



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN MÉXICO”

Tesis profesional que para obtener el título de
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO
Área Bioquímica Clínica

Presenta

BRIONES PEÑA SAIDA JESSICA

No. Cuenta 406025537

2013

Asesor externo: Dr. Luis E. Soto Ramírez

Asesor interno: Dra. Martha Legorreta Herrera

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

“Salvador Zubirán”

Tesis experimental.



Este trabajo de tesis ha sido evaluado por el Jurado que asignó la Jefatura de la Carrera de Químico Farmacéutico Biológica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y que presentó.

Saida Jessica Briones Peña

2 de diciembre del 2013.

Dra. Martha Legorreta Herrera
Presidente

Dr. Luis Enrique Soto Ramírez
Vocal

Dra. Raquel Retana Ugalde
Secretario

M. en C. Roberto C. González Meléndez
Suplente

Q.F.B. Ma. De Lourdes Vega Navarrete
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Al INCMNSZ por recibirme y permitirme lograr mi desarrollo profesional así como al Departamento de Infectología por su infinito apoyo para realizar toda la parte experimental de este proyecto.

Un agradecimiento muy especial para el Biol. Luis León Fuentes Romero por tus conocimientos y experiencia para el diseño, desarrollo y realización de los experimentos, por tu amistad y apoyo incondicional, ya sabes que sin ti esto no habría tenido resultado.

A la Dra. Mónica Viveros Rogel: “Moni” gracias por tus consejos que me motivaron a seguir adelante con mis estudios siempre con honestidad y sinceridad y por tu apoyo que he recibido a lo largo de estos años, pero sobre todo gracias por tu amistad.

A todos los chicos del laboratorio de virología molecular: Mario Hernández, Elsa Vidal, Roberto Rodríguez, Graciela Rosas; por brindarme su invaluable amistad y apoyo que me permitieron crecer y madurar a lo largo de estos años y que además hicieron el laboratorio un lugar acogedor. Los quiero!

Al Dr. Luis Enrique Soto Ramírez por su apoyo para la realización de este proyecto.

A los amigos de carrera: Adriana Ramírez, Jesús Cruz, Ana Laura Loreto, por su amistad y compañerismo en los momentos más difíciles de la carrera.

A todos los profesores por haberme proporcionado sus conocimientos y experiencias para prepararme para la vida profesional.

A los sinodales: Dra. Martha, Dra. Raquel, Maestro Roberto y Maestra Lourdes, gracias por su amable cooperación e interés para la revisión de este trabajo.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por proporcionarme todas las herramientas para mi formación profesional.

DEDICADO A:

Mis padres Carmen Peña y David Briones quienes me dieron la oportunidad de existir, por su amor, cuidado y confianza pero sobre todo por su enorme sacrificio y esfuerzo para mandarme a la escuela que es la mejor de las herencias. Esta meta alcanzada también es de ustedes. ¡Los quiero!

Mis hermanos Ivan Briones y Miguel Angel Briones quienes siempre han estado a mi lado y que me han brindado todo su cariño para seguir siempre adelante.

*Mi mejor amigo Luis León Fuentes Romero por abrirme las puertas de tu corazón y de tu casa, por estar a mi lado en los últimos 10 años, siendo tu amistad el mejor regalo que me ha dado la vida y enseñarme que el amor significa cuidado, compromiso, responsabilidad, respeto y conocimiento para ser feliz en la vida y así lograr los objetivos. Amigo este éxito también es tuyo.
¡Te quiero!*

A mi familia, tíos y primos, en especial a mi tíos: Leonor Briones y Juan Sánchez, porque siempre nos han apoyado en las buenas y en las malas.

Contenido

Abreviaturas	7
I. Introducción.....	8
II. Marco teórico	9
II.I Estructura del VHB	9
II.I Genoma del VHB	9
II.III Ciclo de replicación	11
II.IV Genotipos del VHB y su epidemiología	13
II.V Tratamiento de la hepatitis B.....	16
II.VI Resistencia a fármacos antivirales.	20
II.VII Métodos para la genotipificación del VHB.....	24
II.VIII Importancia clínica de los genotipos.....	26
II.IX Filogenia	28
III. Planteamiento del problema.....	30
IV. Objetivo General	31
IV.I Objetivos Específicos.....	31
V. Diseño experimental.	31
V.I Material y Método.....	33
V.II Método.....	35
VI. Resultados.....	43
Carga Viral.....	43
Sensibilidad del PCR	44
PCR de la curva de diluciones de la muestra RVLA.....	44
Curva de optimización del volumen de ADN para el PCR.....	45
Reproducibilidad	46
Amplificación de los diferentes fragmentos del Genoma.....	47
Secuenciación.....	48
Análisis Filogenético.....	49
Árbol Filogenético.....	50
Análisis con el programa Geno2pheno.....	51

Comparación de Genotipos con Análisis Filogenético y Geno2pheno.....	52
Resistencia a los fármacos Análogos Nucleósidos (AN´s).....	52
Alineamiento de los aminoácidos de las Secuencias Mexicanas y los diferentes genotipos del VHB.....	53
Código de acceso de las 4 muestras de pacientes Mexicanos del <i>GenBank</i>	56
VII. Discusión	57
VII. I Extracción del ADN con el estuche de Qiagen.....	57
VII.II Optimización de la PCR	58
VII.III Filogenia	62
VII.IV Mutaciones Relacionadas a Resistencia	63
VIII. Conclusiones.....	65
IX. Propuestas.....	66
X. Anexos	67
X.I Anexo 1 Carga Viral (Estuche Abbott RealTime HBV).....	67
X.II Anexo 2 Resultados predichos por Geno2pheno.....	68
Muestra RVLA.	68
Muestra 77264133.....	69
Muestra SSE.	70
XI. Glosario	71
XII. Bibliografía.....	74

Abreviaturas

A	Alanina	NCBI	National Center for Biotechnology Information
AN's	Análogos Nucleótidos/Nucleósidos	NK	Células Natural Killer
ADN	Ácido desoxirribonucleico	nt	Nucleótido
ADN	ÁDN circular cerrado covalentemente	-OH	Hidroxilo
ARN	Ácido ribonucleico	ORF	Open Reading Frame
C	Cisteína	pb	pares de bases
CV	Carga Viral	pM	picomolar
CHC	Carcinoma Hepatocelular	PCR	Polymerase Chain Reaction
dNTP's	Deoxinucleótidos trifosfatos	RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ddNTP's	Dideoxinucleótidos trifosfatos	RFMP	<i>Restriction Fragment Mass Polymorphism</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	RT	Reversotranscriptasa
E.U.A.	Estados Unidos de América	S	Serina
FASTA	Formato de texto FAST-ALL	TA	Temperatura de Alineamiento
G	Glicina	Taq ADN polimerasa	ADN polimerasa de <i>Termus aquaticus</i>
HBcAg	Antígeno de la envoltura del VHB	TBE	Tris-Borato-EDTA
HBeAg	Antígeno de soluble "e" del VHB	UI	Unidades Internacionales
HBsAg	Antígeno de superficie del VHB	UPGMA	Método No Ponderado de Grupos con medias aritméticas (Unweight Pair Group Method with Arithmetic means)
I	Isoleucina	V	Valina
IFN	Interferón	VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
IFN-PEG	Interferón Pegilado	VHB	Virus de la Hepatitis B
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán	VHD	Virus de la Hepatitis Delta
L	Leucina		
M	Metionina		
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis	YMDD	Motif Tirosina-Metionina- Aspartato
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio		
Mg+2	Magnesio		
µL	microlitro		
µM	micromolar		
mL	mililitro		
N	Asparangina		
ng	nanogramo		

I. Introducción.

El Virus de la Hepatitis B (VHB), es un virus hepatotrópico, que afecta sólo al ser humano y es el agente etiológico de la hepatitis B, la cual puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). Actualmente existen 2000 millones de personas infectadas en el mundo de las cuales 350 millones viven con hepatopatía crónica y 600,000 mueren cada año. En México, los últimos datos informan que 1.7 millones de mexicanos son portadores de VHB.

La epidemiología molecular de VHB en México es pobre o nula en algunos casos en base a secuencias completas. Aunque se han hecho estudios de genotipos en pacientes sintomáticos y asintomáticos que han arrojado resultados con un subtipo mayoritario H.

La secuenciación del genoma completo seguido del análisis filogenético es una técnica altamente sensible que permite la detección de genotipos nuevos y recombinantes, por lo que se considera como el estándar de oro para la genotipificación del VHB. Los genotipos son de suma importancia ya que están asociados con la susceptibilidad para desarrollar cirrosis o CHC, además de que se relacionan con la respuesta al tratamiento antiviral

Por lo anterior, es importante el desarrollo de un método para secuenciar el VHB y que se pueda utilizar como herramienta en la determinación del genotipo y/o los genotipos que puedan presentar las personas infectadas con este virus, y de esta manera contribuir a la mejora en su salud, al darle información al médico que le permita elegir el tratamiento más adecuado.

II. Marco teórico.

II.I Estructura del VHB

El Virus de la Hepatitis B (VHB), fue descubierto por Baruch Blumberg en 1963, es un virus hepatotrópico, que afecta sólo al ser humano y es el agente etiológico, entre otros, de la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (CHC).^{(1) (2)} Pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, género *Orthohepadnavirus*, este virus, tiene una longitud de 42 nanómetros de diámetro y consiste en una envoltura y una nucleocápside que contiene al ADN de forma circular de doble cadena (una cadena corta y una cadena larga) con un tamaño de aproximadamente 3.2 kilobases. La envoltura transporta al antígeno de superficie (HBsAg), la cápside el antígeno de la envoltura o *core* (HBcAg). Cuando este virus está en forma libre en la sangre, el antígeno soluble “e” (HBeAg) relacionado con la cápside, se detecta generalmente en el suero.⁽³⁾

II.I Genoma del VHB

El genoma del VHB está organizado en cuatro genes superpuestos: **S, C, X y P** (Fig. 1).^{(4) (5) (6)}

El gen S se divide en las regiones *pre-S1*, *pre-S2* y *S* que codifican para las tres proteínas de la envoltura viral: *grande*, *mediana* y *pequeña* que forman el HBsAg. La proteína *grande* se codifica en la región *pre-S1*, *pre-S2* y el gen S, esta proteína es de longitud variable según el subtipo que va de 389 a 400 aminoácidos⁽⁵⁾. La proteína *mediana* es de 281 aminoácidos y se codifica en la región *pre-S2* y en el gen S. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a la albúmina polimerizada, por lo que podría ser la responsable de una de las vías de entrada del VHB al hepatocito⁽⁶⁾. La proteína *pequeña* es de 226 aminoácidos y se codifica en el gen S^{(5) (6)}, contiene cuatro regiones transmembranales que atraviesan la envoltura viral. Entre la región de aminoácidos del 100 al 160, se localiza en la parte externa de la envoltura viral del determinante “a” del HBsAg, este determinante evoca una

respuesta inmune humoral dominante e intensa que se produce por una infección activa o en respuesta a la vacuna. ⁽⁶⁾

Los anticuerpos que se forman en respuesta a este determinante, juegan un papel muy importante en la protección del hospedero contra el virus. Así también, los anticuerpos que se utilizan en el diagnóstico serológico para la detección del HBsAg reconocen al determinante “a”. Se identifica la presencia de este antígeno en circulación sanguínea a partir de los 22 días post-infección y continúa en circulación aún en las fases tardías de la infección de la mayoría de los pacientes; esta característica, le permite ser el principal marcador serológico de la infección por el virus de la hepatitis B. ⁽⁶⁾

El gen C se divide en dos regiones: la Pre-C que está constituida por 29 aminoácidos y la región C de 183 aminoácidos ambas codifican para la proteína de la nucleocápside y forman el HBeAg. Existen evidencias que indican que en esta región se encuentran los principales determinantes antigénicos involucrados en la respuesta inmune citotóxica, la cual juega un papel muy importante en la eliminación favorable del VHB en individuos inmunocompetentes. ⁽⁶⁾

El gen X contiene 462 nucleótidos y codifica para la proteína transactiva X (la transcripción del propio gen) que está formada por 154 aminoácidos, esta proteína se une e inactiva a la proteína supresora de tumores p53 de la célula huésped, por lo que puede jugar un papel importante en el desarrollo de cáncer en pacientes infectados. También se une a un complejo del proteosoma, este complejo participa en el procesamiento de proteínas que es necesario para el reconocimiento inmune; la unión de la proteína X al proteosoma podría inhibir la presentación antigénica y de esta forma conduciría a una evasión de la respuesta inmune contra el VHB. ⁽⁶⁾

El gen P codifica para la polimerasa viral que está formada de 832 aminoácidos, que conforman la polimerasa viral y se sobrepone con los tres genes restantes.

A esta proteína se le conocen al menos cuatro dominios funcionales: el dominio terminal, el cual participa en la encapsulación (formando la cápside viral) e iniciación de la síntesis del ADN; un dominio de función desconocida que se le conoce como un espaciador; el dominio con actividad de transcriptasa reversa y el de ADN polimerasa, que participa en la síntesis del genoma viral y el dominio RNasa-H, el cual degrada RNA pre-genómico y facilita la replicación. ^{(6) (7) (8)}

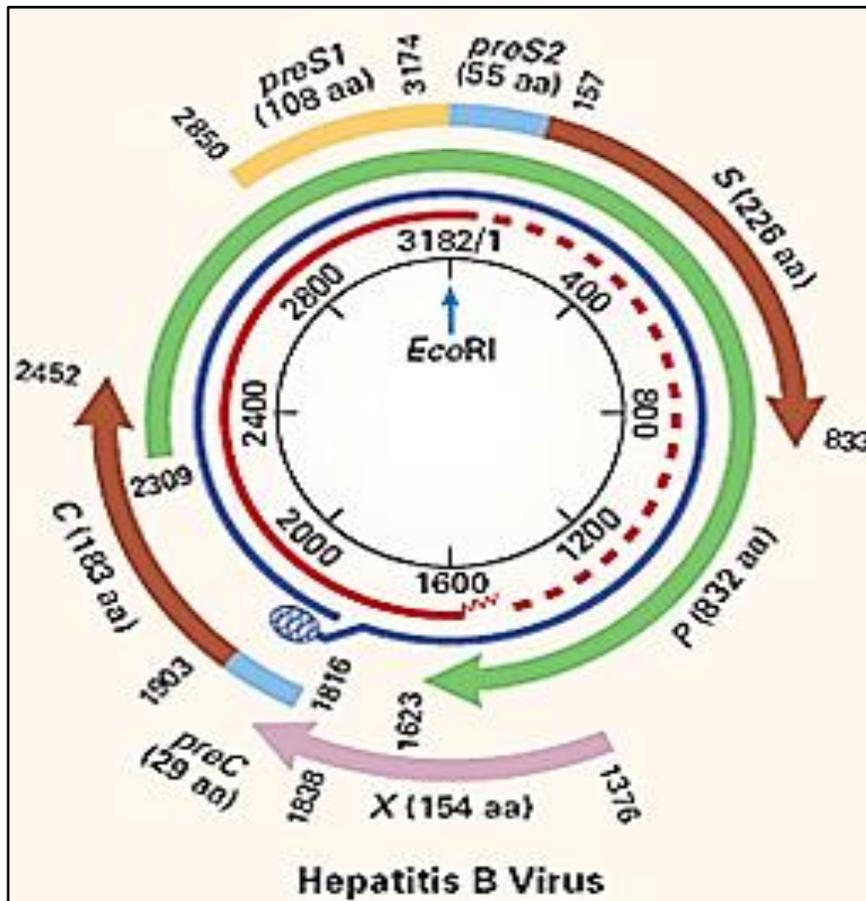


Figura 1. Genoma del VHB, adaptado de Lee W. M. N England J Med 1997; 337:1733-45

II.III Ciclo de replicación

La figura 2 muestra las etapas de la replicación del VHB. Una de las características principales de esta familia de virus (*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 que se conoce como ARN intermediario. ⁽¹⁾

Los viriones viables que circulan por la sangre, llegan al hígado y se adhieren a las membranas del hepatocito, una vez adherido, el virus se fusiona con la membrana celular. Al entrar, se libera la nucleocápside y se transporta desde el citoplasma hacia el núcleo, ahí, el ADN viral, se modifica a una forma circular cerrada covalentemente (ADNccc), la cual sirve como templete transcripcional de la ARN polimerasa II del huésped. Esta enzima genera una serie de transcritos genómicos y sub-genómicos (1). El transcrito genómico es de mayor longitud que el genoma, denominado ARN pre-genómico. Los transcritos sub-genómicos son más cortos y sirven como ARNs mensajeros, los cuales se utilizan para la formación de la cápside. ^{(9) (10)}

El ARN viral se transporta al citoplasma donde se traduce para sintetizar la envoltura viral, la nucleocápside y las proteínas de la polimerasa, así como los polipéptidos X y pre-core (preC) o envoltura previa. A continuación, la nucleocápside se ensambla en el citosol y durante este proceso solo una molécula de ARN viral se incorpora a la nucleocápside. ⁽¹⁾

Una vez que el ARN viral se encapsula, comienza la reversotranscripción. La síntesis de las dos cadenas del ADN viral es secuencial. La primera cadena de ADN se sintetiza a partir del templete del ARN encapsulado, durante o después de la síntesis de esta cadena, el templete de ARN se degrada y procede la síntesis de la segunda cadena de ADN, con el uso de la primera cadena de ADN como templete. ⁽¹⁾

Algunas nucleocápsides que llevan el genoma maduro se transportan de nuevo al núcleo celular, donde su nuevo ADN genómico se puede convertir en ADNccc para mantener un grupo estable dentro del núcleo celular de templetos transcripcionales. ⁽¹⁾

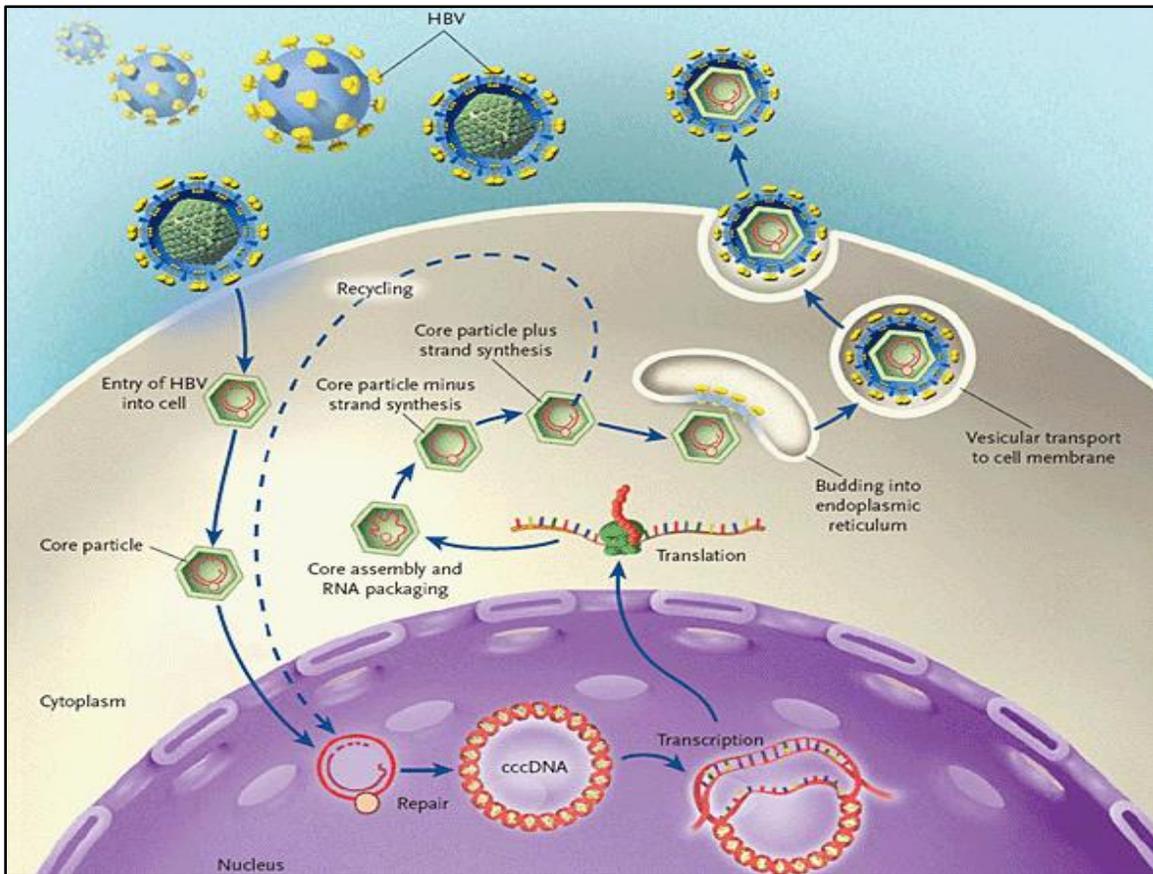


Figura 2. Ciclo de replicación del VHB, adaptado de Ganem et al. N England J Med2004;350:1118-1129

II.IV Genotipos del VHB y su epidemiología

La clasificación de los genotipos se determina con base en la divergencia de la secuencia del genoma completo, la cual debe de ser $> 8\%$. El VHB se ha clasificado en 8 genotipos designados desde el A y hasta el H. ^{(11) (12) (13) (14)}

El VHB está distribuido en todos los países del mundo con una alta prevalencia en los países Africanos, así como en Medio Oriente y China (Fig. 3) ⁽¹⁵⁾. Los genotipos, a su vez, poseen restricción geográfica (Fig. 4). En el continente americano, los genotipos H, F y G son comunes en los E.U.A., mientras que el genotipo F es predominante en los países de Centroamérica. El genotipo D prevalece en la Europa mediterránea, mientras que el genotipo A es frecuente en el noroeste de Europa. El genotipo E es común en el África subsahariana y el

genotipo A en Sudáfrica. En Asia se han descrito los genotipos B y C con predominio en países del sureste, mientras que el genotipo D es frecuente en el centro de Asia y Medio Oriente.^{(2) (16)} Los informes indican que los genotipos del VHB se relacionan con la severidad de la enfermedad hepática así como la respuesta a la terapia antiviral.^{(12) (14)}

Poco se sabe sobre la epidemiología molecular de VHB en México con base en secuencias completas. Estudios previos sobre los genotipos del VHB mostraron la prevalencia del genotipo H en pacientes sintomáticos^{(7) (8) (12)}, mientras que los genotipos C y F se identificaron en pacientes asintomáticos⁽⁷⁾. Aunque algunas cepas clasificadas anteriormente como genotipo F ahora podrían clasificarse como el genotipo H.⁽¹¹⁾

Se han definido nueve subtipos serológicos diferentes, lo que refleja la variabilidad genética del VHB. El determinante “a” es común en todos los subtipos, pero también se han detectado dos pares de sub-determinantes mutuamente exclusivos (w/r, y, d/y). Usando esta herramienta para realizar estudios epidemiológicos, se han identificado los nueve subtipos serológicos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+ y adrq-.^{(9) (17)}



Fig. 3 Epidemiología del VHB, tomado de Shepard C. W. et al. *EpidemiolRev* 2006; 28:112-125.

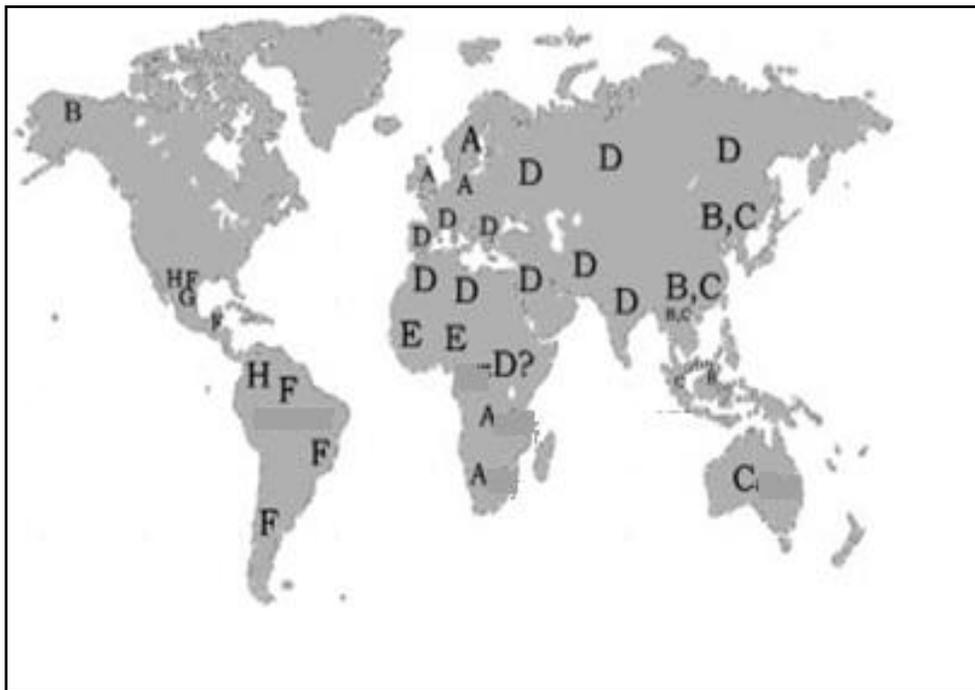


Figura 4. Distribución geográfica de los genotipos del VHB, tomado de Batholomeusz A. and Schaefer S. *Rev. Med. Virol.* 2004;14: 3-16.

II.V Tratamiento de la hepatitis B

Los principales objetivos del tratamiento para la hepatitis B son la supresión sostenida en la replicación del VHB (cuantificación de ADN por debajo de los límites de detección de ensayos de PCR en tiempo real), la remisión bioquímica, la mejora histológica y la eliminación de los HBeAg y HBsAg o evitar su seroconversión.^{(18) (19)}

Actualmente existen dos clases de antivirales para el tratamiento de la hepatitis B: los inmuno-moduladores y los análogos nucleótidos/ nucleósidos (cuadro 1). Los cuales surgieron desde hace 20 años (Fig. 5).^{(20) (21)}

En 1998 se aprobó el uso de Lamivudina (un L-nucleósidos) como primer fármaco útil en la infección por VHB que junto con el Adefovir fueron la principal estrategia de tratamiento de 1998 al 2004.⁽²¹⁾ Posteriormente, una nueva formulación de INF- α llamada INF-2 α pegilado en 2005 vino a reforzar o a sustituir el tratamiento con Lamivudina en aquellos pacientes con resistencia a este último.⁽²²⁾ También, en ese mismo año, se aprobó el Entecavir, para pacientes con resistencia a Lamivudina/Adefovir. En el 2006 apareció la Telbivudina (análogo nucleósido) con una mayor potencia que la Lamivudina, ya que reduce hasta 1 log₁₀ en la CV después de un año. Y por último el Tenofovir (análogo nucleótido) aprobado en el 2008, con una eficiencia optima de reducción de hasta 6 log₁₀ en la CV que se usa como terapia de rescate para aquellos pacientes con resistencia a todos los anteriores fármacos.⁽²¹⁾

Interferones	Análogos	
	Nucleósidos	Nucleótidos
<ul style="list-style-type: none"> • Interferón alfa (IFN-α) • Interferón alfa pegilado (PEG-INF-α) 	<ul style="list-style-type: none"> • Lamivudina • Entecavir • Telbivudina 	<ul style="list-style-type: none"> • Adefovir • Tenofovir

Cuadro 1. Terapias antivirales para el tratamiento de la hepatitis B

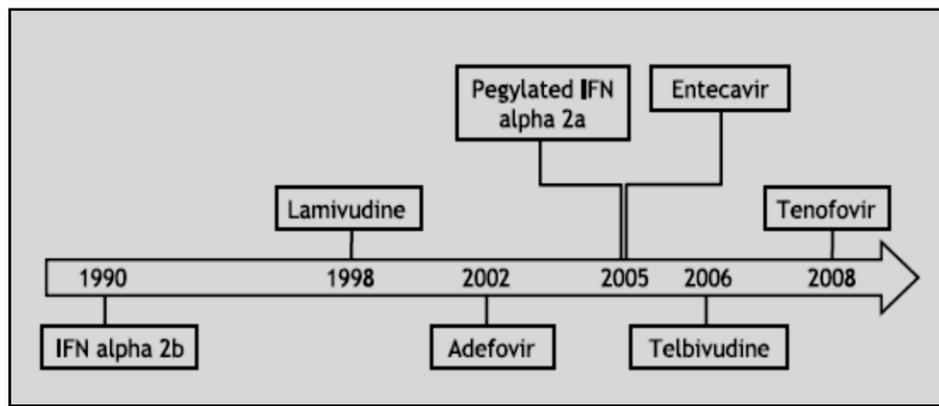


Figura 5. Tratamiento aprobado a través del tiempo para la hepatitis B, tomado de Yuen M.F. and Lai C. L. J Gastroenterol Hepatol. 2011; 26: Suppl 1:138-143.

- Interferones.

Los interferones (IFN) son una familia de proteínas que el organismo produce como mecanismo defensivo de primera línea frente a la infección viral con propiedades anti-virales, anti-proliferativas e inmunomoduladoras ⁽²³⁾.

La actividad biológica del IFN se realiza mediante su unión a receptores específicos de la membrana de la célula. Como consecuencia de la ocupación del receptor se activa la célula y en el núcleo celular tiene lugar la inducción de la expresión de un conjunto de genes que inducen la síntesis de proteínas, como la protein-cinasa p68, la cual a su vez inhibe la síntesis de proteínas virales, con la

consiguiente inhibición de la replicación viral. La acción antiviral se potencia mediante el efecto inmunomodulador. El IFN facilita la destrucción de las células infectadas mediante dos mecanismos. Por una parte, estimula la aparición en la membrana celular de antígenos de clase I del sistema de histocompatibilidad HLA, necesarios para que los linfocitos T citotóxicos ejerzan su acción lítica sobre los hepatocitos en cuyo interior se está replicando el virus. Por otra parte, el IFN incrementa la acción de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en ingles), que son linfocitos citotóxicos que actúan de modo inespecífico sobre las células infectadas por los virus (Fig. 6) ⁽²⁴⁾

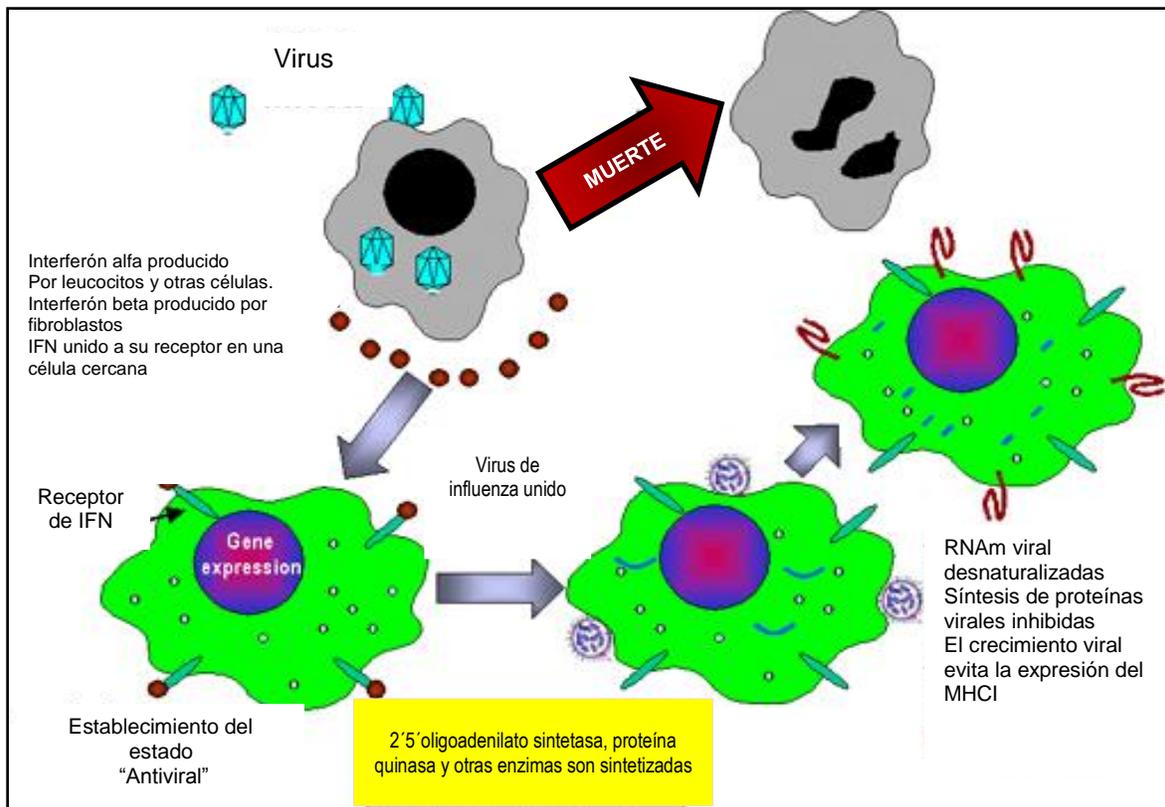


Figura 6. Mecanismo de acción antiviral del IFN, tomado de Thomas H., Foster G. and Platis D.J Hepatol. 2003;39: S93-S98.

- Análogos nucleótidos/nucleósidos (ANs)

Los análogos nucleótidos/nucleósidos (ANs) son fármacos que poseen una estructura similar a los nucleótidos que forman parte del ADN (Fig. 7).

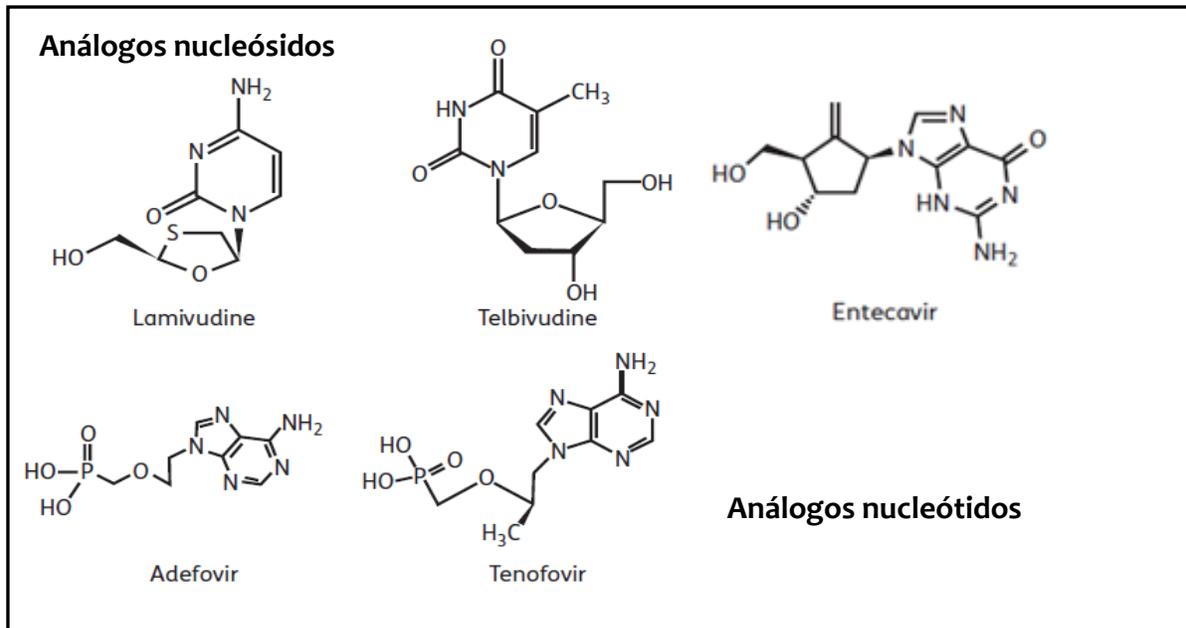


Figura 7. Estructura molecular de los análogos nucleótidos / nucleósidos, tomado Fung J., Ching-Lung, Seto W. and Yuen Man-Fung. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66 (12): 2715-25.

Por lo que al entrar en la célula son fosforilados por distintas cinasas hasta convertirse en nucleótidos que inhiben de manera competitiva la transcriptasa reversa al incorporarse al ADN viral provocando el fin de la elongación de la hebra debido a que carecen del grupo 3-OH (Fig. 8). (20) (23) Los ANs se dividen en tres grupos principales. (25)

1. Los análogos L- nucleósidos que incluyen la Lamivudina (2',3'-dideoxi-3' tiacitidina) y la Telbivudina (L-timidina).
2. Los nucleósidos fosforados acíclicos, representados por Adefovir y Tenofovir.

- Los análogos de la deoxiguanosina en el cual la mitad de la desoxirribosa es remplazada por un ciclopentano-entecavir.

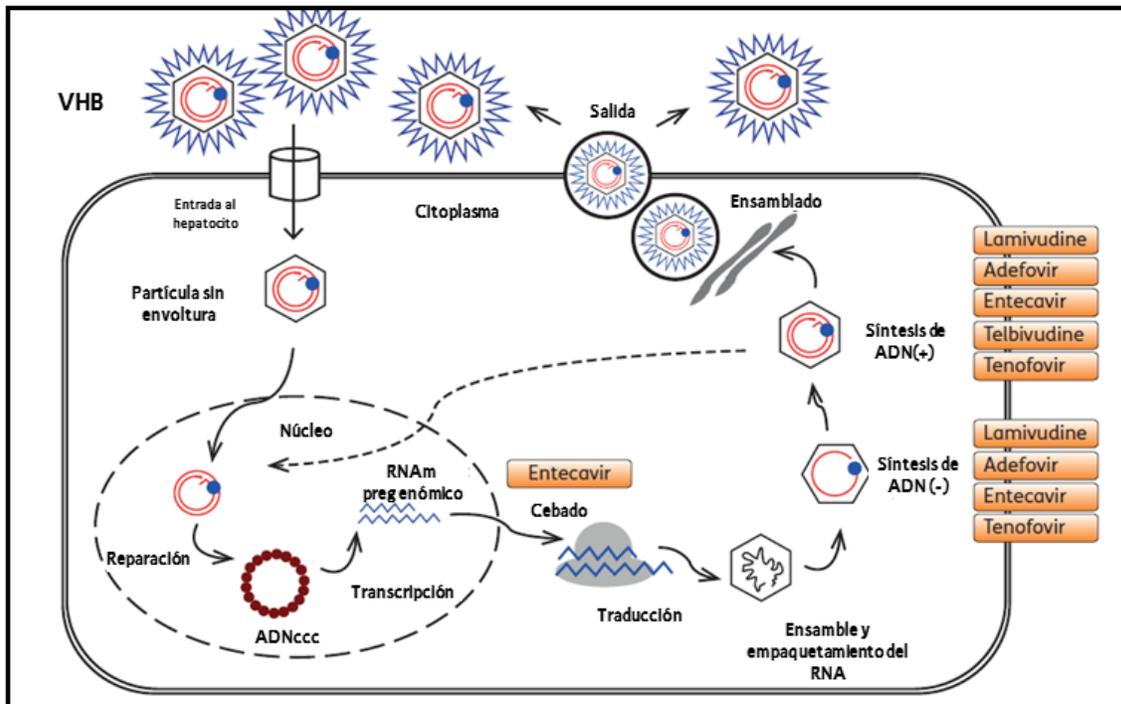


Figura 8. Sitios de acción de los análogos nucleótidos / nucleósidos durante el ciclo de replicación del VHB, tomado de Fung J., Ching-Lung, Seto W. and Yuen Man-Fung. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66 (12): 2715-25.

La mayor desventaja del uso de ANs es el potencial desarrollo de mutaciones asociadas a resistencia (20), que depende de factores como la replicación viral, la cual es muy alta, de aproximadamente de 1×10^{11} partículas virales por día, la tasa de error de la polimerasa del VHB que es de $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ nucleótidos/base/ciclo y finalmente a la presión selectiva ejercida por los fármacos. (20) (26)

II.VI Resistencia a fármacos antivirales.

La resistencia a fármacos antivirales se detecta en el incremento de la carga viral que actualmente es el mejor indicador disponible para determinar la replicación del VHB “*in vivo*”. Un efecto antiviral se define como la reducción de la concentración de ADN del VHB en el suero de $1 \log_{10}$ [IU/mL] dentro de los primeros 3 meses. Un

incremento en la concentración de ADN del VHB en el suero de $1\log_{10}$ [IU/ mL] en el punto más bajo posterior al tratamiento inicial constituye una falla secundaria al tratamiento (Fig. 9).

La dificultad de lograr esta disminución constituye una falla del tratamiento primario. Es necesaria la genotipificación y/o fenotipificación de los aislados para confirmar que la falla del tratamiento se debe a virus resistentes. ⁽²⁵⁾

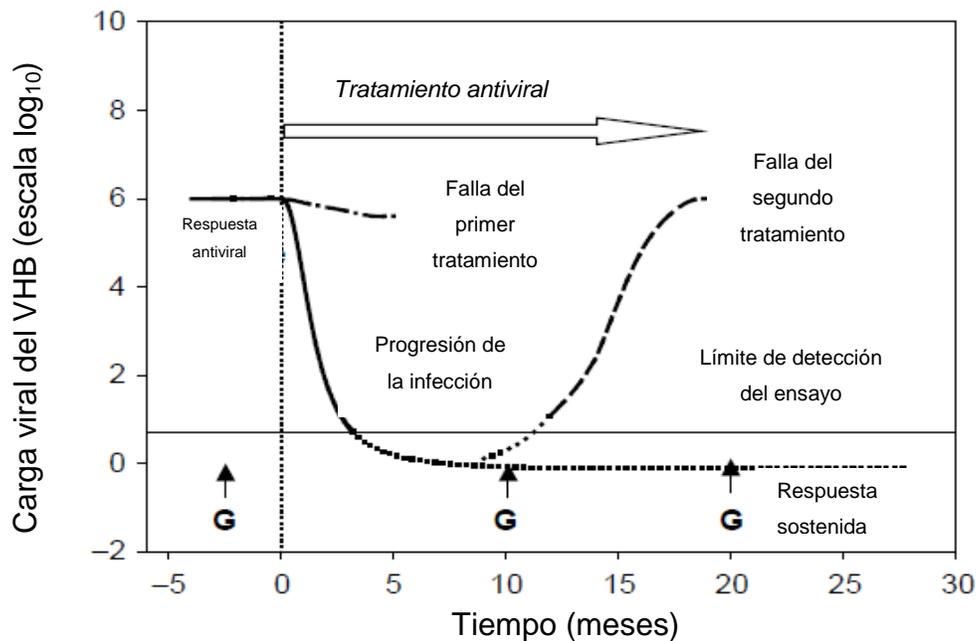


Figura 9. Respuesta a tratamiento antiviral en pacientes con VHB, tomado de Shaw, T. BartholomeuszA. y Locarnini, S. *J Hepatol.* 2006; 44: 593–606.

En la mayoría de los casos, el tratamiento de la hepatitis B con cualquiera de los ANs produce la supresión rápida de la replicación del VHB a corto plazo; un efecto que a menudo no es sostenible debido a la aparición de cepas de VHB resistentes a los medicamentos. Aunque existen diversos factores, como los efectos adversos a corto plazo, la toxicidad a largo plazo, tratamiento previo sub-óptimo, exposición al fármaco inadecuado (debido a las propiedades farmacológicas de los medicamentos, el paciente no cumple con el tratamiento prescrito así como los polimorfismos genéticos del hospedero) que influyen en la eficacia de los tratamientos para la infección crónica por VHB, la resistencia a los fármacos es el factor más importante en el fracaso del tratamiento. ⁽²⁵⁾

Las mutaciones que confieren resistencia a los fármacos alteran la interacción entre los sitios de unión de estos y la polimerasa del VHB, por lo que es en esta proteína donde se encuentran las mutaciones, específicamente en el dominio de la Transcriptasa Reversa (RT) (Fig. 10) ^{(23) (26) (27)}

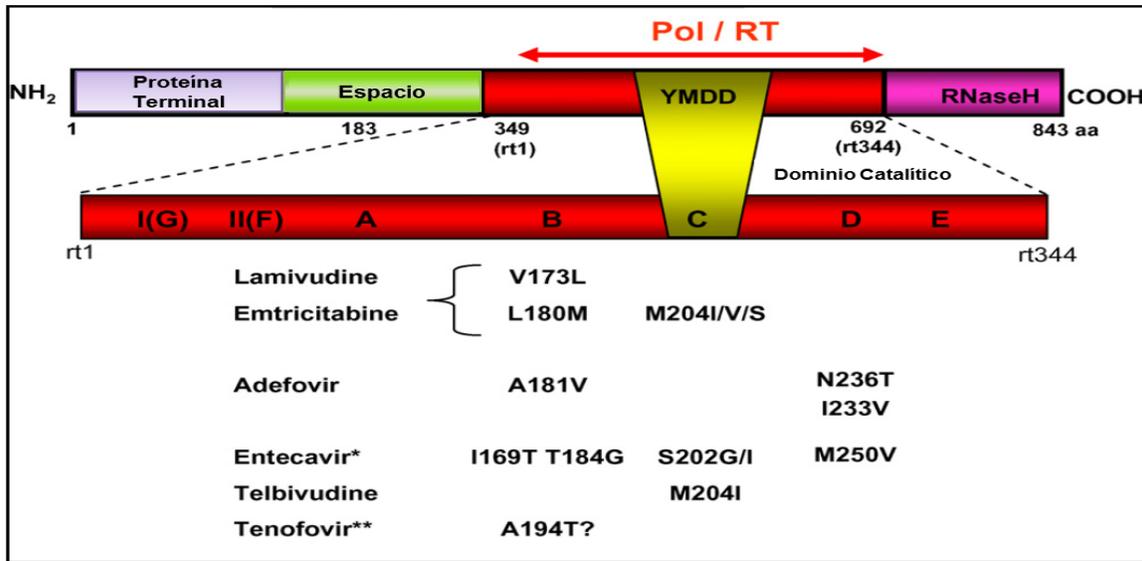


Figura 10. Esquema de los cuatro dominios del gen de la polimerasa, la región RT está ampliada para mostrar las mutaciones asociadas a resistencia a los ANs, tomado de Kay A. Virus Res. 2007.127;(2): 164-176.

➡ Resistencia a Lamivudina.

La Lamivudina fue aprobada en 1998 para el tratamiento de la hepatitis B ^{(20) (21)}. Las mutaciones que resultan de la sustitución de metionina en el *motif* tirosina-metionina-aspartato (YMDD -sitio catalítico-) por valina, isoleucina y ocasionalmente serina son suficientes para conferir resistencia a Lamivudina. Estas sustituciones se representan como rtM204V, rtM204I y M204S, respectivamente. La rtM204I se puede encontrar sola, pero las rtM204V/S se encuentran con otras mutaciones compensatorias como las rtL180M/C, rtV173L, rtL80V/I y la rtA181T/V (está mutación confiere resistencia cruzada con Adefovir). ^{(20) (25)}

➡ Resistencia a Adefovir.

El Adefovir fue aprobado en el 2002 para el tratamiento de la hepatitis B ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾, el cual es más eficaz contra las mutaciones de la Lamivudina, sin embargo existen tres mutaciones suficientes que confieren resistencia al Adefovir, la rtA181V/T, rtN236T y recientemente la rtI233V está asociada a resistencia primaria. ⁽²⁰⁾ ⁽²⁵⁾

➡ Resistencia a Entecavir.

Fue aprobado en el 2005 para el tratamiento de la hepatitis B ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾ y tiene una alta barrera genética, ya que se requiere la combinación de tres de las siguientes mutaciones para que se pueda desarrollar resistencia a este fármaco: rtM204V, rtL180M (mutaciones responsables de la resistencia a Lamivudina), rt169T, rtT184G, rtS202I y la rtM250V. ⁽²⁰⁾ ⁽²⁵⁾

➡ Resistencia a Telbivudina.

Fue aprobada en el 2006 para el tratamiento de la hepatitis B, la principal mutación que le confiere resistencia es la rtM204I pero existen otras mutaciones secundarias como la rtL80I/V y la rtL180M, otras mutaciones que también están asociadas a resistencia son la rtA181T/V y la rtL229W/V, aunque son menos comunes. ⁽²⁰⁾ ⁽²⁸⁾

➡ Resistencia a Tenofovir.

Fue aprobado en el 2008 para el tratamiento de la hepatitis B no obstante está disponible desde el 2002 para el tratamiento de la infección por VIH, la mutación rtA194T es la única que se ha observado que confiere resistencia, además de presentarse en pacientes co-infectados. ⁽²⁰⁾ ⁽²⁵⁾

Para la detección de mutaciones que confieren resistencia a los antivirales así como de los genotipos del VHB se utiliza la genotipificación por medio de diferentes métodos, los cuales se describen a continuación. ⁽²⁵⁾ ⁽²⁶⁾

II.VII Métodos para la genotipificación del VHB

Actualmente existen métodos diferentes de genotipificación: INNO-LiPA[®] HBV (De Hibridación Inversa, Innogenetics, Belgica), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, por sus siglas en inglés), PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) multiplex, serotipificación, microarreglos de oligonucleótidos, *DotBlot* reverso, RFMP (*Restriction Fragment Mass Polymorphism*, por sus siglas en inglés), ensayo invasivo y PCR en tiempo real) cada uno tiene diferente sensibilidad, especificidad, tiempo de respuesta y costo. ⁽²⁹⁾

1º. Determinación del genotipo del VHB utilizando RFLP.

Se ha desarrollado un método RFLP con base en la amplificación del gen S seguido de la digestión utilizando las enzimas de restricción: HphI, NciI, Alwi, Earl y NlaIV que distinguen los diferentes genotipos del VHB. La elección de la enzima de restricción se basa en el análisis de las secuencias de los diferentes genotipos descritas en el *GenBank*. Los polimorfismos de un sólo nucleótido se traducen en un cambio en el sitio de la restricción que afectará la digestión y la fiabilidad de la determinación del genotipo. ⁽¹⁶⁾ ⁽²⁹⁾

2º. Determinación del genotipo del VHB con pruebas serológicas.

Para distinguir los diferentes genotipos del VHB, se han desarrollado ensayos con anticuerpos monoclonales específicos; también se diseñó un panel de anticuerpos monoclonales para las regiones preS2 y S que distinguía los genotipos A, B, C, D, E y F. Estos anticuerpos monoclonales se pueden utilizar en los estudios a gran

escala. La determinación serológica del genotipo se confirmó realizando el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen S para un panel de 68 cepas del VHB donde se detectó un 100% de concordancia entre los dos métodos^{(16) (29)}.

Estos métodos tienen ventajas sobre el análisis de la secuencia, ya que es de bajo costo y fácil de realizar. Por lo tanto, este método es muy útil en estudios con una cohorte. La principal desventaja es que se analizan un número limitado de nucleótidos/aminoácidos y por lo tanto estos métodos no son tan confiables como el análisis filogenético de la secuencia^{(16) (29)}.

3°. Análisis de la secuencia

El método definitivo para la determinación del genotipo del VHB es el PCR y secuenciación del genoma completo seguido por el análisis filogenético. El análisis filogenético es un método para evaluar la relación evolutiva de cada una de las secuencias y las secuencias de control. La fiabilidad del árbol filogenético y el análisis estadístico se puede realizar mediante el examen de los datos con 1000 repeticiones (*bootstrap*) que requieren la interpretación de algoritmos computacionales necesarios para el análisis filogenético. Este tipo de análisis también se puede realizar individualmente para cada gen. La fiabilidad de la utilización de la secuencia de genes individuales está limitada a la secuencia del gen, dependerá tanto del tamaño de la secuencia como del grado de homología.^{(16) (29)}

4°. La genotipificación por PCR anidado con primers de tipo específico.

Los primers para la amplificación de los genotipos del A al F se basan en las diferencias de los nucleótidos conservados de los ORFs (Pre-S1 al S). La genotipificación con esta técnica utiliza dos amplificaciones de PCR. La primera ronda utiliza primers que amplifican todos los genotipos del VHB desde el A y hasta el F.⁽¹⁶⁾

Posteriormente a esta amplificación se someten a un segundo PCR los productos de PCR inicial, el cual consta de 6 pares de primers y se producen productos de PCR de seis tamaños diferentes, cada uno correspondiente a uno de los seis genotipos (del A al F). Este ensayo se ha validado usando 5 muestras de cada genotipo.⁽¹⁶⁾

5°. Determinación del genotipo del VHB con primers específicos para una PCR múltiple.

El PCR multiplex distingue los genotipos A al F, con seis pares de primers específicos para cada genotipo a partir de varias regiones del genoma que amplifican específicamente el genotipo en un solo PCR. El método se validó utilizando ADN clonado del VHB de los diferentes genotipos. La especificidad se probó con 120 sueros, con las secuencias de genotipos conocidos.^{(16) (29)}

II.VIII Importancia clínica de los genotipos.

Se han encontrado evidencias de complicaciones en los síntomas clínicos cuando el paciente presenta diferentes genotipos del VHB así como co-infecciones con otros tipos virales.⁽¹³⁾

La infección por los genotipos A y D conduce a una hepatitis crónica.^{(13) (29)} En un estudio de la India, donde los genotipos A y D son comunes, los pacientes infectados con el genotipo D tenían una enfermedad más severa y desarrollaron CHC.⁽¹⁴⁾

En la infección por los genotipos B y C es más rápido el progreso de la cirrosis y CHC^{(13) (29)}. Estudios en Taiwán, China y Japón indican que el CHC fue más

común en pacientes infectados con genotipo C en comparación con el genotipo B y los pacientes con el genotipo B tuvieron un mejor pronóstico. ⁽¹⁴⁾

Asimismo la co-infección por el genotipo F y el Virus de la Hepatitis Delta (VHD) genotipo III, están asociados con la hepatitis fulminante ^{(13) (30)}, presentan una alta tasa de mortalidad hepática y la aparición de CHC en menores de edad en comparación con los genotipos A, D y C. Por otro lado, se conoce poco sobre las complicaciones de la enfermedad y el genotipo E. ⁽¹⁹⁾ Mientras que el genotipo G se ha detectado casi exclusivamente en individuos que presentan co-infección con otros genotipos e incluso con el VIH, en donde este genotipo se asocia con el aumento de fibrosis hepática. ^{(13) (19)}

Del mismo modo se han asociado a los genotipos del VHB con la respuesta a la terapia antiviral. ⁽¹⁴⁾

En relación con los tratamientos disponibles contra VHB, los pacientes con genotipos C y D tienen un menor índice de respuesta a interferón que los pacientes infectados con los genotipos A o B. Esto se puede deber al desarrollo de más mutaciones en la región basal del promotor core de los genotipos C y D, en comparación con genotipos A y B ^{(14) (30) (31)}. La respuesta sostenida con Lamivudina fue más alta en individuos con genotipo B que con genotipo C, aunque el desarrollo a resistencia antiviral fue similar, también se encontró que la emergencia de resistencia a Lamivudina fue equivalente entre los genotipos A y D. ⁽¹⁸⁾

Un informe reporta que el genotipo A tiene 20 veces más el riesgo de desarrollar resistencia a Lamivudina en comparación con el genotipo D. Un estudio realizado en Taiwán indica que los pacientes infectados con el genotipo B tuvieron inicialmente una mejor respuesta virológica a Lamivudina durante los primeros 3 meses de tratamiento en comparación con las personas infectadas con el genotipo C; esto no continuó durante el tratamiento prolongado. ⁽¹⁴⁾

Los genotipos E, F y H son más susceptibles a la terapia con interferón que el genotipo G. ^{(18) (19)}

En México, la variabilidad genética del VHB que es mayoritariamente genotipo H y G ^{(8) (32) (33)} podría ser la causa que explicara la poca sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas utilizadas hasta la fecha en estudios sero-epidemiológicos, ya que las mismas se han diseñado, al igual que la vacuna contra el VHB, con base en los genotipos D y A. ⁽³²⁾ El papel del genotipo H, prevaliente en México y su asociación con la progresión de la infección no ha sido evaluado. ^{(11) (34)}

II.IX Filogenia

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas entre organismos que se pueden ilustrar mediante arboles filogenéticos donde se muestran los genes u organismos que son más parecidos entre sí. Se llaman arboles filogenéticos porque el diagrama que representa estas relaciones semeja la estructura de un árbol, por lo que también se usan los nombres de las partes de un árbol para referirse a las partes del diagrama (Fig. 11) ⁽³⁵⁾.

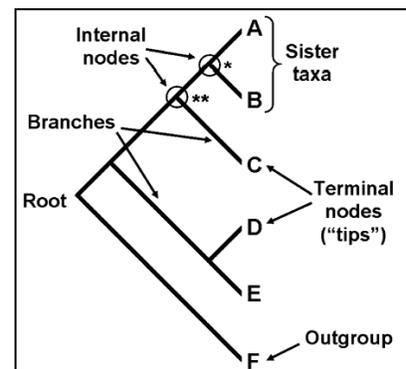


Figura 11. Estructura de un árbol filogenético, tomado de Gregory T. R. *Evo Edu Outreach*, 2008. 1: 121-137.

Asimismo todos los árboles filogenéticos proporcionan la misma información básica: un ancestro, la divergencia y la descendencia. ⁽³⁵⁾

Un árbol filogenético está compuesto de nodos, rama (*branch*), taxa (taxones) y al grupo de taxa se le llama clade o agrupaciones (*clúster*). El nodo representa el punto que conecta o en donde divergen las ramas, que pueden ser internos o

externos, los nodos internos (HTUs, Hypothetical Taxonomic Units, por sus siglas en inglés) representan los taxa que provienen de un mismo ancestro y los nodos terminales o externos (OTUs, Operational Taxonomic Unit, por sus siglas en inglés) representan los taxa; la longitud de las ramas representan la divergencia en los cambios que ocurren en los taxa. ⁽³⁶⁾ ⁽³⁷⁾

Existen dos tipos de árboles filogenéticos: los enraizados (*rooted*) también llamados cladogramas y los no enraizados (*not-rooted*) llamados fenogramas (Fig.12). Los arboles enraizados se utilizan para definir el tiempo de evolución y todas las secuencias en estudio tienen un ancestro en común (raíz), mientras que los arboles no enraizados se utilizan para mostrar la relación entre las secuencias y no especifican el tiempo de evolución. ⁽³⁶⁾ ⁽³⁸⁾

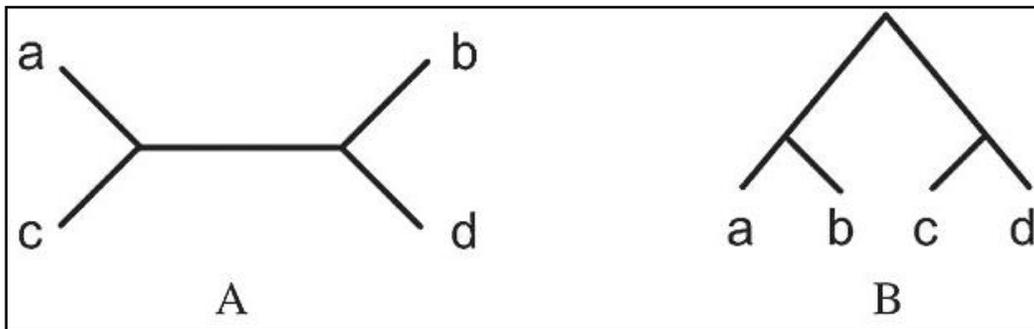


Figura 12. Tipos de árboles filogenéticos. (A) Árbol no enraizado y (B) Árbol enraizado, tomado de Barry G. H. *Phylogenetic Trees Made Easy*. 2005.

El procedimiento para la construcción de un árbol filogenético (Filogenia Molecular) con el uso de secuencias de ADN o proteínas se divide en 4 pasos. ⁽³⁶⁾

1. Elegir si se hará a partir de secuencias de ADN o proteínas.
2. Alineamiento múltiple de las secuencias.
3. Elegir el método de construcción de árboles.
4. Verificar la fiabilidad de los resultados.

Los métodos de construcción de árboles filogenéticos se clasifican de acuerdo al tipo de datos que emplean, los cuales se encuentran en el cuadro 2. ⁽³⁵⁾

Cuadro 2. Clasificación de los métodos de construcción de árboles

Métodos de construcción	
Distancias	<ul style="list-style-type: none"> • Neighbor-Joining o Unión cercana • UPGMA (<i>Unweight Pair Group Method with Arithmetic means</i> o Método de Pares sin Ponderar con Medias Aritméticas, por sus siglas en inglés).
Caracteres	<ul style="list-style-type: none"> • Máximum Parsimony • Máximumlikelihood

Posteriormente se utiliza un modelo estadístico para verificar la fiabilidad de los resultados como el *bootstrapping*, el cual realiza un re-arreglo de la topología del árbol múltiples veces (frecuentemente es de 1000, aunque se puede hacer sólo con 100, el cual es estadísticamente significativo).⁽³⁶⁾

III. Planteamiento del problema.

En México los métodos de genotipificación del VHB no tienen un alcance suficiente como para conocer el genotipo prevaleciente en el país así como la existencia de resistencia a fármacos antivirales y las relaciones filogenéticas-evolutivas. Siendo la secuenciación del genoma completo del VHB el método que puede dar esta información la cual también es importante para conocer la epidemiología molecular de este virus en México, donde según los últimos datos, existen 1.7 millones de mexicanos que son portadores del VHB (39). De igual forma, esta información epidemiológica y molecular, sería de vital importancia en la implementación de vacunas que sean útiles según la cepa viral a la cual esté diseñada tal vacuna, permitiéndonos controlar o erradicar este patógeno. Una técnica, como la aquí propuesta; estandarizada eficazmente tendría una aplicación clínica de rutina, al darle información al médico que le permita elegir un tratamiento que sea efectivo, según la cepa prevaleciente en cada portador o paciente.

IV. Objetivo General

Amplificar y secuenciar el genoma completo del VHB como herramienta para la determinación del genotipo en pacientes con infección por hepatopatía del INCMNSZ.

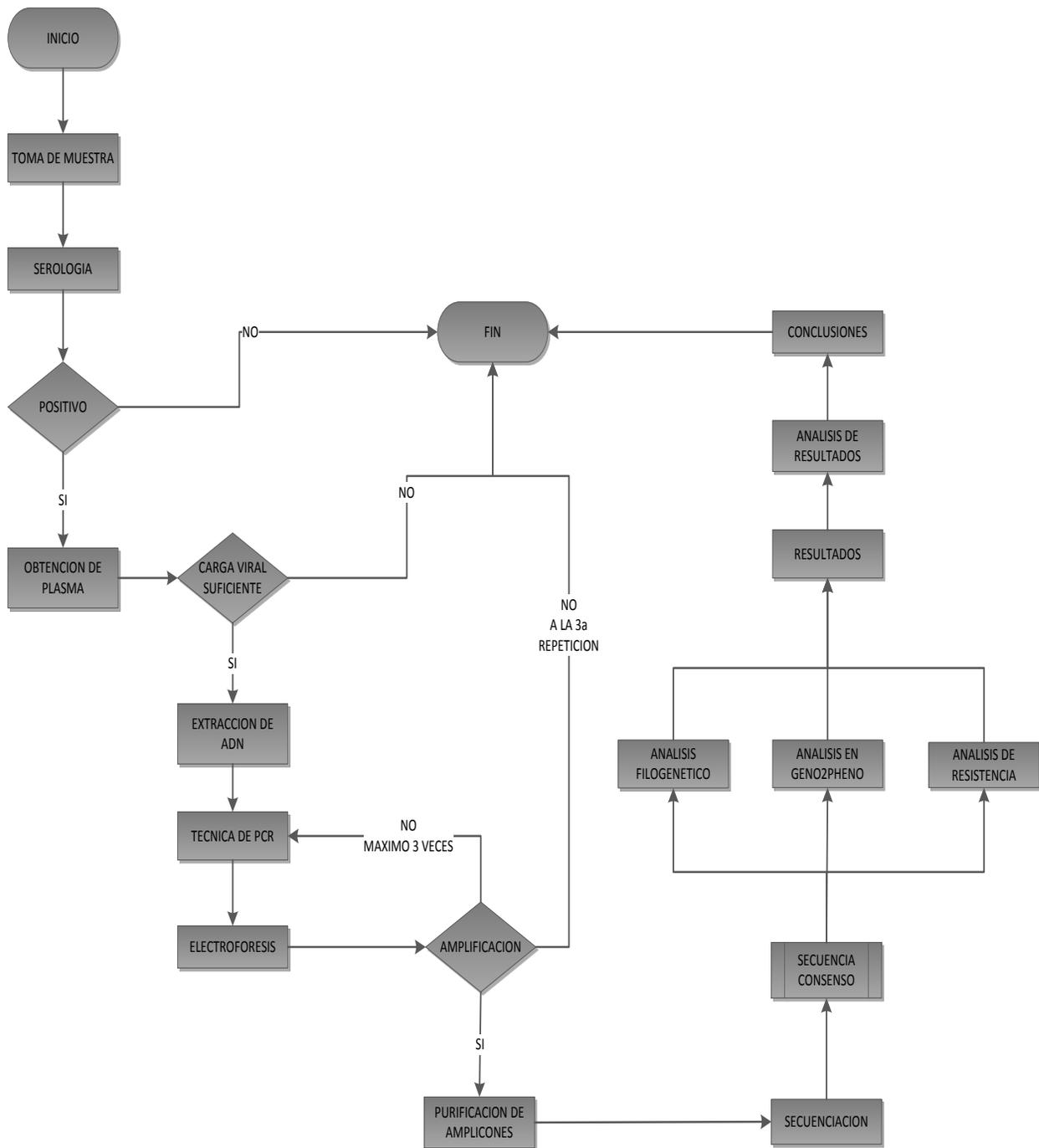
IV.I Objetivos Específicos.

- 1º. Estandarizar la técnica de PCR para la amplificación del genoma completo del VHB.
- 2º. Determinar la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica de PCR
- 3º. Secuenciar por la técnica de Sanger los fragmentos amplificados del PCR.
- 4º. Analizar filogenéticamente las secuencias consenso del genoma completo del VHB.
- 5º. Determinar las mutaciones asociadas a la resistencia a fármacos antivirales.
- 6º. Enviar a una base de datos internacional las secuencias del genoma completo del VHB obtenidas de pacientes Mexicanos.

V. Diseño experimental.

- Tipo de estudio: Descriptivo.
- Población de estudio: 4 muestras de sangre de pacientes del departamento de gastroenterología del INCMNSZ.
- Criterios de inclusión: Pacientes con serología positiva a HBsAg (Antígeno de superficie de hepatitis B) y carga viral suficiente para establecer la sensibilidad del método a estandarizar.
- Criterios de exclusión: Pacientes con serología negativa a HBsAg y/o carga viral indetectable

Estrategia metodológica general para la secuenciación del genoma completo del VHB



V.I Material y Método.

Materiales	Métodos
Aguja	Toma de muestra sanguínea
Tubos con EDTA	
Ligadura	
Torundas embebidas en alcohol al 70%	
Base para aguja (Holder)	
Centrifuga	Separación de plasma
Campana de flujo laminar	
Tubos cónicos de 1.5mL y 0.5mL	
Plumón con tinta indeleble	
Micropipetas: 20-200µL, 200-1000µL	
Puntas para Micropipetas	
Kit Abbott RealTime HBV	Carga viral
Abbott <i>m2000sp</i> (Robot de extracción de ácidos nucleicos)	
Abbott <i>m2000rt</i> (Termociclador de Tiempo Real)	Extracción de ADN
Kit de extracción de ADN viral (Qiagen)	
Centrifuga	
Vórtex	
Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL	
Tubos cónicos de 15mL	
Tubos cónicos de 0.5mL	
Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL	
Estuche con la enzima <i>AmpliTaq Gold</i>	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
Campana de extracción	
Placas para Termociclador	
Termociclador con una velocidad de aumento y disminución de 1°C/Min	
Agarosa	Electroforesis
Balanza granataria	
Charolas para pesar	
Espátula	
Matraz Erlenmeyer de 250mL	
Probeta 100mL	
TBE 0.5x	
Bromuro de etidio al 10%	
Micropipetas 0.5-10µL, 5-40µL	

Horno de microondas	
Cámara para electroforésis	
Fuente de poder	
Cámara de luz ultravioleta (Transiluminador)	
Columnas para purificación de ácidos nucleicos (Millipore)	Purificación de los productos de PCR
Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL	
Puntas para micropipeta	
Centrifuga	
Centrifuga de placas	
Plumón con tinta indeleble	
Estuche con marca fluorescente para secuenciación (BigDye 3.1v).	Secuenciación de los productos de PCR
Secuenciador de capilar <i>ABI PRISM 3130x/GeneticAnalyzer</i>	
Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL	
Centrifuga de placas	
Puntas para micropipeta	
Termociclador con una velocidad de aumento y disminución de 1°C/Min	
Secuencia de referencia con número de acceso al GenBank NC_003977	Análisis filogenético
Computadora	
Programa MEGA 5.0	
Secuencias en formato FASTA de las muestras y las del GenBank	

V.II Método.

Toma de muestra sanguínea.

1. Se acopló la aguja a la base para aguja (holder) sin destaparla.
2. Se ubicó la vena cefálica del brazo para la punción y se colocó la ligadura aproximadamente 5cm arriba del codo para hacer un torniquete.
3. Se limpió la zona de punción con una torunda embebida en alcohol al 70%, realizando un movimiento en forma circular de adentro hacia afuera.
4. Se destapo la aguja y se introdujo con el bisel hacia arriba.
5. Se introdujo el tubo en el extremo opuesto de la base de la aguja y se esperó a que se llene.
6. Se retiró el tubo y mezclo por inversión 8 veces.
7. Se colocó una torunda nueva en la zona de punción ejerciendo ligera presión al mismo tiempo que se retira el torniquete.
8. Se retiró la aguja y desecho en un recipiente rojo para material punzocortante.

Separación de plasma

1. Se rotularon dos tubos cónicos de 1.5mL y dos de 0.5mL con la clave de la muestra.
2. Las muestras se centrifugaron a 2000rpm por 10 minutos y dentro de la campana de flujo laminar se realizaron dos alícuotas de 1mL y dos de 0.2mL.
3. Las alícuotas de plasma se almacenaron en el ultracongelador a -70°C, hasta que se realizó la extracción de ADN.

Carga Viral (Estuche Abbott RealTime HBV)

1. Se siguieron las especificaciones del fabricante (ver anexo 1).

Extracción de ADN (Estuche de QIAGEN)

1. Se descongelo una alícuota de plasma de 0.2mL y se agregó 20µL de proteinasa K.

2. Se agregó 200µL de Buffer AL y se mezcló con vórtex por 15 segundos.
3. Se incubó a 56°C por 10 minutos en baño seco.
4. Se agregó 200µL de etanol absoluto y se mezcló por vórtex por 15 segundos
5. Se transfirió todo el contenido del tubo a una *QIAamp Spin Column* y se tapó.
6. Se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto.
7. Se desechó el filtrado y se colocó un nuevo tubo colector.
8. Se abrió la *QIAamp Spin Column* y se agregó 500µL del Buffer AW1 y tapó.
9. Se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto.
10. Se desechó el filtrado y colocó un nuevo tubo colector.
11. Se abrió la *QIAamp Spin Column* y se agregó 500µL del Buffer AW2 y tapó.
12. Se centrifugó a 14000rpm por 3 minutos.
13. Se desechó el filtrado y se colocó un nuevo tubo colector.
14. Se abrió la *QIAamp Spin Column* y se agregó 50µL del Buffer AE y tapó.
15. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.
16. Se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto.
17. Se almacenó en refrigeración a -20°C.

La Ta (temperatura de alineación) de los primers, se obtuvo mediante el programa (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>).⁽⁴⁰⁾

Primer	Secuencia	Tm (°C)
P1 (55-76)	5' CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC 3'	58.5
IN3 (512-493)	5' GTCCCGTGCTGGTAGTTGAT 3'	
P4 (230-254)	5' CCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACT 3'	57
S1-2 (685-704)	5' CGAACCACTGAACAAATGGC 3'	
POL-S (638-658)	5' CTATGGGAGTGGGCCTCAGTC 3'	57.5
OUT2(1384-1365)	5' CTAGCAGCCATGGAAAGGAG 3'	
POL-X (1337-1357)	5' ACTCAGTTGTCCTCTCTCGGA 3'	56
CORE(1875-1855)	5' TTGGAGGCTTGAACAGTAGGA 3'	
CORE(1807-1827)	5' CAGCACCATGCAACTTTTTCC 3'	56
POL-C (2477-2457)	5' TCCCACCTTATGAGTCCAAGG 3'	
OUT1(2289-2308)	5' CCGCTTACAGACCAYCAAAT 3'	54.5
BC1R (165-186)	5' GGTCTAGGAATCCTGATGTTG 3'	

- Se extrajo la placa del termociclador y se guardó a 4°C, hasta la purificación de los productos de PCR.

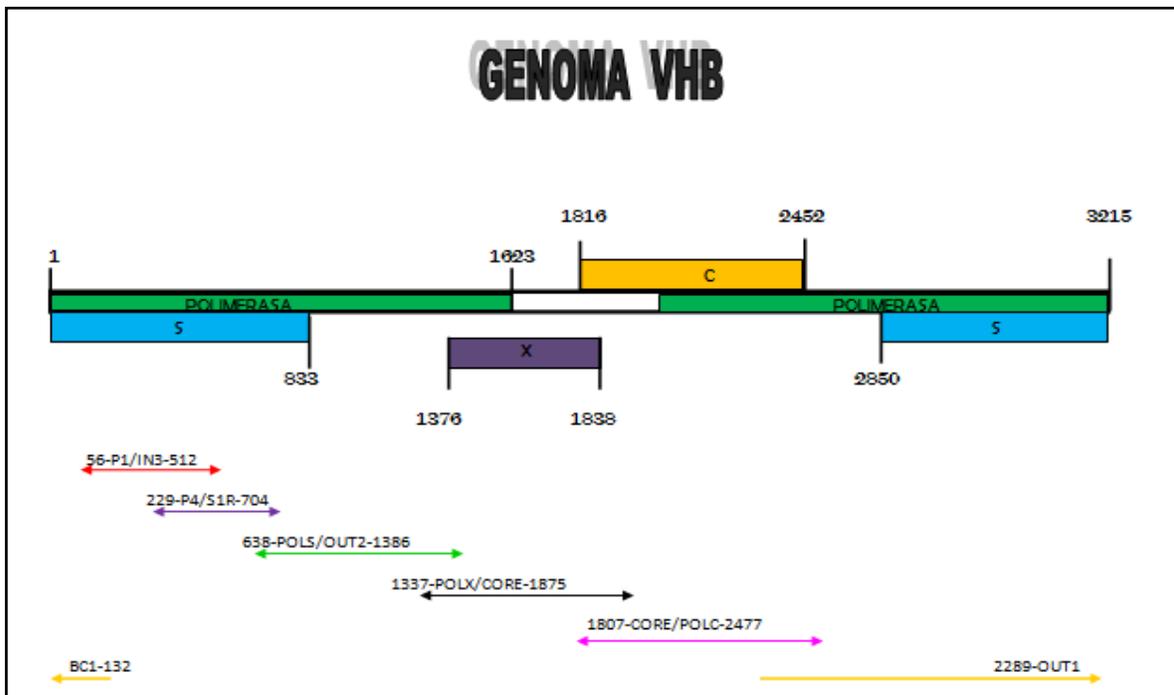


Figura 13. Representación del genoma completo del VHB las flechas de colores muestran los pares de primers a utilizar para amplificar cada segmento del genoma.

Electroforesis

1. Se pesó 1g de agarosa y se depositó en un matraz Erlenmeyer.
2. Se agregó 100mL de solución salina (TBE) 0.5x y se disolvió.
3. Se calentó en horno de microondas por 45 segundos.
4. Se agregó 5 μ L de bromuro de etidio.
5. Se vació el contenido al soporte para gel y se colocó el peine.
6. Se dejó solidificar.
7. Se llenó la cámara de electroforesis con TBE 0.5x.
8. Se sumergió el soporte con el gel en la cámara.
9. Por cada reacción, se mezcló 5 μ L del producto de PCR con 1 μ L de reactivo de carga y 4 μ L de TBE 0.5x y se depositó en un pozo del gel.
10. Se tapó la cámara de electroforesis, se conectó a la fuente de poder y se encendió.
11. Se dejó 1 hora a 90 volts y se apagó.
12. Se reveló el gel en el transiluminador.

Purificación de los productos de PCR (Estuche Millipore)

1. Se insertó un reservorio en un spin vial.
2. Se agregó 250 μ L de KCl [0.2mM] sin tocar la membrana del reservorio con la punta de la micropipeta.
3. Se agregó todo el producto de PCR y mezcló con la micropipeta.
4. Se centrifugó a 8000rpm por 15 minutos.
5. Se destapó el spin vial y se agregó 250 μ L de H₂O MilliQ.
6. Se centrifugó a 8000rpm por 15 min.

7. Se destapó el spin vial y se agregó 25µL de H₂O MilliQ.
8. Se desacopló el reservorio y se colocó de forma invertida en un tubo cónico nuevo.
9. Se centrifugó a 8000rpm por 5 minutos.
10. Se desechó el reservorio y se tapó el tubo.
11. Se almacenó a 4°C hasta la secuenciación.

Secuenciación de los productos de PCR

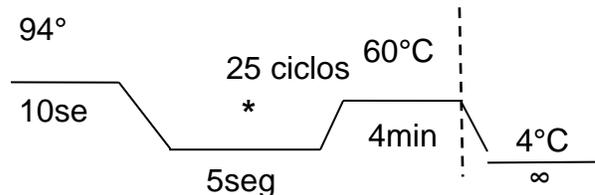
1. Se realizaron los cálculos para preparar el Master Mix (MMx) de cada primer.

Buffer amortiguador 5x	4
MMx significado	8
Primer	1
H₂O	3.5

2. Se acomodaron las muestras conforme al siguiente esquema; en una placa de 96 pozos, se colocó 15µL de MMx de cada primer más 5µL de producto de PCR purificado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Primer 1											
B	Primer 2											
C												
D												
E												
F												
G												
H												

3. Se metió la placa al termociclador con el siguiente programa.



**La Ta depende del par de primers que se van a secuenciar.*

4. Se extrajo la placa del termociclador.

5. Se agregó a cada pozo 80µL de isopropanol al 80%.
6. Se centrifugó a 3700rpm por 1 hora.
7. Se decantó el sobrenadante, invirtiendo la placa.
8. Se agregó a cada pozo 80µL de etanol al 70%.
9. Se centrifugó a 3700rpm por 20 minutos.
10. Se decantó el sobrenadante, invirtiendo la placa.
11. Se agregó 14µL de formamida y se resuspendió fuertemente.
12. Se centrifugó a 3700rpm por 1 minuto.
13. Se colocó la placa en el termociclador a 94°C por 2 minutos.
14. Se enfrió rápidamente la placa por 5 minutos a -20°C.
15. Se metió la placa al secuenciador.
16. Se programó el secuenciador.
17. Se almacenaron los resultados en USB para el análisis con el programa MEGA v5.0

Análisis de las Secuencias Obtenidas

1. Se buscaron y se descargaron las secuencias en formato FASTA del *GenBank* de los 8 subtipos (del A al H) conocidos del siguiente sitio de internet. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>).
2. Con el programa *Seq Scape v2.1.1* se analizaron las secuencias de los pacientes Mexicanos y se obtuvo la secuencia consenso de cada muestra.
3. Se descargó de internet el programa MEGA 5.1 (<http://www.megaprograma.net/>) y se realizó el análisis filogenético. ⁽⁴¹⁾
4. Con el programa *Geno2pheno* (<http://hbv.geno2pheno.org/index.php>) de la página electrónica del Instituto Max-Planck de Alemania se obtuvo el genotipo

y la resistencia a los antivirales.

Envío de las Secuencias Mexicanas al GenBank. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

1. Se accedió a la página electrónica del GenBank.
2. Se creó una cuenta individual.
3. Antes de seguir ya se contaba con la secuencia en formato FASTA y la información básica de cada secuencia, así como todas las características intrínsecas.
4. Se fue al campo de *New submission* y mediante un ayudador se siguieron los pasos que se indican.
5. Se esperó en el correo electrónico personal, la confirmación del envío de la secuencia.
6. Dos días después aproximadamente, llegó por parte del grupo de revisores del GenBank el identificador (ID) único de la secuencia.

VI. Resultados.

Para seleccionar las muestras que se procesaron, como primer requisito se les realizó, una prueba inmunoenzimática para antígeno de superficie del VHB (*Ortho-Clinical Diagnostics VitrosI immunodiagnostic Products HBsAg Reagent Pack In-vitro Diagnostics, Johnson and Johnson*), que se desarrolló en el Laboratorio de Serología del Departamento de Infectología del INCMNSZ. Si el resultado fue positivo, se continuó con el paso siguiente.

Conociendo que una muestra cumple con el primer criterio de inclusión (serología positiva para VHB), se procedió a cuantificar las partículas virales por medio de la técnica de PCR cuantitativo o Carga Viral (CV), que se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Infectología del INCMNSZ.

Carga Viral

m2000rt Reporte de Resultados	
Muestra	Resultados (UI/mL)
<i>RVLA</i>	>1,000,000,000
77264133	1,222,671,315
215994	197,141,115
SSE	28,686, 965
77252439	5070
MRAM	580
Control Positivo Bajo	271
Control Positivo Alto	23,527
Control Negativo	Indetectable

Cuadro 3. Valores de carga viral de las muestras procesadas con el método

Abbott Real Time HBV

Como se observa en el *cuadro 3* la muestra RVLA presento la carga viral más alta, por lo que esta fue la que se eligió para la estandarización de la técnica de PCR

se prepararon diluciones para establecer una curva de carga viral (*cuadro 4*) y así determinar la sensibilidad de la técnica. Este experimento se realizó por duplicado.

Sensibilidad del PCR

Diluciones de la muestra: RVLA	
Dilución	Carga Viral (UI /200µL)
Inicial	$2 \times 10^8 = 200,000,000$
1:10	$2 \times 10^7 = 20,000,000$
1:10	$2 \times 10^6 = 2,000,000$
1:10	$2 \times 10^5 = 200,000$
1:10	$2 \times 10^4 = 2,000$
1:10	$2 \times 10^3 = 2000$
1:10	$2 \times 10^2 = 200$

Cuadro 4. Diluciones seriadas de la muestra RVLA, realizadas para la determinar la sensibilidad del PCR.

PCR de la curva de diluciones de la muestra RVLA

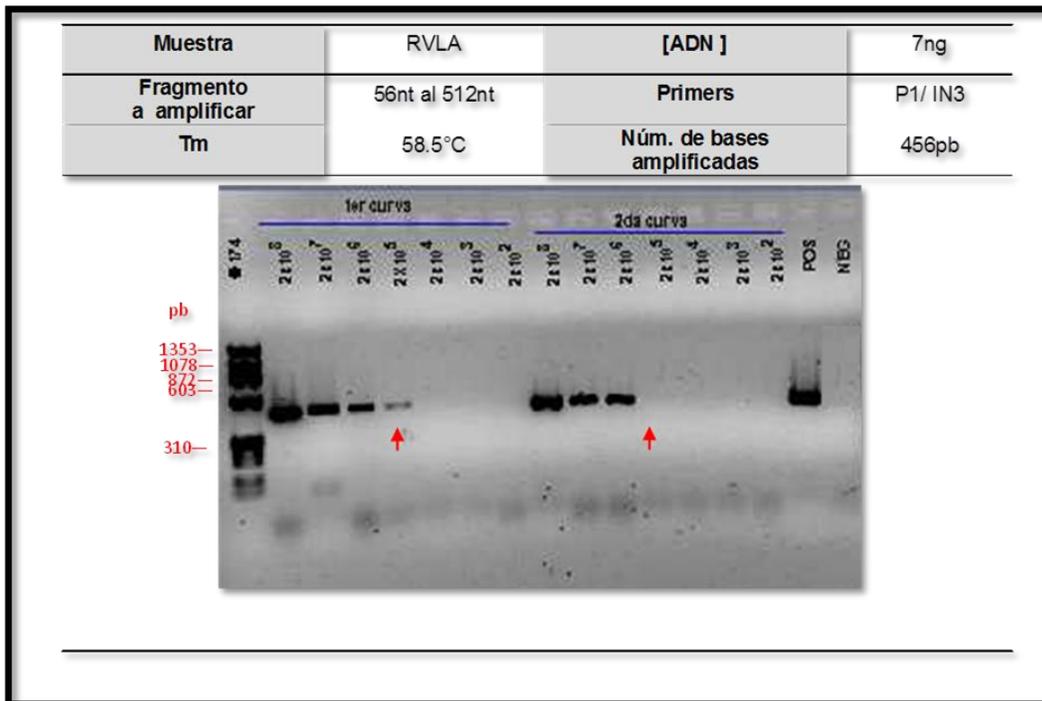


Figura 14. Foto de la electroforesis de los amplicones de la curva de carga viral del VHB en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio en donde las flechas rojas muestran como en la dilución 2×10^5 UI hay una ligera amplificación o definitivamente no existe amplificación.

Como se observa en la figura anterior, existe una amplificación decreciente a partir de 2×10^8 y hasta 2×10^6 UI/200 μ L, también se distingue una ligera amplificación con 2×10^5 UI/200 μ L pero es sólo en la primera curva, lo cual no asegura tener una amplificación con esa carga viral y por lo tanto se determinó que la sensibilidad del PCR es de **2×10^6 UI/ 200 μ L**.

Curva de optimización del volumen de ADN para el PCR

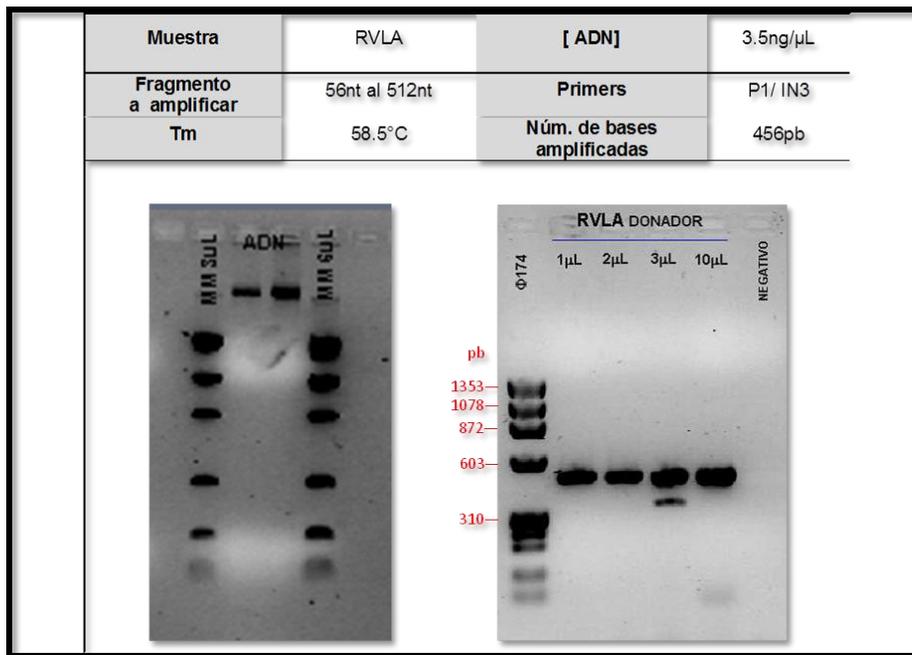


Figura 15. Electroforesis del ADN extraído con el método de QIAGEN y electroforesis de los amplicones para determinar la concentración de template de ADN a utilizar en la PCR en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Se probaron diferentes volúmenes de ADN de la muestra con la dilución que mostró mejor amplificación (2×10^6 UI/ 200 μ L), para poder optimizar el material genético extraído, se decidió realizar la estandarización con 2 μ l de volumen que corresponde a 7ng de ADN total (Figura 15).

Reproducibilidad

Para demostrar la reproducibilidad de los resultados anteriores se eligieron tres muestras más, con cargas virales diferentes y se realizó el mismo PCR (Fig.16).

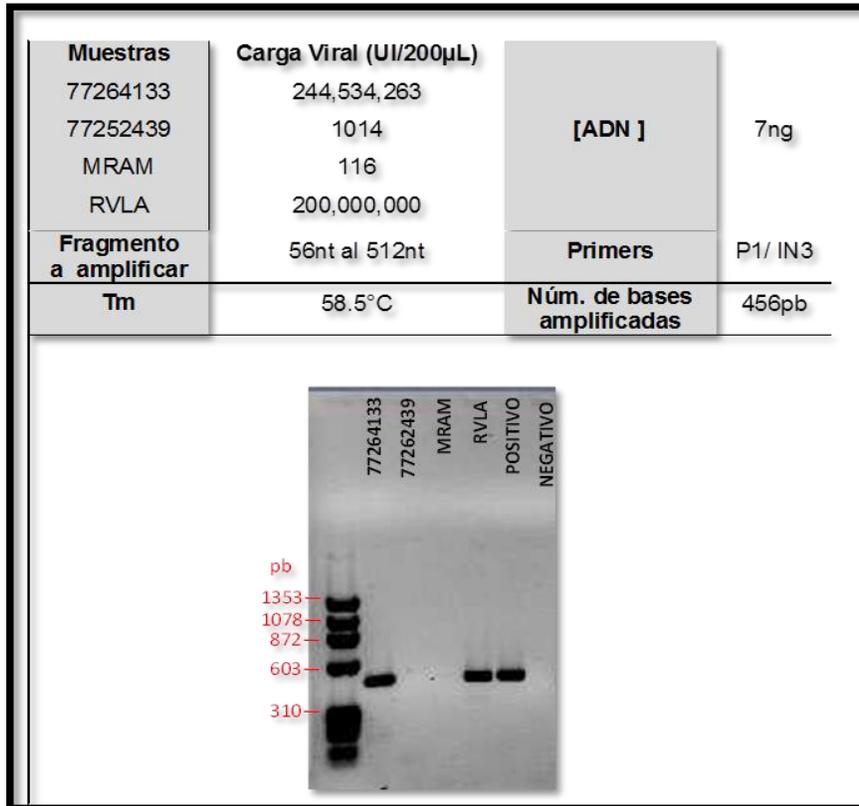


Figura 16. Especificaciones del PCR realizado y foto de la electroforesis de los amplicones en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio

Se observa amplificación en las muestras que tienen carga viral >200, 000,000 UI/ 200µL por lo cual se confirma que la sensibilidad del PCR es a partir de 2×10^6 UI/200µL así como su reproducibilidad.

Posteriormente se procedió a realizar los siguientes PCR para la amplificación de todo el genoma viral, basándonos en el mapa de la figura 13.

Una vez estandarizada la metodología para la extracción del ADN, el volumen adecuado para la PCR, las condiciones de reacción para la amplificación de los diferentes fragmentos del genoma del VHB así como la reacción de secuenciación por Sanger; se utilizó en las muestras 77264133, 215994 y SSE.

Amplificación de los diferentes fragmentos del Genoma

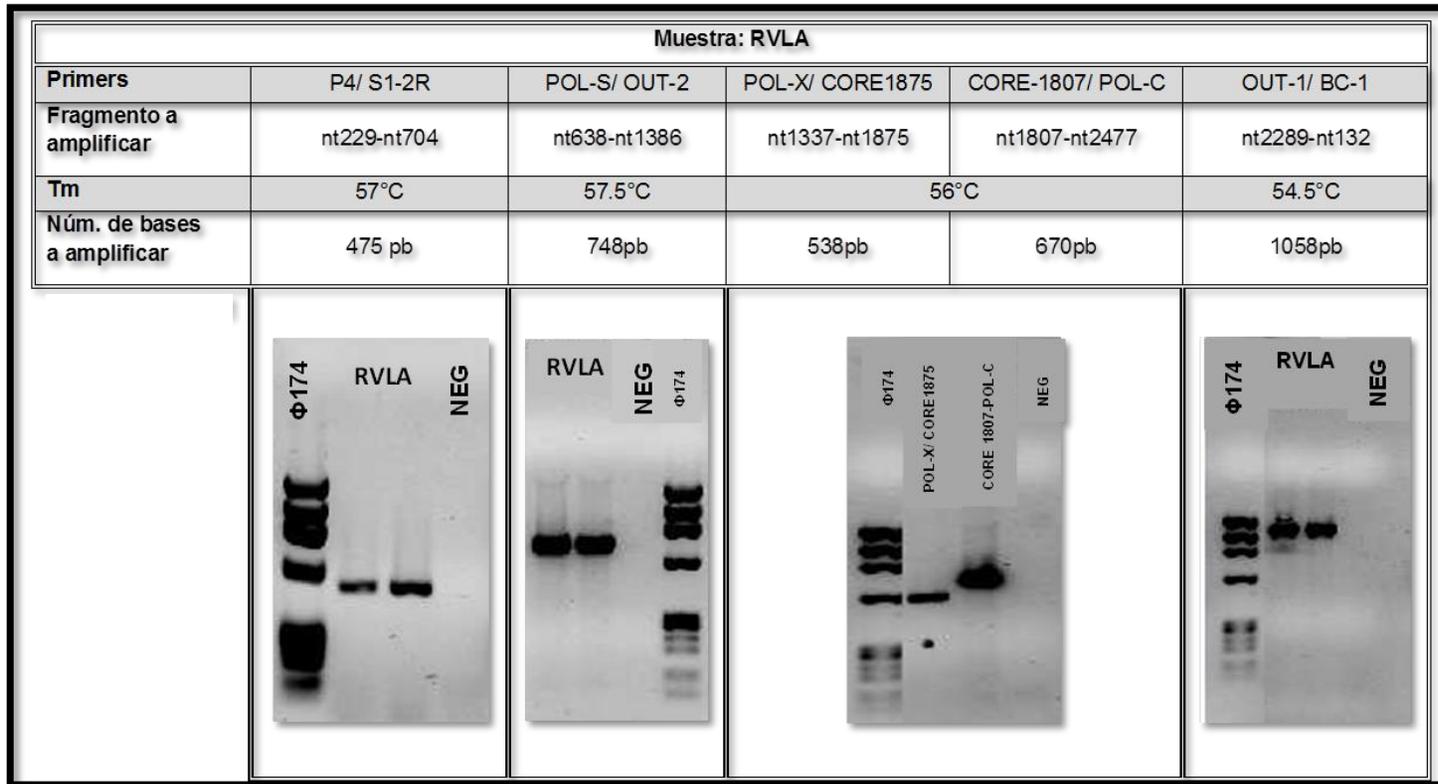


Figura 17. Especificaciones de los PCR realizados y fotos de la electroforesis de los amplicones en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio

Todos los fragmentos amplificados que se observan en la *Figura 17* correspondieron al número de bases que se esperaban amplificar, lo cual nos demostró que los primers usados son eficientes y por lo tanto ya se cuenta con los seis fragmentos necesarios para la secuenciación del genoma completo del VHB.

Secuenciación

Posteriormente se realizó la secuenciación de los amplicones, obteniéndose una secuencia consenso por cada muestra como el que se muestra a continuación.

Muestra: RVLA

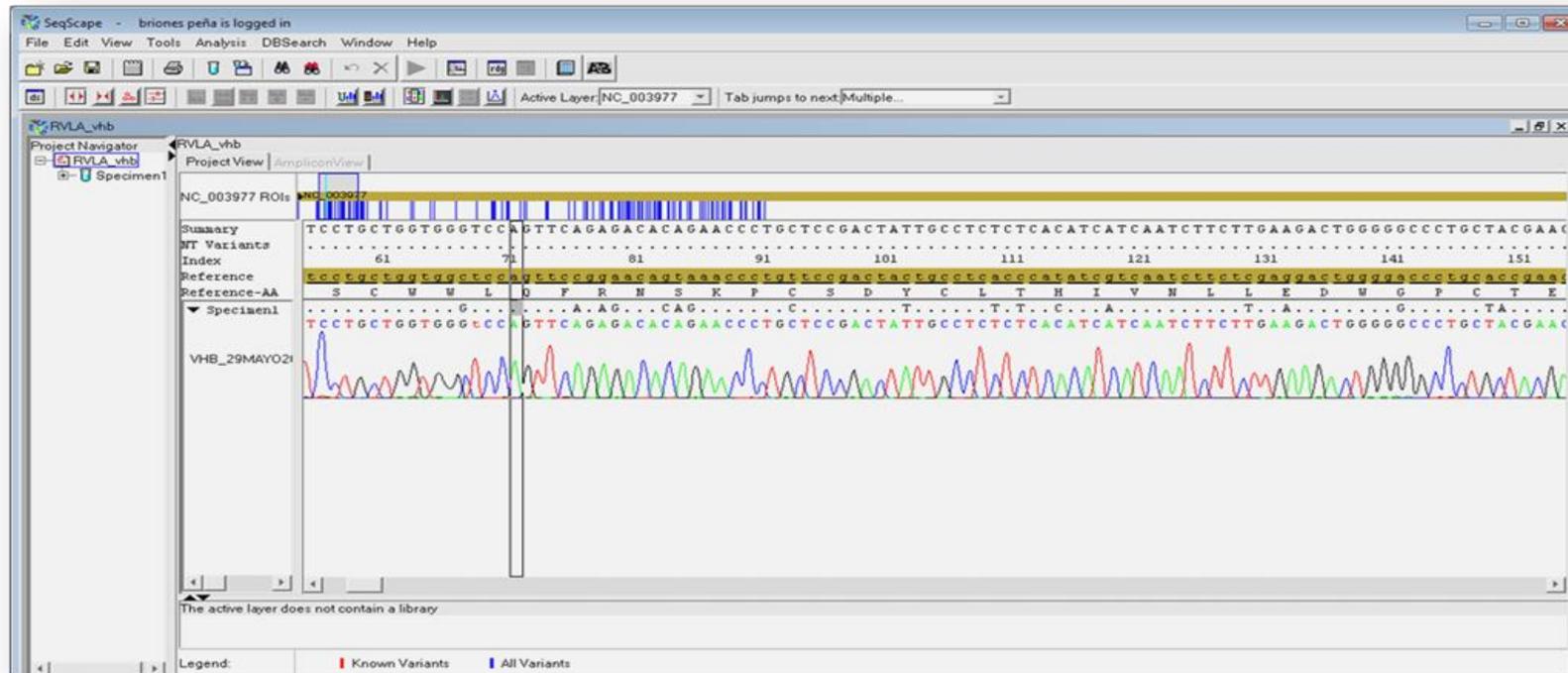


Figura 18. Ejemplo de un electroferograma de la muestra RVLA que muestra la secuencia de nucleótidos; los puntos negros indican los nucleótidos que son idénticos a la secuencia de referencia y las letras corresponden a los nucleótidos que difieren de la secuencia de referencia. Programa SeqScape v2.1.1

Análisis Filogenético

Secuencias obtenidas del *GenBank* para el análisis filogenético.

Genotipo	Número de acceso GenBank
Genotipo A	M57663, AB116092, AB076678, AB194951, X51970, AB014370, AY707087, X70185, 38488595, AJ012207
Genotipo B	D00331, M54923, EF473976, AB219426, DQ463792, AB073835, D23678, AJ131133, X98077
Genotipo C	EU410080, X75656, AF223955, AY123041, D50520, AB033553, D23684, AY123424, AF363963, X01587, AF241407
Genotipo D	AB070833, AB205126, X80925, AF151735, AY945307, M32138, X65258, AY233291, AY902776, U95551
Genotipo E	X75657, X75664, AP007262, JQ000009, JQ000008, AB106564, AB032431, AB091256, AB205192, HE974384
Genotipo F	X75658, HE974368, AB166850, AB214514, AB036915, AY090455, X69798, AY311369, AF223963
Genotipo G	AB375170, AB375168, AB375165, AF160501, AP007264, AB056513, GU565217
Genotipo H	AY090457, AB375163, AB298362, AB179747, EF157291, AP007261, AB516395, AY090460, AB375160

Cuadro 5. Secuencias de VHB extraídas del GenBank usadas para la construcción del árbol filogenético.

Se buscó en la página electrónica del *GenBank* del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para obtener las secuencias de los diferentes genotipos virales del VHB para la realización del análisis filogenético.

Árbol Filogenético

Con las secuencias FASTA del Genoma Completo de cada muestra amplificada de los pacientes mexicanos y las secuencias del GeneBank (cuadro 5), se construyó un árbol circular, usando el programa MEGA v5.1 (Fig. 19).

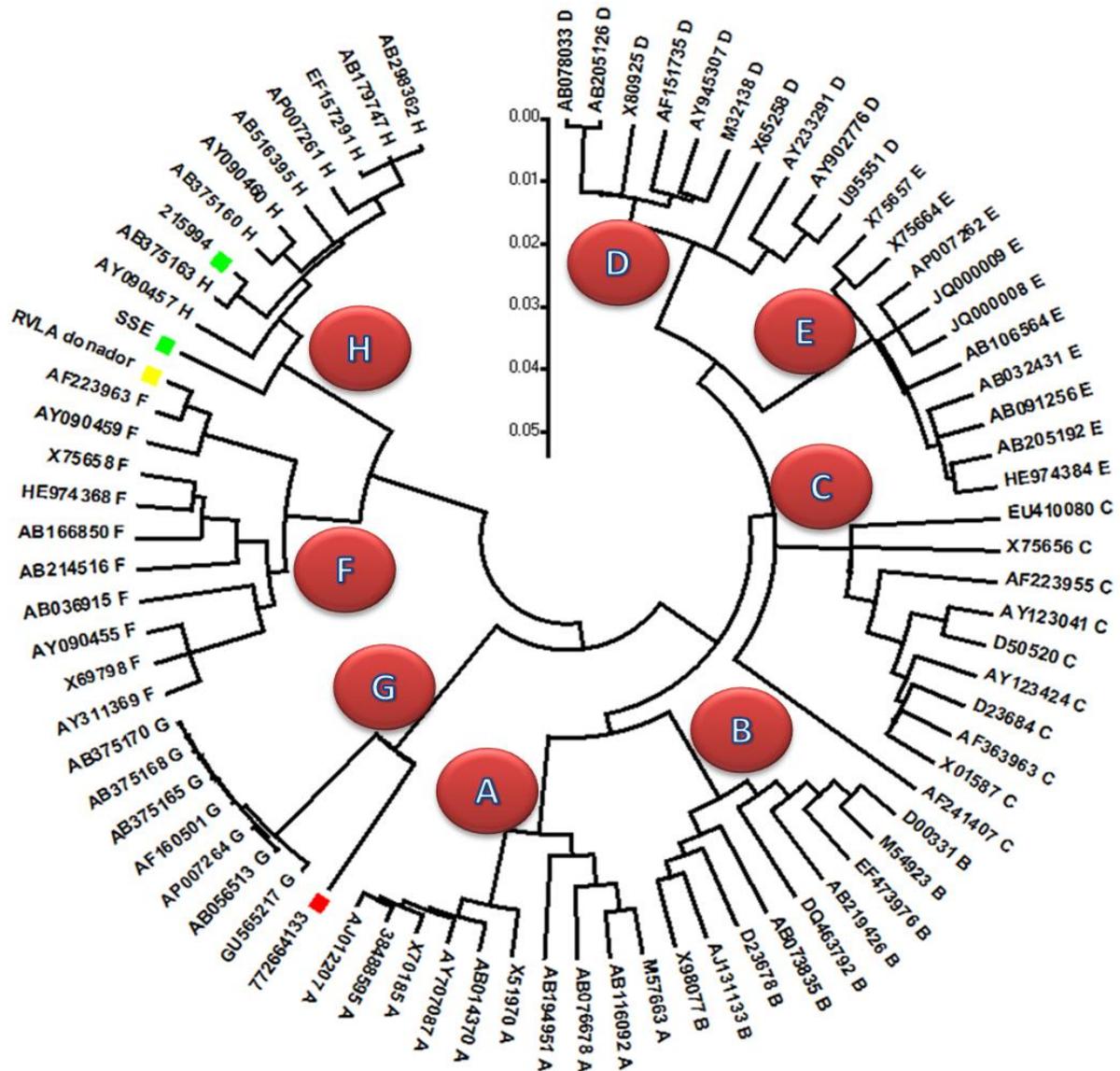


Figura 19. Árbol filogenético construido por el método de Neighbor-Joining, programa MEGA v5.1. Donde se observan los grupos de los genotipos virales (círculos rojos) y las diferentes muestras secuenciadas de pacientes Mexicanos (Rojo, Amarillo y Verde), agrupadas dentro de los genotipos virales homólogos.

Análisis con el programa Geno2pheno

Las secuencias consenso (secuencia FASTA de la región RT del gen de la polimerasa) se les sometió al algoritmo *geno2pheno* [<http://hbv.geno2pheno.org/index.php> v2.0] del Instituto Max Planck (Figura 20) con el fin de comprobar los resultados del genotipo y la resistencia a los ANs.

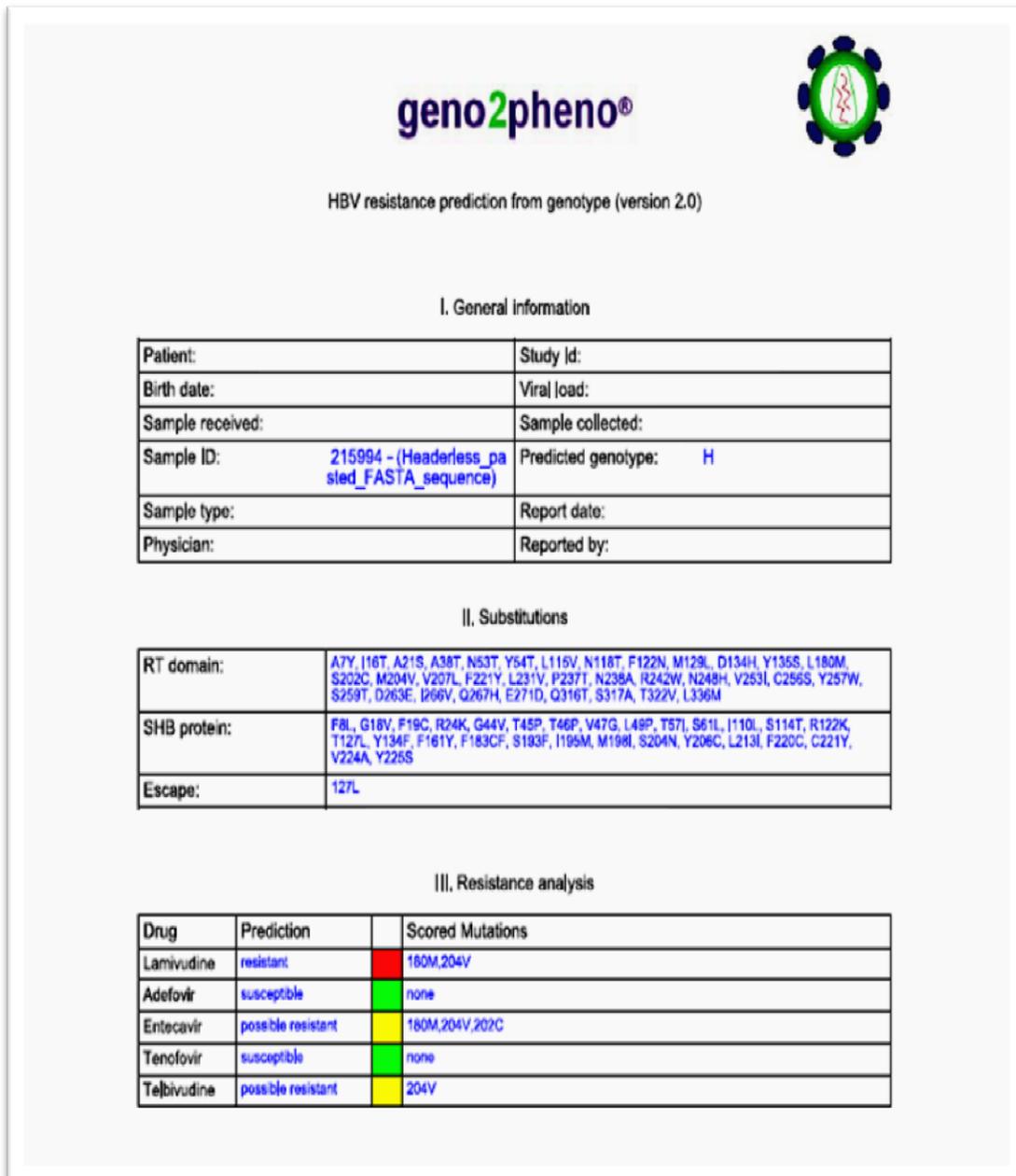


Figura 20. Ejemplo de reporte del algoritmo *geno2pheno* para la muestra 215994

Comparación de Genotipos con Análisis Filogenético y Geno2pheno.

Muestra	Genotipo según análisis filogenético	Genotipo según Geno2pheno
RVLA	F	F
77264133	G	G
215994	H	H
SSE	H	H

Cuadro 6. Genotipo encontrado en cada una de las muestras procesadas. En base a la agrupación filogenética y el algoritmo Geno2pheno.

Resistencia a los fármacos Análogos Nucleósidos (AN's)

Se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región RT del gen de la polimerasa de cada muestra con el uso del programa MEGA 5.1 para buscar las mutaciones asociadas a resistencia, los resultados se muestran en la *figura 21*.

Por lo tanto este método de secuenciación es útil para encontrar las mutaciones que confieren resistencia a los ANs (*cuadro 7*).

Muestra	Mutaciones asociadas a resistencia	Análogo Nucleótido/ Nucleósidos.
RVLA	ninguna	Sensible a todos los fármacos
77264133	N236T, M204L, M250V	Adefovir, Lamivudina, Telbivudina y Entecavir
215994	L180M, M204V, S202C	Lamivudina, Entecavir y Telbivudina
SSE	L180S, A181V, T184Q	Lamivudina, Adefovir y Entecavir

Cuadro 7. Mutaciones asociadas a resistencia a los ANs en las muestras procesadas.

Alineamiento de los aminoácidos de las Secuencias Mexicanas y los diferentes genotipos del VHB

	1							80
Seq_Ref_NC003977	EDWGPCTEHG	EHNIRIPRTP	ARVTGGVFLV	DKNPHNTTES	RLVVDFSQFS	RGSTHVSWPK	FAVPNLQSLT	NLLSSNLSWL
Seq_Genotipo AH.....A..R.....
Seq_Genotipo BR..T...A..D.R.....
Seq_Genotipo C
Seq_Genotipo DD.Y.	..H.....A..NYR.....
Seq_Genotipo E	K.H.....A..SR.....
Seq_Genotipo FY...	Q.H..T...N.R.....
Seq_Genotipo G	Q.....	..H.....A..AR.....
Seq_Genotipo HY...	..H..T...	S.....T.R.....
RVLA_donadorY...	Q.H..T...N.R.....
SSEY...	..H..T...	S.....T.R.....
215994Y...	..H..T...	S.....T.R.....
77264133	Q.....	..H.....A..AR.....
	81							160
Seq_Ref_NC003977	SLDVSAAFYH	IPLHPAAMPH	LLVGSSGLPR	YVARLSSTSR	NINYQHGTMO	NLHDSCSRNL	YVSLLLLYKT	FGRKLHLYSH
Seq_Genotipo AI.....S.N..	IN.N....L.E.	...M.....	Y.W.....
Seq_Genotipo B	L.....S.N..	I..H..R...	D.....	...M.....	Y.....
Seq_GenotipoCN..	..HNK.....	D.....H.
Seq_Genotipo DG...	L.....VS.N..	.N.N.Y....Q.	...M...QN	..W.....
Seq_Genotipo E	L.....S.N..	I..H.Y..LP	...G...	...M..F..	C.....P.
Seq_Genotipo F	L.....C..S.	IHDH.....	..N.....FQ.	L.....
Seq_GenotipoGS.D..	ILDH.Y..L.Q.	...M.....
Seq_Genotipo H	L.....S.	...V.....	IN.H....L.	..H?.....Q.
RVLA_donador	L.....S.HDH.....	..N.....FQ.	L.....
SSE	L.....S.	...V.....	IY.H....L.	..H.....Q.
215994	L.....S.	...V.....	IN.H....L.	..H.....Q.
77264133S.D..	ILDH.Y..L.Q.	...M.....



	161							240
Seq_Ref_NC003977	PIILGFRKIP	MGVGLSPFLL	AQFTSAICSV	VRRAFPCL	FSYMDDVVLG	AKSVQHLESL	FTSITNFLLS	LGIHLPNPKT
Seq_Genotipo A	S.....	Y.AV.....
Seq_Genotipo B	YAAV.....Q..
Seq_Genotipo CV.....H..
Seq_Genotipo D	..V.....AV.....
Seq_Genotipo E	..M.....	Y..V.....
Seq_Genotipo FL...	Y.AV.....	V.....TS..
Seq_Genotipo GL.....MV.....	Y.AV.....
Seq_Genotipo H	Y.AV.....	V.....TA..
RVLA_donadorL...	Y.AV.....	V.....TS..
SSE	FS V . Q . . SL...	Y.AV.....	V.....TA..
215994	M	?	C . V . L	Y.AV.....	V.....TA..
77264133	-	IV . L . L	Y.AV.....	?? . V? . . T?? . .

	241							320
Seq_Ref_NC003977	KRWGYSLNFM	GYVIGSWGTL	PQEHIVQKLG	QCFRKLQVNR	PIDWKVCQRI	VGLLGFAAPF	TQCGYPALMP	LYACIQSKQA
Seq_Genotipo AD....I.	H.....A...
Seq_Genotipo BS.I.
Seq_Genotipo CD..IL.I.L.....A...
Seq_Genotipo DH..CY.S.I..I.	E....V....F...
Seq_Genotipo EP....S.....K..I.	D.....T....AR.G.G...
Seq_Genotipo FT....S.....	..D.....	D.....TA...
Seq_Genotipo GT..I.	T.....A...
Seq_Genotipo H	.W....H..	..I.....H.I.	D.....TA...
RVLA_donadorT....S.....	..D.....	D.....TA...
SSE	.W....H..	..I.....H.I.	D.....TA...
215994	.W....H..	..I.....H.I.	D.....TA...
77264133	.W....?.V	???.	?.....H.?	D.....??A...

	321		344
Seq_Ref_NC003977	FTFSPTYKAF	LCKQYLNLYP	VARQ
Seq_Genotipo AS...M....
Seq_Genotipo BN...S....
Seq_Genotipo C
Seq_Genotipo D-
Seq_Genotipo EQ..M....
Seq_Genotipo F	.V.....	..Q..M....
Seq_Genotipo GM....
Seq_Genotipo H	.V.....M....
RVLA_donador	.V.....	..Q..M....
SSE	.V.....M....
215994	.V.....M....
77264133	.V.....M....	----

Figura 21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región RT de la polimerasa de las cuatro muestras y de los diferentes genotipos obtenidas del GenBank. El resaltado amarillo indica la región de resistencia y las letras en color rojo indica las mutaciones encontradas y que están asociadas a resistencia a los AN's. Se utilizó el programa MEGA v5.1, con el modelo de alineamiento PHYLIP

Código de acceso de las 4 muestras de pacientes Mexicanos del *GenBank*

Finalmente cada secuencia FASTA de las muestras se envió a la base de datos del *GenBank* quien les proporciono los siguientes códigos de acceso.

Muestra	Año de envío	Código de Acceso al GenBank
RVLA	2013	KF199901
77264133	2013	KF219922
215994	2013	KF356417
SSE	2013	<i>Pendiente</i>

Cuadro 8. Códigos de acceso de cada secuencia proporcionados por la base de datos del Genbank

VII. Discusión.

Para determinar si la muestra era candidata a la amplificación y secuenciación del genoma completo del VHB, se realizó como un primer paso, la determinación inmunoenzimática (ELISA) para antígeno de superficie del VHB, para saber si existe una infección activa con la presencia de partículas virales y para conocer la cantidad existente, se les realizó una Carga Viral (CV) con la técnica automatizada *Abbott Real-Time HVB*, medida en Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml); al obtener los resultados (*cuadro 3*) se apreció que la muestra RVLA fue la que tuvo la CV más alta, por lo que esta muestra se usó para determinar la sensibilidad de la PCR en términos de CV, es decir, establecer la CV mínima necesaria para poder amplificar un fragmento de ADN viral, lo cual se determinó a través de la realización de una curva de diluciones seriadas 1:10 (*cuadro 4*) a volúmenes finales de 200µL debido a que este es el volumen mínimo requerido para realizar una extracción de ADN con el estuche QIAGEN. Una vez que se hicieron las diluciones se realizó la extracción de ADN y posteriormente la PCR por duplicado (*Figura 14*) para comparar la variación entre resultados. Estos muestran que existe una amplificación a partir de una CV de 2×10^6 y hasta 2×10^8 UI/200µL, mientras que a una CV de 2×10^5 no se asegura la amplificación ya que en un ensayo la amplificación es muy pobre y en el otro es nula. Por lo tanto la sensibilidad de la PCR es de 2×10^6 UI/200µL.

VII.I Extracción del ADN con el estuche de QIAGEN

El método orgánico de fenol-cloroformo, que es el más utilizado, debido al alto rendimiento de ADN puro que se obtiene, es un método laborioso y puede ser peligroso; puesto que el fenol produce quemaduras por lo que es necesario manipularlo con extrema precaución. Este método genera así una mayor inversión de tiempo y recursos, por lo que se vuelve impráctico y es más frecuente que ocurra una contaminación cruzada además los residuos de fenol pueden inhibir la reacción de amplificación ⁽⁴²⁾, por lo anterior se eligió trabajar con un estuche

comercial de la marca *QIAGEN* ya que de acuerdo a Kramvis A. y col. ⁽⁴³⁾ en la extracción de ADN viral del VHB se obtuvo aproximadamente el doble de ADN que con el método de fenol-cloroformo, aun empleando más volumen de plasma (125µL en fenol-cloroformo y 200µL con *QIAGEN*), asimismo, es menos laborioso y rápido, obteniéndose ADN puro con un alto rendimiento y es más barato que los otros estuches comerciales como Nucleospin, Isoquick y Bio 101 ⁽⁴⁴⁾.

Al analizar la imagen de la *Figura 15* comprobamos que este método de extracción permitió obtener ADN sin degradación y con un rendimiento de 3.5ng/µL (cuantificado por espectrofotometría, datos no mostrados).

Para el diseño de la PCR se tomaron en cuenta todos los parámetros que involucran este método de acuerdo a Mullis KB. ⁽⁴⁵⁾ y para su optimización se siguieron las sugerencias de Grunenwald H. ⁽⁴⁶⁾ Los parámetros que se tienen que considerar son: calidad y concentración del template de ADN, el diseño y concentración de los primers, la concentración de iones de magnesio (Mg^{+2}), la concentración de los cuatro desoxinucleótidos (dNTP's), el sistema de solución tampón (amortiguador) para PCR, la concentración de la ADN polimerasa, las condiciones del termociclador y el uso de un calentamiento inicial.

VII.II Optimización de la PCR

La concentración del template de ADN para verificar la reproducibilidad que se podía amplificar fue de 3.5ng/ µL y hasta 35ng/10µL (*Fig. 15*), dado este resultado se decidió que para asegurar una amplificación, se utilizaran 7ng de template de ADN para los PCR posteriores. Para el diseño de primers fue necesario construir un mapa del genoma del VHB en forma lineal mostrado en la *Figura 13* de modo que nos permitió dividir el genoma en seis fragmentos con un promedio de 600 pares de bases cada uno.

Para la amplificación de dichos fragmentos se necesitaron dos primers por fragmento: uno con orientación de 5´ a 3´ (Forward) y el complemento que va de 3´ a 5´ (Reverse) cuyas secuencias se ubicaron con la ayuda del mapa de la figura . Se tomó en cuenta que cada primer tuviera un tamaño de entre 18 y 28 bases y que la Temperatura de alineamiento (Ta) entre ambos no rebasará los 5°C de diferencia para evitar su complementariedad (dimerización), las características de estos primers se revisaron utilizando un programa (software) disponible en internet (*FastPCR*), que fue utilizado para calcular la TA.

Las concentraciones de primers ideales que se requiere para una PCR tienen un rango de 0.5 a 100pmol ⁽⁴⁶⁾, se eligió 50pmol para un volumen de reacción de 50µL, en una proporción 1:1, para evitar la formación de dímeros de primers. Las concentraciones de los iones de magnesio (Mg⁺²) más usadas están entre 0.5 y 5mM ⁽⁴⁶⁾, por lo que se realizó una curva de concentración de iones magnesio con 1mM, 2mM y 3mM (dato no mostrado), con la cual se determinó que la concentración a usar es de 3mM ya que a esta concentración generó una amplificación con un buen rendimiento y no se generaron productos de PCR inespecíficos. Las concentraciones de dNTP´s utilizadas fueron de 20µM a 200µM ⁽⁴⁶⁾ y con base al inserto de la polimerasa *AmpliTaq*, la concentración de dNTP´s que se uso fue de 200µM para favorecer la extensión de la hebra. El amortiguador que se utilizó para mantener el pH durante la PCR, fue el proporcionado por el fabricante (Applied Biosystems) compuesto de Tris-HCl al 10mM y KCl al 50mM que generan un pH de 8.3-8.4 para evitar la desnaturalización ⁽⁴⁷⁾ de la Taq ADN polimerasa. En todas las PCR se usó la *AmpliTaq* debido a su alta procesividad (incorpora de 35 a 100 nucleótidos por segundo) y por ser termoestable (su tiempo de vida media es de 40 minutos a 95°C), característica importante para resistir la temperatura de desnaturalización del ADN (94°C), con una temperatura óptima de 72°C, que se utilizó para la extensión de la hebra. La concentración que se recomienda usar es de 1 a 2.5 unidades por 100µL ⁽⁴⁶⁾, con base en esto, se usaron 1.25 unidades por 50µL.

Las condiciones del termociclador incluyeron tanto la temperatura como el tiempo de los pasos de desnaturalización, alineamiento de los primers (T_a) y elongación de la hebra así como el número de ciclos. El intervalo de temperaturas de desnaturalización del ADN es de 90°C a 98°C con una duración de 10 segundos hasta 1 minuto⁽⁴⁶⁾. Por lo que se usó una temperatura de 94°C con un tiempo de 45 segundos, para asegurar una desnaturalización completa ya que se trata de un ADN circular sin afectar la Taq ADN polimerasa. La T_a para un PCR en particular depende de la composición, número de nucleótidos y concentración de los primers, por lo que se usó el programa *FastPCR*, el cual toma en cuenta todas estas características para calcular la T_a , con una duración de 30 segundos (sugerido es de 30 segundos a 1 minuto)⁽⁴⁶⁾. En el paso de elongación es importante conocer la procesividad de la enzima, para la Taq ADN polimerasa es de 60 nucleótidos por segundo a 70°C , por lo que la temperatura de extensión elegida fue de 72°C con una elongación de 3500 nucleótidos en un minuto aproximadamente, así que como regla general un 1 minuto de elongación por Kilobases es más que suficiente para generar el producto de PCR deseado⁽⁴⁶⁾, con base en esto, para este paso se usaron 72°C por 1 minuto; después se agregó un paso de elongación adicional de 72°C por 10 minutos para garantizar la elongación de todos los amplicones remanentes que no hayan tenido tiempo suficiente para elongarse. Finalmente, en todos los PCR se utilizaron 40 ciclos para alcanzar el efecto de meseta (cuando la amplificación deja de ser exponencial y se vuelve lineal), el cual se obtiene de 20 a 40 ciclos⁽⁴⁶⁾, no se usaron más de 40 ciclos para evitar la amplificación de productos de PCR inespecíficos.

Por último se anexó un calentamiento de 10 minutos a 94°C antes de que iniciará el paso de desnaturalización del primer ciclo, para desnaturalizar completamente el ADN genómico; el Master mix se agregó hasta que pasarán 5 min, ya que de esta forma se mantienen intactos todos los componentes del Master mix hasta que se alcance la T_a y además se pueden eliminar los productos inespecíficos.

Una vez optimizada la PCR, se usó la muestra RVLA con CV distintas, para verificar la reproducibilidad, cuyos resultados se observan en la *figura 16*, donde las muestras 77252439 y MRAM no amplificaron puesto que su CV es menor de 200×10^6 UI/200 μ L, por otro lado las muestras 77264133 y RVLA con una CV de 200×10^6 UI/200 μ L o mayor si amplificaron. Posteriormente para asegurar la amplificación de todo el genoma del VHB y con ayuda del mapa de la *Figura 13* se amplificaron con éxito los seis fragmentos tal y como se observa en la *Figura 17*. Se obtuvieron los mismos resultados para las muestras 77264133, 215954 y SSE. Por lo que se procedió a la secuenciación de cada uno de los amplicones con el método de Sanger (*Figura 18*), el cual se basa en el uso de dideoxynucleótidos (ddNTP's) que carecen del grupo -OH en el carbono 3 de la pentosa, necesario para la formación del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos causando que la ADN polimerasa cese la elongación de la hebra cuando el ddNTP se incorporó⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾. Estos ddNTP's están marcados con moléculas fluorescentes que se detectaron con un secuenciador automatizado a través de la electroforesis capilar la cual produce un electroferograma⁽⁵⁰⁾. Posteriormente se utilizó el software *SeqScape v2.0* para realizar la comparación de cada una de las secuencias consenso con la secuencia de referencia NC_003977 del VHB y modificar aquellas bases que no correspondían a las mostradas por el electroferograma así como las que el secuenciador no fue capaz de distinguir, en el caso de una mezcla de bases (Transversiones o Transiciones). De esta comparación se obtuvo la secuencia consenso final para cada muestra, obtenida como formato FASTA (Formato de texto) para realizar el análisis filogenético. Para realizar éste análisis, se buscaron secuencias de genomas completos del VHB de los ocho genotipos existentes en la base de datos del Genbank del NCBI y una vez encontradas se descargó el formato FASTA de cada una.

VII.III Filogenia

La Filogenia se utiliza para describir las relaciones evolutivas entre genes y organismos, las cuales se representan a través de árboles filogenéticos tal y como el que se observa en la *Figura 19*.

Este árbol filogenético se construyó con las secuencias consenso de los pacientes y las que se tomaron del GeneBank (ver material y método); con una forma circular, para el cual se usó el método estadístico *Neighbor-Joining* que utiliza las distancias génicas, las cuales se expresan como el número de nucleótidos que cambian a lo largo de una secuencia y a partir de estos datos este método detecta un par de secuencias que son más parecidas entre sí para iniciar la construcción del árbol filogenético, de modo que se forman dos grupos, ordena cada secuencia al grupo que le corresponde y aísla aquellas que no tienen semejanza a ningún grupo. En la *Figura 19* se muestra el árbol filogenético que se obtuvo del análisis de las secuencias obtenidas por el GeneBank y las que se secuenciaron de los pacientes Mexicanos. Se observan agrupaciones de los diferentes subtipos virales del VHB que existen en el mundo. En estas agrupaciones se encuentran las secuencias que son parecidas entre ellas, por lo que las secuencias de los pacientes mexicanos se agruparon según su homología (Cuadro 6). Este análisis predice que la secuencia de la muestra **RVLA** se encuentra agrupada en el genotipo F, el cual está relacionado con el desarrollo de CHC de acuerdo al estudio realizado en Alaska por Livingstone S. y col.⁽⁵¹⁾; siendo más susceptible al tratamiento con interferón- α que al tratamiento con análogos nucleótidos⁽⁵²⁾. Asimismo las muestras **SSE** y **215994** se agrupan al genotipo H del cual no se conocen las complicaciones clínicas y sólo se sabe que también es susceptible al tratamiento con interferón- α ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾, debido muy probablemente a la similitud con el genotipo F, por lo que son necesarios estudios de seguimiento para poder descubrir más particularidades acerca de este genotipo.

La muestra **77264133** se agrupa con las secuencias del genotipo G, cuyo clúster se encuentra muy cercano al agrupamiento del Genotipo A, el cual se ha encontrado más frecuentemente en individuos co-infectados con otros genotipos comúnmente con el genotipo A incluso en individuos co-infectados con el VIH quienes además presentaban fibrosis hepática, por lo que se considera que este genotipo es el causante de la fibrosis hepática en esos individuos y por lo tanto conduce a una progresión más rápida de la enfermedad hepática ⁽⁵³⁾. Cabe mencionar que en particular este paciente presenta co-infección con el VIH, pues también se le realizó una carga viral de VIH teniendo un valor de 205, 891 cop/mL, por lo que sí existe una correlación del genotipo G del VHB con la infección del VIH como factor de riesgo en el desarrollo más rápido de fibrosis hepática.

Para contrastar los resultados de genotipo y resistencia a los ANs se usó el algoritmo *geno2pheno* disponible en internet, del Instituto Max Planck, el cual requiere de la región RT del gen de la polimerasa para poder hacer la interpretación como la que se muestra en la *Figura 20*. Este análisis generó un resultado cuya información es el Genotipo predicho, otro con las sustituciones de aminoácidos y el análisis de resistencia a los cinco fármacos antivirales disponibles indicando si la muestra es susceptible, posible resistente o resistente a dichos fármacos (ver anexo 2). Por lo que se elaboró el cuadro 6 para comparar tanto los resultados del análisis filogenético como los del *geno2pheno*, que demostró que ambos métodos de análisis generaron el mismo resultado, por lo que se puede usar cualquiera de los dos métodos.

VII.IV Mutaciones Relacionadas a Resistencia

Para encontrar las mutaciones asociadas a resistencia a los ANs se analizó la secuencia de aminoácidos de la región RT de la polimerasa de cada una de las muestras representadas en el alineamiento de los aa de la secuencia completa de la RT (*Figura 21*), de tal forma que se buscaron específicamente las mutaciones

ya descritas en la bibliografía y las cuales se resumen en el *cuadro 7* en donde se encontró que la muestra **RVLA** no presentó ninguna mutación por lo que ese paciente puede tomar cualquiera de los cinco ANs disponibles. La muestra **77264133** presentó la mutación N236T que le confiere resistencia a Adefovir y la M204L que es una mutación no reportada, podría ser importante en estudios posteriores de correlación con las características clínicas y de laboratorio de los pacientes que la tienen, para determinar si es o no una mutación relacionada con resistencia a los fármacos. Tanto la mutación N236T como la M250V confieren resistencia a Entecavir por lo que este paciente sólo tiene como opción el Tenofovir. En la muestra **215994** se encontró la mutación L180M la cual es responsable de conferir resistencia a Lamivudina y Telbivudina, al igual que la muestra anterior también presenta resistencia a Entecavir ya que además de esta mutación tiene las M204V y S202C, por lo que este paciente cuenta con Adefovir y Tenofovir como tratamientos antivirales opcionales. En la muestra **SSE** se encontró la mutación A181V responsable de la resistencia a Lamivudina y Adefovir, mientras que las mutaciones L180S y T184Q le podrían conferir resistencia Entecavir por lo que este paciente puede usar Telbivudina y Tenofovir. Al revisar el *cuadro 7* se observa que las tres muestras que presentan resistencia, ésta, la presentan para Lamivudina y Entecavir; por otro lo que el tratamiento antiviral alternativo para estos pacientes es el Tenofovir.

Finalmente las secuencias de las cuatro muestras se enviaron a la base de datos del Genbank del NCBI para que queden disponibles a nivel mundial para quien las requiera, cuyos códigos de acceso están indicados en el *cuadro 8*.

VIII. Conclusiones.

- 1°. Se logró la amplificación y secuenciación del genoma completo del VHB y se detectaron los genotipos F, G y H.
- 2°. Se estandarizó la PCR para la amplificación del genoma completo del VHB, en un volumen final de 50µL: como template se debe usar 7ng de ADN, 5 µL de amortiguador 10x, 6µL de MgCl₂ [25mM], 1µL de dNTP's[10mM], 1µL de primers [50pM], 0.25µL de Taq Gold [250U] y 32.75µL de H₂O MilliQ.
- 3°. Se determinó la sensibilidad de la PCR, en términos de la CV, la cual es de 2x10⁶ UI/200µL y se demostró que es reproducible.
- 4°. Se secuenció exitosamente todo el genoma del VHB con la técnica de Sanger.
- 5°. Se construyó un árbol filogenético con las muestras de los pacientes, encontrándose el genotipo F en la muestra RVLA, genotipo G para la muestra 77264133 y genotipo H para las muestras 215944 y SSE.
- 6°. Se encontraron mutaciones asociadas a resistencia, las más frecuentes fueron Lamivudina y Telbivudina y sólo una muestra fue susceptible a todos los fármacos.
- 7°. Se logró el envío de las secuencias al Genbank, el cual proporciono los siguientes códigos de acceso **KF199901, KF219922 y KF356417**
- 8°. El indispensable conocer la CV del VHB de cada muestra para saber si se puede amplificar o no.
- 9°. La amplificación y secuenciación del genoma completo del VHB se debe hacer en fragmentos ya que así se garantiza la cobertura de todo el genoma.
- 10°. Las secuencias obtenidas de estos pacientes Mexicanos, no se han descrito en nuestro país, por lo que las secuencias enviadas son las primeras determinadas en México.
- 11°. El árbol filogenético es una herramienta muy importante puesto que permitió la determinación de los genotipos.

12º. Geno2pheno es una herramienta excelente para determinar el genotipo y la resistencia a AN's ya que su interpretación correlaciona tanto con el árbol filogenético como con el alineamiento de la secuencia de aminoácidos para encontrar las mutaciones asociadas a resistencia.

IX. Propuestas.

En perspectiva se espera que este método se utilice como prueba de rutina en México para proporcionar mejores herramientas que ayuden a los médicos en el manejo y tratamiento de sus pacientes. Además puede utilizarse para determinar el o los genotipos prevaecientes así como establecer el patrón de resistencia y así conocer más acerca de la epidemiología molecular del VHB en México, que es necesaria para la identificación de los factores de riesgos genéticos y ambientales.

X. Anexos

X.I Anexo 1 Carga Viral (Estuche Abbott RealTime HBV)



REF 2N40
51-608234/R1

For a detailed description of how to operate the Abbott m2000sp instrument and Abbott m2000rt instrument, refer to the Abbott m2000sp and m2000rt Operations Manuals, Operating Instructions section.

Laboratory personnel must be trained to operate the Abbott m2000sp and m2000rt instruments. The operator must have a thorough knowledge of the applications run on the instruments and must follow good laboratory practices.

- A maximum of 48 samples can be processed in each run. A negative control, a low positive control, and a high positive control must be included in each run, therefore allowing a maximum of 45 specimens to be processed per run.

NOTE: If performing a run of more than 24 samples, empty the solid waste container before the run and replace with a new biohazard bag if any waste is present.

 - Check sample volume. The Abbott RealTime HBV assay minimum sample volume and associated rack requirements on the Abbott m2000sp are:

Abbott RealTime HBV Minimum Sample Volume Assay Application			
Rack	Tube Diameter*	0.2 mL	0.5 mL
13 mm	11.5 mm - 14.0 mm	0.4 mL - 0.8 mL	0.7 mL - 1.2 mL
16 mm	14.5 mm - 16.0 mm	0.4 mL - 1.0 mL	0.8 mL - 1.4 mL

* Refers to the sample tube outer diameter.

 - Minimum sample volume varies with tube geometry and size. Refer to the m2000sp Operations Manual and QUICK REFERENCE GUIDE FOR SAMPLE TUBE SIZES AND VOLUMES for recommended sample input volume.
 - If frozen, thaw specimens at 15 to 30°C or at 2 to 8°C. Once thawed, if specimens are not being processed immediately, store at 2 to 8°C for up to 6 hours.
 - Before use, vortex specimens three times for 2 to 3 seconds. Ensure that bubbles or foam are not created. If found, remove them with a new sterile pipette tip for each tube. Specimens showing particulate matter or turbidity should be clarified by centrifugation at 2,600g for 5 minutes prior to testing. Aliquot each specimen into clean tubes or vials if necessary. Refer to the Abbott m2000sp Operations Manual for tube sizes. Avoid touching the inside of the cap when opening tubes.
- Thaw assay controls and Internal Control (IC) at 15 to 30°C or at 2 to 8°C. Thaw calibrators at 15 to 30°C or at 2 to 8°C only if performing a calibration run; see **QUALITY CONTROL PROCEDURES** section of this package insert.
 - Once thawed, if calibrators, controls, and IC are not being processed immediately, store at 2 to 8°C for up to 24 hours.
 - Vortex each assay calibrator and each control three times for 2 to 3 seconds before use. Ensure that bubbles or foaming are not created. If found, remove them with a new sterile pipette tip for each tube. Ensure that the contents of the vials are at the bottom after vortexing by tapping the vials on the bench to bring liquid to the bottom of the vials.
- Thaw amplification reagents at 15 to 30°C or at 2 to 8°C until required for the amplification master mix procedure. This step can be initiated before completion of the sample preparation procedure.

Note: Do not vortex the Amplification Reagent Pack.

 - Once thawed, the amplification reagents can be stored at 2 to 8°C for up to 24 hours if not used immediately.
- Open the Abbott Proteinase K reagent pack. Add 17.15 mL of Molecular Biology Grade water to a 50 mL polypropylene centrifuge tube. Pipet 2.45 mL of Proteinase K into the container of water. Mix by gentle inversion 10 to 15 times. Transfer the entire contents to a reagent vessel labeled with the Proteinase K barcode label. Place the reagent vessel in reagent carrier #1 location 2.

NOTE: The following steps 5 through 9 pertain to the use of the mSample Preparation System_{sp} kit (List No. 06K12-24).

NOTE: Use one bottle of Proteinase K solution, one set of the mSample Preparation System_{sp} reagents, one vial of IC, and one RealTime HBV Amplification Reagent Pack to support up to 24 reactions. Use a second set of reagents to support 25 to 48 reactions, with the exception of the mMicroparticles_{sp}. One bottle of mMicroparticles_{sp} will support up to 48 reactions. Do not use more than one bottle of mMicroparticles_{sp}.
- Open the Abbott mSample Preparation pack. If crystals are observed in any of the reagent bottles upon opening, allow the reagents to equilibrate at room temperature until the crystals disappear. Do not use the reagents until the crystals have dissolved.
- Prepare the mWash_{sp} by adding 70 mL of USP Grade 190-200 Proof Ethanol (95-100% Ethanol) to the mWash_{sp} bottle as described in the Abbott mSample Preparation System_{sp} product information. Do not use ethanol that contains denaturants.
- Vortex the IC vial(s) three times for 2 to 3 seconds before use.
- Using a calibrated precision PIPETTE DEDICATED FOR INTERNAL CONTROL USE ONLY, add 100 µL of IC to a bottle of mTysis Buffer. Mix by gently inverting the container 5 to 10 times to minimize foaming.
- Gently invert the Abbott mSample Preparation bottles to ensure a homogeneous solution and pour the contents into the appropriate reagent vessels per the Abbott m2000sp Operations Manual, Operating Instructions.
- Place the low and high positive controls, the negative control, the calibrators (if applicable), and the patient specimens into the m2000sp sample rack.
 - Place the 5 mL Reaction Vessels into the m2000sp 1 mL subsystem carrier.
 - Load the carrier racks containing the Abbott mSample Preparation reagents and Proteinase K, and the Abbott 96-Deep Well Plate, on the Abbott m2000sp worktable as described in the Abbott m2000sp Operations Manual, Operating Instructions.
 - From the Run Sample Extraction screen, select the appropriate application file corresponding to the sample volume being tested. Initiate the sample extraction protocol as described in the m2000sp Operations Manual, Operating Instructions.
 - Enter calibrator (needed if a calibration curve has not been stored on the m2000rt) and control lot specific values in the Sample Extraction: Assay Details screen. Lot specific values are specified in each Abbott RealTime HBV Calibrator and Control Kit card.

NOTE: Verify the values entered match the values on the kit cards.

 - The Abbott m2000sp Master Mix Addition protocol (step 14) must be initiated within 60 minutes after completion of the Sample Extraction protocol.

NOTE: Change gloves before handling the amplification reagents.
 - Load the amplification reagents, the master mix vial, and the 96-well Optical Reaction Plate on the m2000sp worktable after sample preparation is completed.
 - Each Amplification Reagent Pack supports up to 24 reactions.
 - Ensure the amplification reagents are thoroughly thawed before use.
 - Prior to opening the amplification reagents, ensure that the contents are at the bottom of the vials by tapping the vials in an upright position on the bench.
 - Remove and discard the amplification vial caps.
 - A second Amplification Reagent Pack is required if performing 25 to 48 reactions.
 - Select the appropriate deep well plate from the Run Master Mix Addition screen that matches the corresponding sample preparation extraction. Initiate the Abbott m2000sp Master Mix Addition protocol. Follow the instructions as described in the Abbott m2000sp Operations Manual, Operating Instructions section.
 - The m2000rt protocol (step 20) must be started within 60 minutes of the completion of the Master Mix Addition protocol (step 15).

Amplification Area

- Switch on and initialize the Abbott m2000rt in the Amplification Area.
 - The Abbott m2000rt requires 15 minutes to warm up.

NOTE: Remove gloves before returning to the Sample Preparation Area.

Sample Preparation Area

- Seal the Abbott 96-Well Optical Reaction Plate after the Abbott m2000sp instrument has completed addition of samples and master mix according to the Abbott m2000sp Operations Manual, Operating Instructions section.

NOTE: Since a maximum of 48 samples can be processed in each run, the 96-Well Optical Reaction Plate will contain empty wells.
- Place the 96-Well Optical Reaction Plate into the Splash-Free Support Base for transfer to the Abbott m2000rt instrument.
- Export the completed 96-Well Optical Reaction Plate results to a CD or Network Drive.

Amplification Area

- Place the Abbott 96-Well Optical Reaction Plate in the Abbott m2000rt instrument. Import the m2000sp test order via CD or Network Drive per the Import Order instructions in the Abbott m2000rt Operations Manual, Operating Instructions section.

POST PROCESSING PROCEDURES

- Remove the Abbott 96-Deep Well Plate from the worktable and dispose according to the Abbott m2000sp Operations Manual.
- Place the Abbott 96-Well Optical Reaction Plate in a sealable plastic bag and dispose according to the Abbott m2000rt Operations Manual, along with the gloves used to handle the plate.
- Clean the Splash Free Support Base before next use, according to the Abbott m2000rt Operations Manual.

QUALITY CONTROL PROCEDURES

Abbott m2000rt Optical Calibration

Refer to the Calibration Procedures section in the Abbott m2000rt Operations Manual for a detailed description of how to perform an Abbott m2000rt Optical Calibration. Optical calibration of the Abbott m2000rt instrument is required for the accurate measurement and discrimination of dye fluorescence during the Abbott RealTime HBV assay.

The following Abbott m2000rt Optical Calibration Plates are used to calibrate the Abbott m2000rt instrument for the Abbott RealTime HBV assay:

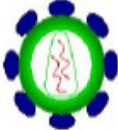
- FAM[®] Plate (Carbonylfluorescein)
- ROCK[™] Plate (Carboxy-X-rhodamine)
- VIC[®] Plate (Proprietary dye)

Assay Calibration

A calibration curve is required to quantitate HBV DNA in the specimens and controls. Two assay calibrators are run in replicates of three to generate a calibration curve (HBV concentration [log IU/mL] versus the threshold cycle [C_T] at which a reactive level of fluorescent signal is detected). The lot specific values for Calibrator A and Calibrator B are specified on each Abbott RealTime HBV Calibrator Kit Card and must be entered into the assay test order when a run is performed. The calibration curve slope and intercept are calculated and stored on the instrument. The concentration of HBV DNA in a sample is calculated from the calibration curve. Results are automatically reported on the m2000rt workstation.

X.II Anexo 2 Resultados predichos por Geno2pheno

Muestra RVLA.

HBV resistance prediction from genotype (version 2.0)

I. General information

Patient:	Study id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample ID: RVLA - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)	Predicted genotype: F (F1)
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

II. Substitutions

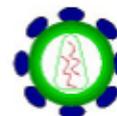
RT domain:	E11Q, T53N, I121N, N123D, N246T, H248N, T259S, H267Q, I266L, T313A, K333Q
SHB protein:	L45T, S113T, A168V
Escape:	

III. Resistance analysis

Drug	Prediction		Scored Mutations
Lamivudine	susceptible		none
Adefovir	susceptible		none
Entecavir	susceptible		none
Tenofovir	susceptible		none
Telbivudine	susceptible		none

Muestra 77264133.

geno2pheno®



HBV resistance prediction from genotype (version 2.0)

I. General information

Patient:	Study id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample ID: 77264133 - 77264133_I	Predicted genotype: G
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

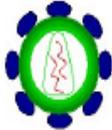
II. Substitutions

RT domain:	V190H, V191*, R192P, R193L, A194*, F195R, P196I, H197W, C198S, L199Y, A200C, F201G, S202V, Y203T, M204L, D205IV, D206F, V207A, V208F, L209*, G210L, A211L, K212P, Q215R, H216D, E218L, S219D, L220T, Y221A, T222S, V224FL, T225Y, N226R, F227DE, L228PS, S230E, L231S, G232PS, I233DE, L235C, N236ST, N238HN, K239H, K241A, R242L, W243R, G244HQ, Y245A, S246I, N248C, F249W, M250G, G251E, Y252L, V253M, I254T, G255L, S256A, W257ST, G258W, T259V, L260G, P261N, Q262N, E263L, H264E, I265D, T266P, Q267A, K268PS, I269R, K270D, Q271L, C272V, F273V, R274N, K275Y, L276V, P277N, V278T, R280M, P281G, I282L, D283K, W284I, K285R, V286Q, C287L, Q288L, R289W, I290F, T291H, G292I, L293S, L294C, G295L, F296T, A297F, A298G, P299R, F300E, Q302V, C303L, G304E, P306L, A307V, L308S, M309F, P310G, L311V, Y312W, A313I, C314R, I315T, Q316P, A317P, K318A, Q319Y, A320R, F321P, T322P, F323N, S324A, T326I, Y327L, K328S, A329T, F330L, L331P, C332E, K333T, Q334T, Y335V, M336V, N337R, L338R, Y339R, P340G, V341R, A342S, R343P, Q344F
SHB protein:	Q181H, W182I, F183D, V184P, G185Y, L186K, S187E, P188F, T189G, V190A, W191T, L192V, S193E, A194L, I195L, W196S, M197F, M198L, W199P, Y200S, W201D, G202F, P203F, N204R, Y206F, N207V, L209FY, P211T, F212P, I213L, P214Q, L216CS, P217T, I218EG, F219IN, F220P, C221*, L222NS, W223HP, V224LP, Y225IN, *227AV
Escape:	

III. Resistance analysis

Drug	Prediction	Scored Mutations
Lamivudine	possible resistant	204L
Adefovir	resistant	233D,233E,236T,236S
Entecavir	possible resistant	202V,250G,204L
Tenofovir	susceptible	none
Telbivudine	possible resistant	204L

Muestra SSE.

HBV resistance prediction from genotype (version 2.0)

I. General information

Patient:	Study id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample ID: SSE - (Headerless_paste d_FASTA_sequence)	Predicted genotype: H
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

II. Substitutions

RT domain:	Y122NY, L175V, L179C, L180S, A181V, Q182H, F183H, T184Q, S185C, C188S, Q267H
SHB protein:	S171A, W172R, L173F, S174I, L175T, L176S, V180P
Escape:	

III. Resistance analysis

Drug	Prediction	Scored Mutations
Lamivudine	possible resistant	180S,181V
Adefovir	resistant	181V
Entecavir	possible resistant	184Q,180S
Tenofovir	susceptible	none
Telbivudine	susceptible	none

XI. Glosario

Amplicón: Secuencia específica de nucleótidos producto del proceso de amplificación *in vitro* (PCR) obtenida a partir de una gran molécula de ácido nucleico (54).

Anticuerpo: Proteína producida por las células plasmáticas capaz de reaccionar con los antígenos (55).

Antígeno: Molécula aislada o presente en microorganismos o células capaz de inducir una respuesta inmune (55).

Bootstrap: Método habitual para asignar límites de confianza a diferentes puntos de ramificación dentro de un árbol filogenético (56).

Cápside: Cubierta proteica formada por capsómeros que recubren al nucleóide (57).

Carcinoma Hepatocelular (CHC): Es la neoplasia maligna primaria de hígado. (58)

dNTP's: Desoxinucleótidos trifosfatados, son nucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) biosintetizados con tres moléculas de fosfato en la posición 5' de la pentosa que se agregan en cantidades equimolares a la mezcla de PCR para que la polimerasa los use como sustrato y se lleve a cabo la amplificación del ADN (59).

Envoltura: Bicapa lipídica que recubre la nucleocápside (57).

Especificidad: Es la capacidad que tiene una prueba para identificar a los sujetos no enfermos (60).

FASTA: Es un formato basado en texto para la representación de secuencias de nucleótidos o aminoácidos mediante códigos de una sola letra (61).

Fibrosis hepática: Consiste en el depósito progresivo de colágeno y otras proteínas de matriz extracelular en el hígado (62).

Gen: Secuencia de ADN que se transcribe en ARN mensajero, el cual codifica para una proteína específica (63).

Genoma: Es el conjunto de todos los genes que contienen la información genética de un organismo (56).

Genotipo viral: Variabilidad genética de la secuencia de nucleótidos del ADN del virus (64).

Hepatocito: Son célula(s) poliédricas con 1 ó 2 núcleos propias del hígado y constituyen su parénquima (65) .

Hospedero: Organismo que alberga o aloja a otro organismo ya sea en su interior o sobre él (66).

Motif: Secuencia conservada de aminoácidos que le da a una proteína una función bioquímica específica(67).

Mutación: Es un cambio en la secuencia de nucleótidos de una región corta de un genoma (56).

Mutación puntual: Cambio de un solo nucleótido por otro (56).

Nucleoide: Llamado comúnmente genoma, es la parte central del virus en donde se contiene el ácido nucleico ya sea ADN o ARN (57).

Nucleocápside: Conjunto formado por el nucleoide y la cápside (57).

ORF: Marco de lectura abierto del inglés *Open Reading Frame*; porción de un genoma que contiene una secuencia de bases que pueden codificar una proteína. (56)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa del inglés *Polymerase Chain Reaction*. Método inventado por K. Mullis para la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN (45).

Primer u oligonucleótido: Secuencia corta de ADN (de 18 a 28 nucleótidos) diseñada específicamente para hibridar a una región complementaria del templete de ADN, para la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN (59).

Proteína: Macromolécula compleja constituida por una secuencia de aminoácidos unidos entre sí covalentemente por enlaces peptídicos. Se sintetiza por una secuencia de tripletes consecutivos de nucleótidos de la molécula de ARN, que a su vez, es complementario a la secuencia nucleotídica del ADN (68).

Proteosoma: Es un complejo formado por varias subunidades proteicas que se ensamblan y forman una columna cilíndrica en donde se lleva a cabo la degradación de las proteínas (69).

Receptor: Proteínas que se encuentran en la membrana celular que actúan como sitio de unión de los antígenos para su reconocimiento (70).

RFLP: Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*; son variaciones en las bases nitrogenadas del ADN de un sitio reconocido y cortado por una enzima de restricción (56).

Sensibilidad: Es la capacidad de una prueba para detectar a un sujeto enfermo (60).

Transición: Cambios purina-purina (A→G o G→A) o pirimida-pirimidina (C→T ó T→C) (56).

Transversión: Cambios de purina-pirimidina (A→C, A→T ó G→C, G→T) ó pirimidina-purina (C→A, C→G o T→A, T→G). (56)

Virión: Progenie de partículas de virus sintetizadas de novo dentro de la célula del hospedero que funcionan como vehículo de transmisión del genoma viral al resto de las células del hospedero (57).

Virus: Parásito infeccioso intracelular obligado, está formado por un nucleoide que contiene un solo tipo de ácido nucleico ya sea ADN o ARN, por la cápside, la nucleocápside y envoltura (57).

XII. Bibliografía.

1. Ganem D, Prince MA. Hepatitis B virus infection-Natural history and clinical consequences. *N England J Med.* 2004; 350 (11): 1118-29.
2. Hwang WE, Cheung R. Global epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. *N A J Med Sci.* 2011; 4 (1): 7-13.
3. Tiollais P. The hepatitis B virus. *Nature.* 1985; 317 (6037): 489-95.
4. Lee WM. Hepatitis B virus-infection. *N England J Med.* 1997; 337 (24): 1733-45.
5. Hamatake R. Hepatitis B virus. Vol. 1.1^a ed. United States of America: Humana Press; 2004.
6. Sánchez Orozco LV, Panduro Cerda A. Genómica y proteómica del virus de la hepatitis B. *Investigación en salud [Internet].* 2005. [Citado 24 abril 2011]; VII12-18. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14220648005>.
7. Tachiquín R. et al. Molecular analysis of hepatitis B virus "a" determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers. *Virology.* 2007; 4(6): 1-7.
8. Sánchez L. et al. Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains. 2002; 68(1): 24-32.
9. Beck J. and Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(1). 48-64.
10. Margall N. Biología molecular del virus de la hepatitis B. En: Balanzó J. *Hepatitis B.* 1^a ed. Barcelona: Marge books; 2007. 34-50.
11. Arauz P. et al. Genotype H: a new Ameridian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002; 83(8): 2059-73.
12. Alvarado C. et al. Molecular analysis of hepatitis B virus isolates of Mexico: Predominant circulation of hepatitis B virus genotype H. *Gastroenterol.* 2006; 12(40): 6540-45.
13. Kay A. Hepatitis B genetic variability and evolution. *Virus Res.* 2007; 127(2): 164-176.
14. Niesters H. Detection of hepatitis B virus genotypes and mutants: current status. *J Clin Virol.* 2005; 34 Supl 1: S4-8.

15. Shepard C. Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination. *Epidemiol Rev.* 2006; 28(1): 112-25.
16. Bartholomeusz A. and Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparasion of genotyping methods. *Rev Med Virol.* 2004; 14(1): 3-16.
17. Stuyver L. et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* 2000; 81(1):67-74.
18. Lin CL. and Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26 Supl 1: 123-30.
19. Tanwar S. Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis?. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012; 14(1):37-46.
20. Fung J, Ching-Lung, Seto W, Yuen Man-Fung. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(12): 2715-25.
21. Yuen MF, Lai CL. Treatment of chronic hepatitis B: Evolution over two decades. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26 Supl 1: 138-43.
22. Lai CL. et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med.* 1998; 339(2): 61-8.
23. Thomas H, Foster G, Platis D. Mechanisms of action of interferon and nucleoside analogues. *J Hepatol.* 2003; 39 Suppl 1: S93-98.
24. Tratamiento con interferón en las hepatitis crónicas. *Med Clin (Barc).* 1994; 103(13): 498-504.
25. Shaw T. et al. HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol.* 2006; 44(3): 593-606.
26. Locarnini S. Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis. *J Hepatol.* 2003; 39 Suppl 1: S124-32.
27. Lapinski TW, Pogorzelska J, Flisiak R. HBV mutations and their clinical significance. *Adv Med Sci.* 2012; 57 (1): 18-22.
28. Lai CL. et al. Telbivudine versus Lamivudine in Patients with Chronic Hepatitis B. *N Engl J Med.* 2007; 357(25): 2576-88.
29. Baseem S. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *Int J Infect Dis.* 2010; 14(11): e941-53.

30. Guettouche T, Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis B and viral genotype: the clinical significance of determining HBV genotypes. *Antivir Ther.* 2005; 10(5): 593-604.
31. Raimondi S, Maisonneuve P, Bruno S, Mondelli M. Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype?. *J Hepatol.* 2010. 52(3): 441-49.
32. Roman S. et al. Occult hepatitis B in the genotype H-infected Nahuas and Huichol native Mexican population. *J Med Virol.* 2010; 82(9): 1527-36.
33. Sánchez LV, Tanaka Y, Maldonado M, Mizokami M, Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of Mexican patients with different risk factors. *Intervirology.* 2007; 50(1): 9-15.
34. Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res.* 2007; 127(2): 177-84.
35. Vandamme Anne-Mieke. Basic concepts of molecular evolution. En: Salemi Marco. *The phylogenetic handbook.* UK, Cambridge: Cambridge University Press; 2003. 14.
36. Hall Barry G. *Phylogenetic Trees Made Easy.* 2nd. Sunderland, U.S.A.: Sinauer Associates; 2005.
37. Baxevanis A.D. and Francis B.F. *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins.* 2nd. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
38. Gregory TR. Understanding Evolutionary Trees. *Evo Edu Outreach.* 2008; 1(2): 121-137.
39. Valdespino J. Prevalencia en México de la infección y el estado de portador de la hepatitis B en adultos. *Salud Pública Mex.* 2007; 49 Supl 3: S404-11.
40. Kalendar R, Lee D, Schulman AH. Java web tools for PCR in silico PCR and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics.* 2011; 98(2):137-44.
41. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28(10): 2731-39.

42. Ashabil Aygan. Nucleic Acid Extraction from Clinical Specimens for PCR Applications. *Turk J Biol.* 2006; 30(2): 107-120.
43. Kramvis A, Bukofzer S, Kew M. Comparison of Hepatitis B Virus DNA extractions from serum by the QIAamp Blood Kit, GeneReleaser, and the Phenol-Chloroform Method. *J Clin Micro.* 1996; 34(11): 2731-33.
- 44., DeSalle Rob. et al. DNA Isolation Procedures. En: DeSalle Giribet G., Wheeler W. R. *Techniques in molecular systematics and evolution.* Switzerland : Mirkhäuser Verlag Basel; 2002. 250-287.
45. Mullis KB. and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-50.
46. Grunenwald Haiying. Optimization of Polymerase Chain Reactions. En: Bartlett JMS. and Stirling D. *PCR Protocols, Methods in Molecular Biology: Vol. 226.* 2nd ed. Totowa, New Jersey : Humana Press; 2003. 89-99.
47. Wade L.G. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En: Wade L.G. *Química Orgánica.* 2^a ed. México: Prentice Hall; 1993. 1211.
48. Sanger F. and Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975; 94(3): 441-48.
49. Sanger F. Nicklen S. Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977; 74(12): 5463-67.
50. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RL. et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986; 321(6071): 674-79.
51. Livingston SE. et al. Clearance of Hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D and F. *Gastroenterology.* 2007; 133(5): 1452-57.
52. Erhardt A. et. al. Response to antiviral treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes E- H. *J Med Virol.* 2009; 81(10): 1716-20.
53. Lacombe K. et al. Major role of hepatitis B genotypes in liver fibrosis during coinfection with HIV. *AIDS.* 2006; 20 (3): 419-27.
54. Singleton Paul. *Dictionary of DNA and Genome Technology.* 3rd ed. UK: John Wiley & Sons; 2013.

55. Rojas M., William. Generalidades sobre inmunidad. En: Inmunología. 13^a ed. Corporación para Investigaciones Biológicas; 2004. 6.
56. Brown T. Genomas. 3^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
57. Flint S.J. The Science of Virology. Principles of Virology. 2nd ed. USA: ASM Press; 2004.
58. Uribe Esquivel M. y col. Carcinoma Hepatocelular. Rev Gastroenterol Mex. 2010; 75 Supl. 2: 168-176.
59. van Pelt-Verkuil E. et al. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. New York : Springer; 2008.
60. Cáceres Álvarez R. El método científico en las ciencias. Madrid: Díaz Santos; 199.
61. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci. 1988; 85(8): 2444-48.
62. Domínguez M. y col. Tratamiento de la fibrosis hepática. Gastroenterol Hepatol. 2009; 32(9): 627-632.
63. De Robertis. Fundamentos de Biología celular y Molecular de De robertis. 4^a ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2004.
64. Watson y col. Biología molecular del gen. 5^a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2008.
65. González Campora R. y col. Anatomía microscópica del hígado. En: M. Herrerías Gutiérrez y col. Tratado de hepatología. España: Universidad de Sevilla; 1996.
66. Camargo-Camargo A, Cruz Reyes. Glosario de términos en parasitología y ciencias afines. México: Plaza y Valdés editores; 2001.
67. Petsko GA, Dagmar R. From Sequence to Structure. Protein Structure and Function. UK: New Science Press; 2004.
68. Nelson D.I. and Cox M.M. Las proteínas y sus funciones biológicas: perspectiva. En: David L. Nelson. Principios de Bioquímica de Lehninger. 4^a ed. Barcelona: Omega; 2005. 71-.

69. Bruce Alberts. Como leen las células el genoma: del ADN a la proteína. En: BruceAlberts. et al. Biología molecular de la célula. 5^a ed. Barcelona: Omega; 2010. 391-392.

70. Roitt IM. Receptores de membrana para el antígeno. En: Inmunología: fundamentos. 11^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008. 65.

