Materiales:

- Buffer de lisis viral (L22)
- Buffer de lavado (W5)(5X)
- Proteinasa K (20 mg/ml)
- Carrier RNA (liofilizado)
- Agua estéril libre de RNasa (E3)
- Columnas y tubos de recolección
- Tubos de lavado (2.0ml)
- Tubos de recolección (1,5)

Procedimientos antes de la extracción:

- Preparación del Buffer de Lavado.- adherir 60ml de etanol al 96-100% a 15ml del Buffer de lavado (W5).
- Preparación del Carrier de RNA.- para el stock debemos colocar 310ul de agua estéril libre de RNasa sobre los 310ug del liofilizado, mezclar y alicuotar la solución y almacenar a -20°C.

Para la preparación de Buffer de lisis junto con el carrier de RNA mezclar según la fórmula para su cálculo:

$$A = N \times 0,21 \text{ ml}$$

A(ml)=volumen de buffer de lisis (L22)

$$B = A * 28 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}$$

B(ul)=volumen de "Carrier de RNA"

A+B almacenar a 4°C hasta su uso en la extracción dentro de una hora.

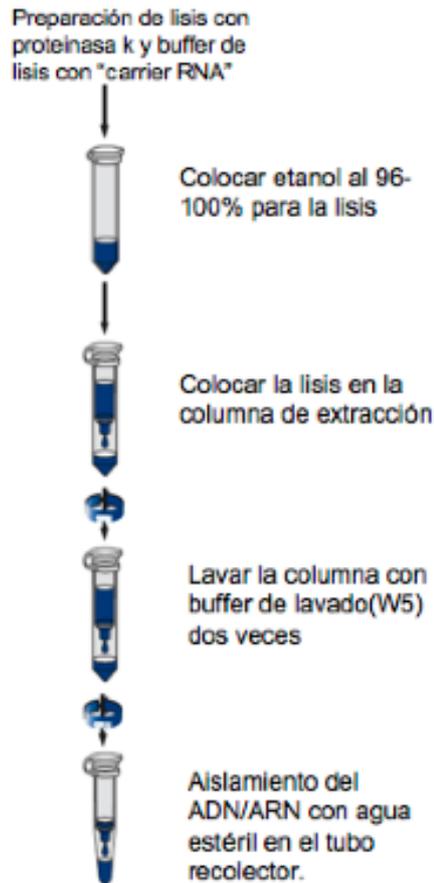
Extracción:

Lisis celular:

- Colocar 25ul de proteinasa K en un tubo limpio.
- Colocar 200ul de muestra en el mismo tubo.
- Colocar 200ul de Buffer de lisis previamente mezclado con el “Carrier de RNA”, cerrary mezclar en el vórtex por 15 segundos.
- Incubar a 56°C por 25 minutos.
- Colocar 250ul de etanol al 96-100%, mezclar en el vórtex por 15 segundos.
- Incubar la lisis por 5 minutos a temperatura ambiente.

Proceso de purificación:

- Colocar la lisis en la columna de extracción.
- Centrifugar la columna a 8831,32 RPM por un minuto. Descartar lo atravesado por la columna, colocar la columna en un nuevo tubo de lavado.
- Lavar la columna con 500ul de buffer de lavado (W5).
- Repetir el paso anterior una vez más con otros 500ul de buffer de lavado (W5).
- Descartar lo atravesado por la columna y colocar la columna en un nuevo tubo de lavado.
- Centrifugar la columna al máximo de velocidad para filtrar cualquier residuo del buffer de lavado.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección (1,5ml).
- Colocar 10-50ul de agua estéril libre de RNasas para aislar los ácidos nucleicos.
- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar al máximo de velocidad por 1 minuto.
- Almacenar el DNA purificado a -80°C para otras aplicaciones.



El ADN extraído fue corrido en un gel de agarosa al 0,8% para visualizar la presencia de ADN viral en bandas superiores.

2.3: Amplificación del ADN

Para la amplificación se utilizan primers dentro de la región core (Rodrigues,2001). Estos iniciadores nos determinan la pauta para poder sintetizar la región de interés con la ayuda de la polimerasa, por lo cual estos se ubican en una posición del genoma específica en nuestro caso el primer AE-3 posición (1955-1974) 5'TTG CCT TCT GAC TTC TTT CC 3', primer AE-4 posición (2401-2381) 5'TCT GCG AGG CGA GGG AGT TCT 3'. A continuación se pueden ubicar los primers en el genoma del VHB, en la región core y antígeno e como también la región polimerasa.

middle 5 protein
Lectin and e. antigen
 NC_001977
 ATGGACATTC ACCCGTATAA AGAATTTGGA CCTTCTGTGG AGTTACTCTC
 TACCTGTAACT TGGGCATATT TCTTAAACCT CGAAGAGACC TCAATGAGAG

middle 5 protein
 5' 3' BamH I
 NC_001977
 TTTTTTCCCT TCTGACTTCT TTCCTTCTAT TCGAATCTC CTCGACACCC
 AAAAAACGGG AACTGAAAG AAGGAAAGATA AGCTCTAGAG GAGCTGTGGC
 Primer A-E-3 ←→

middle 5 protein
 NC_001977
 CCTCTGCTGT GTATCGGGAAG CCGTTAAGAT CTCCGGAACA TTCTTCACCT
 CGAGACGAGG CATAGCCCTC CGGAACTCTCA GAGCCCTTGT AACAACTGGA

middle 5 protein
 NC_001977
 GAGGATADAG GAATGAGGGA AGGTATTTGT TTTTGGGGTG AGTTGATGAA
 GTGGTATATC GTGAGTCCGT TCATATAAGAC ACAAAGCCAC TCAACTACTT

middle 5 protein
 NC_001977
 TCTGGGCACC TGGGTGGGAA GTAATTTGGA AGACGGAGCA TCCAGGGGAT
 AGACCGGTGG ACCCAACCTT CATTAAAAGT TTTGGGTCTT AGGTCCCTTA

middle 5 protein
 NC_001977
 TGTATGTGAG CTATGTCAAT GTTAAATATGG CCGTAAAAAT TAGAGAACTA
 ATCATCAGTC GATACAGTTA CAATTATACC CCGATTTTTA ATCTGTTGAT

middle 5 protein
 NC_001977
 TTTGTGTTTC ACATTTCCCT CCTTACTTTT GGAAGAGAAA CTCTCCTTCA
 AACACCAAAAG TGTAAAAGAC GGAATGAAAA CCTTCTCTTT GACAGGAAGT

middle 5 protein
 NC_001977
 GTATTTGGTG TCTTTTGGAG TGTGGATTCC CAATCGTCCC GOTTACAGAC
 CATAAAGCAC AGAAAAGCTC AGACCTAAGC GTGAGGAGGG GGAATGTCTG

NC_003977
 CACCAAATGC CCCTATCTTA TCAACACTTC CCGAACTAC TATTGTTAGA
 GTGGTTTACG GGGATAGAAAT AGTTGTGAAQ GDCITTTGATG AQAACATCT

NC_003977
 CGACGAGCA GGTCCCTAG AAGAAAACCT CCGTCCCTC GCAGACGAAQ
 GCTACTCCGT CCAAGGATTC TTCCTCTTGA GGAAGCGAG CATTCTCTTC

3' ← 5'
 Primer AE-4 ↙ ↘

NC_003977
 GTCTCAATCG CCCTCTCCG GAAATCTTCA ATCTCCGAA TCTCAATGT
 CAGGTTTACG GCGGCAAGCT CTTCATAGT TAGAGCCCTT AAGTTTACNA

NC_003977
 AGTATCCCTT GGACTGATTA GGTGGGAAAC TTTACTGGG TTTATTTCTC
 TCATAGGAA CCTGAGTATT CCACCCCTTG AAATGACCCG AATAAGAAQ

NC_003977
 TACTGTACCT ATCTTTAATC CTGATTTGAA AACTCCCTCC TTTCCCTACA
 ATGACATGGA CAGAAATTA GACTAACCTT TTGAGGATGG AALGGTGT

NC_003977
 TTCATTTAGA GGAAGACATT ATTAATAGAT GTCAACATA TATGGCCCT
 AAGTAATGT CCTCCTATAA TAATATCTA CAGTTGTTAT ACACCCGGA

NC_003977
 CTCACATTA ATGAAAAAAG GAGATTAATA TTAATFATCC CTACTAGGT
 GACTGTCAAT TACTTTTTTC CTCTAATTTT RAATFATACG GACGATCCNA

NC_003977
 CTATCCFAAC CTTACGAAAT ATTTGCCCTT GAGAGAGGG ATTAALCCGT
 GATAGGATTC GAATGGTTTA TAAAGGGAA CCTGTTTTCCG TAATTTGGCA

Bajo las mismas condiciones del artículo se estandarizó los parámetros de PCR hasta llegar a las siguientes condiciones, con un volumen final de 25ul, con un volumen de 5ul de ADN extraído.

- Platinum Taq DNA Polymerase: 1U.
- PCR Buffer: 10X
- Primer AE-3 y primer AE-4: 0,5 pM/ul.
- MgCl₂: 2mM.
- Mezcla de dNTP: 200uM.
- Agua estéril libre de RNasas.

Para el control de temperatura y ciclos se utilizó el termociclador Progene, con los siguientes ciclos para la amplificación:

- Denaturación inicial: 94°C por 3min.
- 30 Ciclos: cada ciclo compuesto por:

Denaturación: 94°C por 1min.

Alineamiento: 48°C por 1min.

Extensión: 72°C por 2min.

- Extensión final: 72°C por 7min.

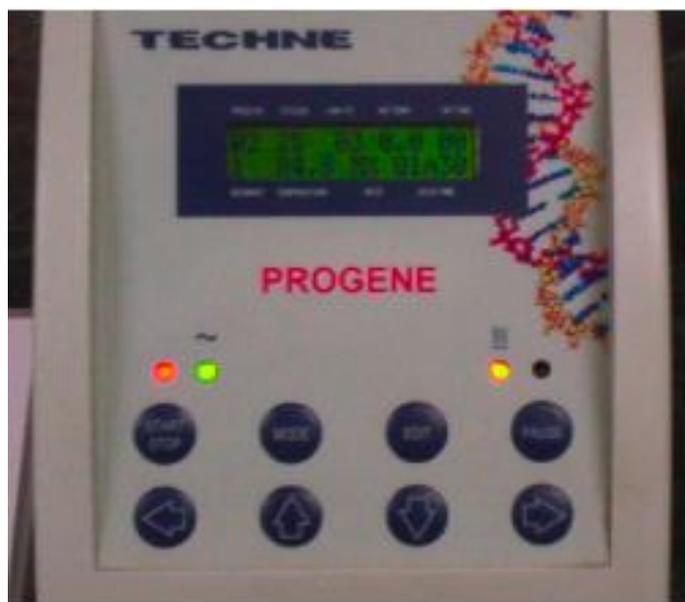


Figura 9. Termociclador progenie, Emilia Espín.

2.4: Visualización de ADN en gel de agarosa

Se utilizó agarosa al 2%, la cual se tiñó con bromuro de etidio en una concentración de 0.5ul por cada 10ml de gel, por medio de una Electroforesis Horizontal se sometió a cargas entre 110 y 120 V, posteriormente se utiliza un transiluminador para visualizar el ADN teñido previamente bajo luz UV.

Como controles negativos están: suero de una persona vacunada, suero de una persona sana no vacunada y agua.

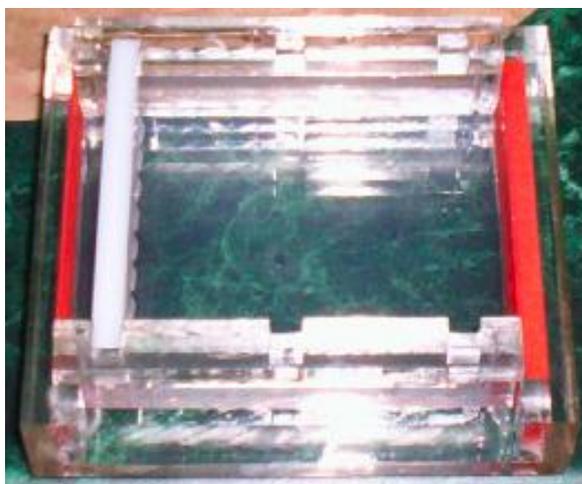


Figura 10. Gel de Agarosa 2%. *Emilia Espín.*



Figura 11. Carga del ADN amplificado en el gel de agarosa previa corrida electroforética. *Emilia Espín.*

Para comparar las bandas obtenidas es necesario utilizar un marcador de peso molecular que en mi caso es de 100 pb, que me permite evaluar en un rango de fragmentos de doble cadena desde 100-1500pb.

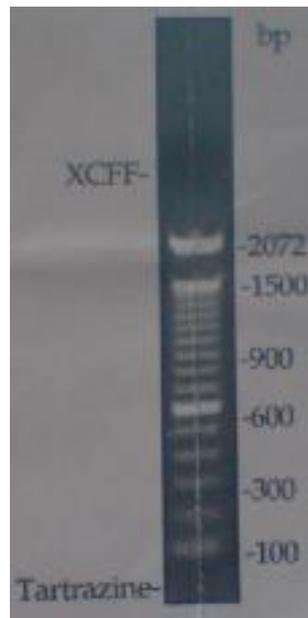


Figura 12. Esquema de Marcador Molecular de 100pb. *Emilia Espín.*

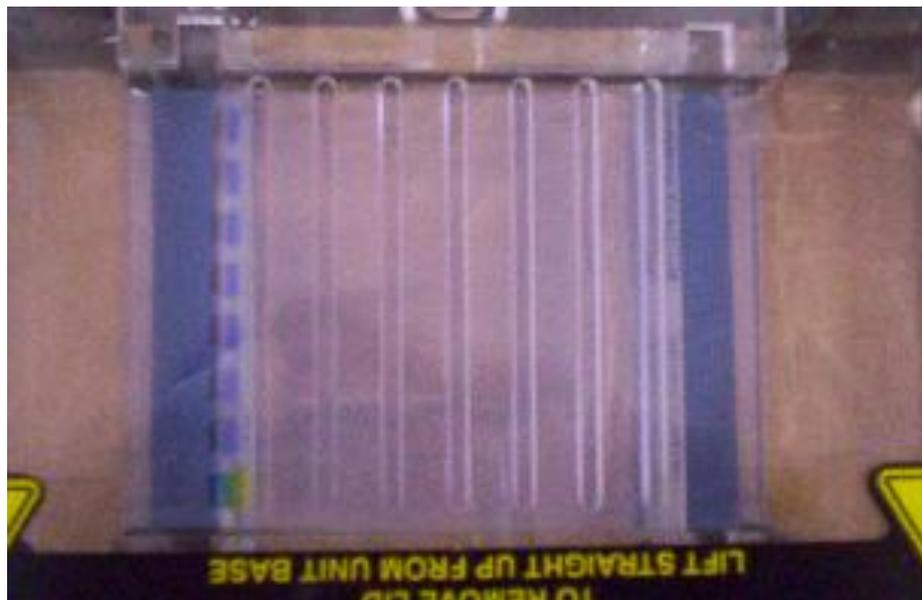


Figura 13. Gel de Electroforesis Horizontal, corrida electroforética de ADN amplificado. *Emilia Espín.*



Figura 14. DyNa Light Dual Intensity UV Transilluminator.

CAPITULO 3: Resultados

- Se obtuvieron alrededor de 28 muestras de pacientes con Hepatitis B, de los cuales todos son positivos para antígeno de superficie (HBsAg), y el 57% son positivos para antígeno e (HBeAg).
- El 81% de los pacientes resultan positivos para la amplificación con PCR.
- La amplificación por medio de PCR da como resultado una banda amplificada de 447pb.
- Se observó una positiva amplificación de PCR con pacientes asintomáticos.
- Las condiciones finales de PCR que resultaron de la estandarización son: concentración de Polimerasa 1U, Buffer 10X, Primers 0,5pmol/ul, cloruro de magnesio 2mM. dNTPs 200uM. La temperatura de alineamiento resultó en 48°C

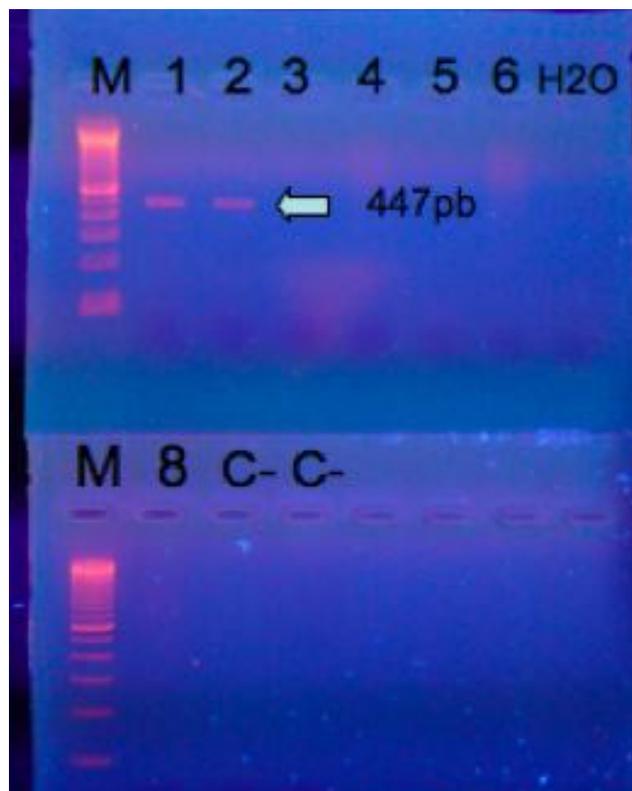


Figura 15. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-5= pacientes con Hepatitis B, 6=vacunado, 8=no vacunado, C=Control Negativo. *Emilia Espín.*

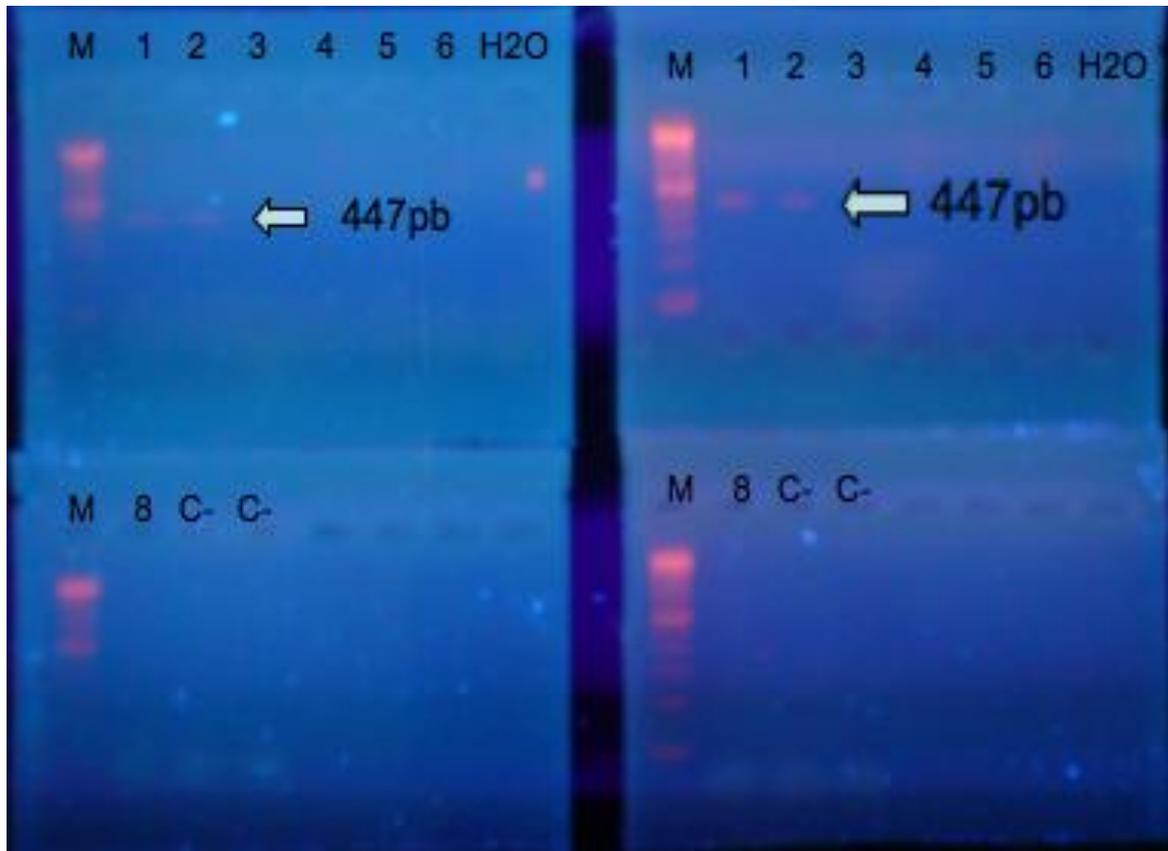


Figura 16. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-5= pacientes con Hepatitis B, 6=vacunado, 8=no vacunado, C=Control Negativo. Comparación entre dos concentraciones de cloruro de magnesio, 1,8mM y 2mM respectivamente se observa en la segunda gráfica bandas más claras como se observa en la figura 15. *Emilia Espín.*

- La temperatura óptima de hibridización es 48°C por un minuto, denaturación de 94°C por un minuto y extensión de 72°C por dos minutos.
- El ADN extraído puede ser almacenado a -80°C lo cual también nos dan resultados positivos amplificando una banda de 447pb.

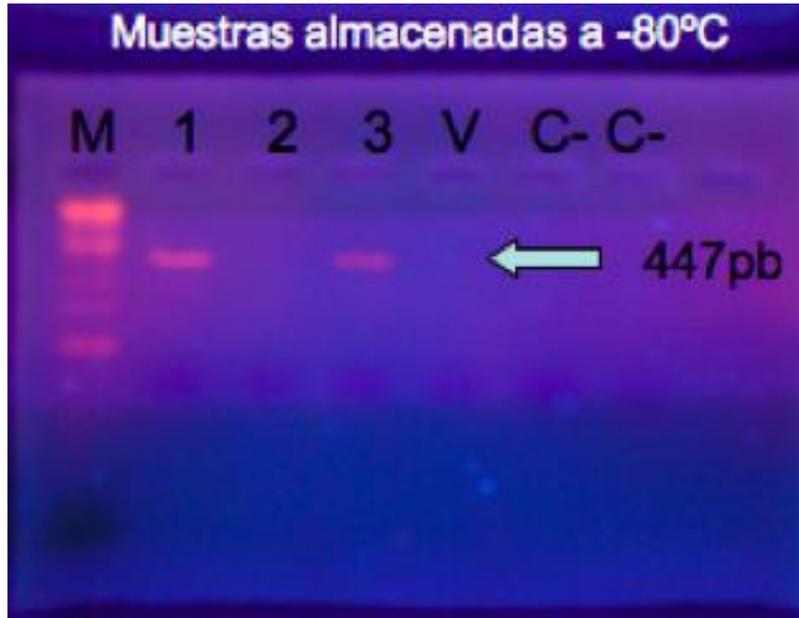


Figura 17. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-3= pacientes con Hepatitis B, V=vacunado, C-=Control Negativo. *Emilia Espín.*

- Se observó una banda de amplificación de 447pb en una de las muestras congeladas a $-20^{\circ}C$.

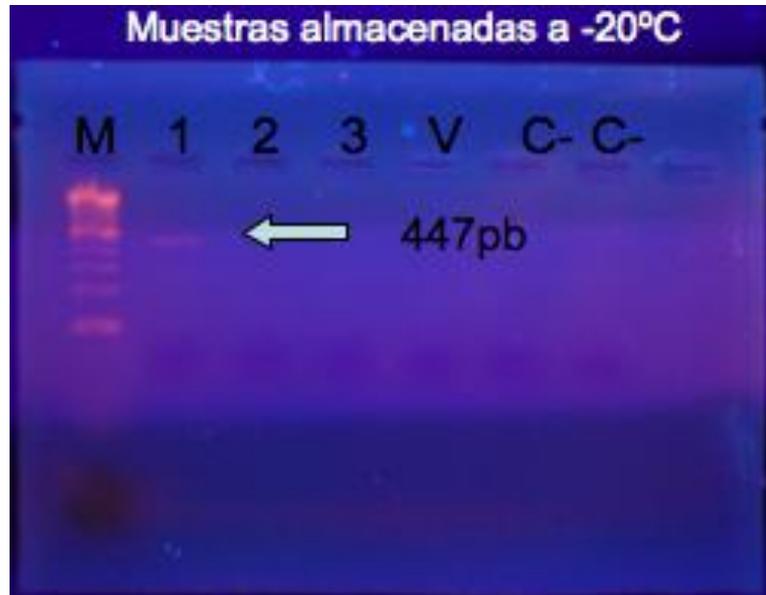


Figura 18. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-3= pacientes con Hepatitis B, V=vacunado, C-=Control Negativo. Un paciente amplifica la banda de 447pb luego de tres días de ser almacenada a $-20^{\circ}C$. *Emilia Espín*

CAPITULO 4: Discusión

Estos resultados presentan total concordancia con otros ensayos realizados mediante PCR los cuales muestran un 90% de muestras positivas para HBsAg y que amplifican para PCR, de igual forma presentan similares resultados en presencia o ausencia de HBeAg lo cual no refleja altos o bajos porcentajes de replicación viral (Zaaijer H. 1994), de igual forma en otros autores resaltan al importancia y efectividad de PCR para varias manifestaciones clínicas, especialmente cuando se detectan bajos niveles de viremia en enfermedades no replicativas, también en pacientes con infecciones virales pasadas y portadores asintomáticos (Rodrigues C, 2001).

Esta es una prueba sensible a bajas cantidades de ADN sin embargo se prefiere utilizar tipos de PCR cuantitativas para no solo determinar la presencia de ADN viral sino la carga viral presente en un determinado paciente, con el objeto de determinar la respuesta a tratamientos antivirales y progreso de la enfermedad.

Dentro de nuestros pacientes pudimos incluir una muestra de paciente asintomático la cual amplifico para PCR, esto nos permite comparar con resultado de otros autores los cuales determinan una amplificación del 97% en pacientes asintomáticos que no presentan niveles de transaminasas considerables y que por medio de PCR o pruebas invasivas tal como una biopsia del hígado pueden ser detectados (Madan K, 2004).

CAPITULO 5: Conclusiones

- La estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa fue exitosa para la identificación del Virus de Hepatitis B en suero de pacientes positivos para Antígeno de Superficie (HBsAg). Siendo así que el 81% son reactivas para PCR se puede atribuir este 19% a la calidad de la muestra ya que se pudo comprobar que en el mismo paciente, con dos tomas de muestra diferentes: la una resulta positiva para PCR y la otra negativa, muchas veces la muestra no se encuentra en condiciones adecuadas de amplificación y de ello depende los buenos resultados de PCR.
- La presencia de Antígeno de Envoltura “e” (HBeAg) es un indicativo importante para determinar replicación viral sin embargo se pudo comprobar que no es necesario su positividad para determinar el ADN viral por medio de PCR.
- El kit de extracción de ADN viral en columna (Invitrogen purelink RNA/DNA) proporcionó excelentes resultados, ya que el ADN extraído no tuvo ninguna complicación al momento de PCR.
- El ADN extraído se puede almacenar a -80°C dando resultados positivos en PCR.
- Las muestras procesadas el mismo día: toma de muestra, extracción, y amplificación, presentan bandas más claras según los resultados obtenidos con muestras congeladas, por lo que PCR sería óptima para hospitales y laboratorios donde exista la facilidad de tomar las muestras y realizar el ensayo inmediatamente.
- Se pudo comprobar que el ADN viral es muy sensible y tiende a degradarse muy rápidamente.
- Los primers de la posición 1955-1974 y la posición 2401-2381 del genoma completo del virus de Hepatitis B resultaron apropiados para identificación del virus.
- Se pudo comprobar que a pesar de no tener espacios delimitados físicamente de prePCR y postPCR, la delimitación de áreas imaginariamente de materiales y equipos el orden de proceder y seguir los protocolos permiten obtener

resultados excelentes, para ello también es importante una constante limpieza de materiales y mesones de trabajo.

- En el caso de poseer condiciones adecuadas y control de calidad se puede utilizar muy efectivamente la PCR como una determinación inicial de pacientes por ejemplo en segregación de donantes de sangre o transplantes.

- Se puede concluir en caso de poner en práctica PCR en hepatitis B para laboratorios con espacios reducidos y que se encuentran en crecimiento y avance, una extensión de PCR con ELISA de esta forma se pueden reducir mucho más los costos una vez estandarizada y realizada la prueba, como también se reduce el peligro de fabricar geles y manipular el bromuro de etidio muy peligroso y potencialmente cancerígeno.

CAPITULO 6: Recomendaciones

- Es muy importante el manejo de la muestra, esta es preferible que se recolecte sin anticoagulante y que se proceda a la obtención de suero inmediatamente, se puede ver que tiene unos mejores resultados realizar la extracción el mismo día de recolección y la amplificación. Los resultados demuestran que las muestras procesadas el mismo día tienen bandas mucho más claras que aquellos en los cuales se almacenó el suero o el ADN extraído.
- Se recomienda no descongelar la muestra más de una vez, se pudo observar que en muestras varias veces descongeladas las bandas de amplificación son muy leves o no aparecen.

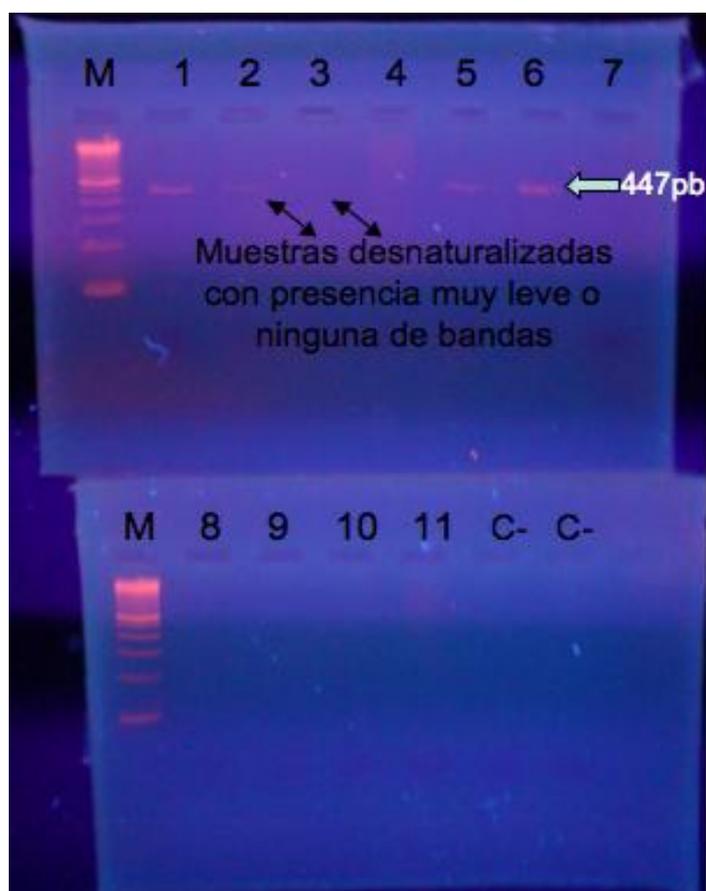


Figura 19. Gel de Agarosa (2%) teñido con Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y visualizado bajo luz ultravioleta, M=marcador molecular, 1-9= pacientes con Hepatitis B, 10=vacunado, 11=no vacunado, C- =Control Negativo.

- Para el transporte luego de la recolección de la muestra es necesario una cuidadosa refrigeración de la misma para lograr mejores resultados y así evitar al

degradación del ADN y por lo tanto que no se encuentre la región de interés para ser amplificada.

- Se recomienda realizar otros ensayos para determinar tiempo y calidad del ADN al ser almacenado a -20°C ya que se pudo observar que algunas muestras fueron positivas para PCR luego de ser almacenadas a esta temperatura.
- Se recomienda continuar la investigación con una población asintomática para comprobar los resultados con otros autores como también observar la presencia silenciosa de hepatitis B.

CAPITULO 7: Bibliografía

(1) Sanchez L. Panduro A.(2005) Genómica y Proteómica del virus de la Hepatitis B, La hepatología molecular: un enfoque multidisciplinario, vol. VII.

(2) Serra Miguel A. (2001). Virus de Hepatitis B, Servicio de Hepatología, Hospital Clínico universitario de Valencia, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia,http://www.seimc.org/control/revi_viro/VHBrev.htm.

(3) Christoph S, William S. Manson (2000), Hepatitis B Virus Biology, Microbiology and Molecular Biology reviews, American Society for Microbiology. Vol. 64, p 51-68.

(4) Abbas A. Lichtman H. Pober J, Inmunología Celular y Molecular, Cuarta edición, McGrawHill, 2002, pag: 426.

(5) William M. Lee. Hepatitis B (2007), Virus infection, volumen 337, number 24.

(6) Francis J. Mahoney (1999), Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection, Clinical Microbiology Reviews, Vol, 12, No. 2 p 351-36.

(7) Torres R (1996). Hepatitis B and Hepatitis Delta virus infection in South America, Infectious Diseases Section, Tropical Medicine Institute of Caracas,

Universidad Central de Venezuela, vol 38 (suppl 2) p48-55.

(8) Krajden M, McNabb G., Petric M. (2005), The laboratory diagnosis of hepatitis B virus, Columbia Center for Disease Control, vol 16 (2) p 65-72.

(9) Alcaraz M, Virus de la Hepatitis B: Estructura Genómica y Marcadores clínicos, Servicio de Microbiología, Hospital Doctor Peset. Valencia, http://www.seimc.org/control/revi_Sero/Rvirhbs.htm.

(10) Dufour R. Guías del laboratorio para *screening*, diagnóstico y monitoreo de la injuria hepática. Pathology and Laboratory Medicine Service, VA Medical Center, Washington, http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572005000400011&script=sci_arttext&tlng=es.

(11) Casas F. (2007), Diagnóstico serológico de la Hepatitis B, <http://www.microbiologiaclinica.com/diaghepb.htm>

(12) Ramos J. González L. Notas de Biología Molecular, Unidad 4, Técnicas de Recombinación del ADN, 1998, p89

(13) Owczarzy R. Behlke M (2005) Calculation of Tm for Oligonucleotide Duplexes, Molecular Genetics and Biophysics, Integrated DNA Technologies.

(14) Bartlett J. Stirling D. Methods in Molecular Biology, PCR Protocols, Second Edition, (Humana Press Inc. Totowa, 2003), NJ, vol. 226.

(15) Cordovlán A (2002) Biología molecular en infectología, parte I: Desarrollo de metodologías, Rev Chilena de infectología, vol 19(1) p 14-24.

(16) Rodrigues C, Deshmurkh M, Jacob T, Nukala R, Menon S, Mehta A, (2001) Significance of HBV DNA by PCR over serological markers of HBV in acute and chronic patients, Departamento of Microbiology, Lokmanya Tilak, Municipal Medicañ College, Sion, Mumbai-India, vol 19 p 141-144. <http://www.ijmm.org/text.asp?2001/19/3/141/8148>

(17) Crespo J, Lozano J, López, Ramos, Sánchez (2003), Análisis del ADN del virus de la hepatitis B en suero y células mononucleares de sangre periférica en sujetos con infección crónica por el VHB, Hospital universitario Marqués de Valdecilla.

(18) Ministerio de Salud Pública del Ecuador, <http://www.msp.gov.ec/web/informacion.asp?cod=24>.

(19) Casariego E, Castineira M, Costa C, González C, Louro A, Viana C, Grupo MBE Galicia, Guías Clínicas (2007); 7 (6). <http://www.fisterra.com/guias2/vhb.asp#mismo>.

(20) Hepatitis.cl, enfermedades del hígado, Pontificia Universidad Católica de Chile, septiembre (2007), <http://www.hepatitis.cl/hbv.htm>.

(21) Murra A, Notas on ciber gastroenterology, <http://www.murrasaca.com/nt25.htm>

(22) Vacunas-si, contenidos desarrollados por el comité asesor de vacunas de la AEP, <http://www.vacunasaep.org/index>.

(23) McLachlan Alan, Molecular Biology of the Hepatitis B Virus, California, CRC press, (2004), http://books.google.com.ec/books?id=Hd5-722GEgAC&printsec=frontcover&vq=hepatitis+b+virus&source=gbs_summary_r#PP1,M1

(24) Zaaijer H, Borg F, Cuypers H, Hermes M, and Lelie P, Comparison of Methods for Detection of Hepatitis B Virus DNA, Journal of Clinical Microbiology, (1994).

(25) Madan K, Batra Y, Panda S, Dattagupta S, Hazari S, Kumar Jha J, and Acharya S, Role of polymerase chain reaction and liver biopsy in the evaluation of patients with asymptomatic transaminitis: Implications in diagnostic approach, (2004).