



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti-HBc y HBsAg no detectado.

Tesis profesional que para obtener el título de:
Biólogo.
Área biología molecular.

Presenta

Barcnas Villalobos Roberto Eduardo

Número de cuenta 306057867

Asesor externo: D C. Sosa Jurado Francisca.

Asesor interno: D C. Mendoza Rincón Jorge Flavio.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE ORIENTE DEL IMSS
Tesis experimental.

México, D, F, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **BARCENAS VILLALOBOS ROBERTO EDUARDO**, con número de cuenta **306057867**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **24 de noviembre de 2015** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

VOCAL D. C. FRANCISCA SOSA JURADO*

SECRETARIO Dr. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

SUPLENTE Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISABEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti-HBc y HBsAg no detectado.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
México, D. F. a 04 de noviembre de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Agradecimientos.

Estoy agradecido con mi casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México en especial la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en donde he pasado parte de mi vida, he tenido mi formación académica y he crecido como persona.

Agradezco al Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente (CIBIOR) por permitirme realizar mi tesis en sus instalaciones.

A mi directora de tesis la D.C. Francisca Sosa Jurado por aceptarme como su alumno, por guiarme en esta parte de mi carrera, por su paciencia, por brindarme de su conocimiento y experiencia, por la confianza y por la oportunidad.

A quien fue mi asesor interno el Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por su apoyo y sus consejos.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera, al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez y al M. en C. Carlos Bautista Reyes; por su ayuda, consejos y su pronta respuesta.

Al Dr. Gerardo Santos López quien siempre brindo su confianza y apoyo en laboratorio cuando se le necesitaba.

A la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta por su paciencia, su ayuda, su disponibilidad a ayudar y por sus buenas asesorías.

Dedicatorias.

Para los que ahora ya no están conmigo pero que sus enseñanzas me acompañaran por siempre y que siempre recordare con gran cariño en especial a mi padre Alfredo Barcenas Centeno quien me enseñó que lo más importante es la familia.

A mi mamá Alma Leticia Villalobos López quien cubre en excelencia el título de MADRE, por ser incondicional, por ser comprensiva, por ser quien nos une como familia, por todo lo que me ha enseñado y por todo lo que me ha dado.

A mis hermanos Daniel, Gaby y Dulce, con quienes reí, jugué, aprendí, crecí y VIVÍ, porque sé que siempre podré contar con ellos.

“Los hermanos y hermanas son tan cercanos como manos y pies”. -Proverbio.

A mis primos William y Alberto con quienes he vivido y compartido muchos momentos, por esas charlas.

A mi familia que es grande e igual de grande fue siempre su apoyo.

A los buenos amigos que se cuentan con los dedos de una mano, por los buenos momentos compartidos.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	10
1.1. Clasificación	10
1.2. Estructura	10
1.3. Ciclo de replicación	11
1.4. Genoma del VHB	13
1.5. Epidemiología	14
1.6. Genotipos y distribución	15
1.7. Historia natural	17
1.7.1. Fases de la Hepatitis b crónica	18
1.7.2. Hepatocarcinoma	20
1.7.3. Cirrosis	20
1.8. Diagnóstico	21
1.9. Infección oculta de Virus de la Hepatitis b (OBI)	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
3. Justificación	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivos	27
5.1. Objetivos generales	27
5.2. Objetivos particulares	27
6. Material y método	28
6.1. Detección de donador de sangre con infección oculta al VHB	28
6.2. Determinación de las 4 regiones del genoma del virus de la hepatitis B	29
6.2.1. Diseño de iniciadores para detectar las 4 regiones del VHB	29
6.2.2. Concentración de partículas virales	30
6.2.3. Extracción del ADN VHB	30
6.2.4. Detección del ADN VHB por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	32
6.2.4.1. La mezcla de reacción para la PCR punto final	32
6.2.4.2. Condiciones del termociclador en gradientes para determinar temperatura de alineamiento Óptima para cada par de iniciadores	32

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.2.4.3. Mezcla de reacción para PCR punto final a una sola temperatura de hibridación	33
6.2.4.4. Condiciones del termociclador para la amplificación por PCR de cada fragmento a una sola temperatura de hibridación	33
6.2.4.5. Obtención y visualización de los productos de PCR	33
6.2.4.6. Purificación de productos de PCR	34
6.2.4.7. Cuantificación de ADN viral	36
6.3. Clonación de productos de PCR de las 4 regiones del VHB	37
6.3.1. Ligación	37
6.3.2. Células competentes CaCl ₂	38
6.3.3. Trasformación	39
6.3.4. Extracción de plásmido por STET	40
6.3.5. Detección del producto de PCR insertado en el plásmido	41
6.3.5.1. Por PCR punto final	41
6.3.5.2. Por enzimas de restricción	41
6.4. Secuenciación de plásmidos	43
7. Resultados	44
7.1. Pares de iniciadores de las diferentes regiones VHB obtenidos por diseño	44
7.2. Determinación de las temperaturas hibridación	45
7.2.1. Fragmento SP	45
7.2.2. Fragmento P	45
7.2.3. Fragmento PX	46
7.2.4. Fragmento PC/C	46
7.2.5. Fragmento PS	47
7.3. Determinación de las temperaturas hibridación ideales para cada par de iniciadores en donador reactivo a anti-HBc y HBsAg no detectado	47
7.3.1. Fragmento SP	47
7.3.2. Fragmento SP. a1	48
7.3.3. Fragmento SP. a2	48
7.3.4. Fragmento P	49
7.3.5. Fragmento SP _{final}	49
7.3.6. Fragmento PX	50
7.3.7. Fragmento PC/C	50
7.3.8. Fragmento PS	51
7.4. Productos de PCR obtenidos del donador reactivo a anti HBc y HBsAg no detectado clonados en el Vector de clonación Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning	51
7.4.1. Fragmento SPa1	51
7.4.2. Fragmento SPa2	52
7.4.3. SP _{final}	52
7.4.4. P	53
7.4.5. X: Xa	53
7.4.6. PC/C	54

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.5.	Secuencia nucleotídica de ADN VHB obtenida de un donador de sangre con OBI	55
7.6.	Alineamiento y comparación de secuencia de nucleótidos	56
7.7.	Comparación de secuencias de aminoácidos	58
7.7.1.	Comparación de secuencias de aminoácidos de proteína Small HBsAg	58
7.7.2.	Comparación de secuencias de aminoácidos de proteína Middle protein pre-S2/S	59
7.7.3.	Comparación de secuencias de aminoácidos de la proteína antígeno core (HBcAg)	59
7.7.4.	Comparación de secuencias de aminoácidos de la proteína X	60
7.7.5.	Comparación de secuencias de aminoácidos de proteína polimerasa2	60
8.	Discusión	61
9.	Referencias.	64

RESUMEN

El virus de Hepatitis B (VHB) es un miembro de la familia hepadnavirus, en la actualidad se calcula que en el mundo hay unos 2000 millones de personas infectadas por el VHB y se estima que existen alrededor de 400 millones de individuos que presentan una hepatitis crónica por este agente, que conduce a cirrosis y hepatocarcinoma. Alineaciones de genomas completos han demostrado que hay 8 genotipos (se sugieren dos más recientemente) estos varían entre sí en un 8 % aproximadamente, siguen un patrón de distribución conocido, así como diferencias de prevalencia de infección por este virus alrededor del mundo. La evidencia serológica de la hepatitis B aguda o crónica es comúnmente generada por la detección de la proteína que se presenta como un antígeno de superficie (HBsAg), sin embargo, la infección por este agente sigue ocurriendo. La infección oculta del VHB (OBI) se caracteriza por la presencia de ADN del VHB en sangre o tejido hepático con HBsAg no detectable, y con o sin anticuerpos que reconozcan a proteínas antígeno de la cápside del virus de la hepatitis B (anti HBc) o anticuerpos contra HBsAg (anti HBs). En este trabajo se plantea que “el genoma del VHB proveniente de un donador de sangre con infección oculta (reactivo a anti-HBc y HBsAg no detectable) muestra mutaciones ya conocidas en el “determinante a” que generan una mutación de escape”. Para probar esto se requirió hacer la secuenciación del genoma de un donador de sangre que cumpliera las características de una OBI. Se realizó el diseño de diferentes iniciadores para la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y su posterior inserción en un vector de clonación, amplificación en bacterias *E. coli* TOP 10, purificación y secuenciación. Por último, se realizó la comparación de la secuencia obtenida del donador con OBI con una secuencia genotipo H, siendo éste el más común

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

en México. Se editó y ensambló el genoma y se obtuvieron 2,474 nucleótidos (77.3%) de los 3,215 (100%) que tiene el genoma de VHB. Por lo tanto, aproximadamente se obtuvo el 80% del gen S, 75% del gen P, 100% del gen PC/C y 100% del gen X. La secuencia de nucleótidos del “determinante a” abarca del nucleótido 520 al 640 y en la Small HBsAg entre los aminoácidos 121 al 149. En las secuencias de aminoácidos no fueron detectadas ninguna de las tres mutaciones M103I, K122R y G145A asociadas a una falla en la detección del HBsAg en pruebas diagnósticas. Las diferencias encontradas entre las dos fueron W36C, T63I, D164E y M195I ninguna de ellas reportada previamente.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

1. ANTECEDENTES

1.1. Clasificación

El Grupo de Estudio ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus) acumula suficientes datos en la nomenclatura de los virus de la hepatitis para reconocer al virus de la hepatitis B (VHB) humana como un miembro de un grupo único de virus y clasificarlo, junto con un número de virus animales relacionados, en una nueva familia llamada el Hepadnaviridae [1, 2, 3]. Hepadnavirus se pueden encontrar tanto en mamíferos (orthohepadnaviruses) y aves (avihepadnaviruses). La variabilidad genética del VHB es muy alta. Hay ocho genotipos del VHB (se sugieren dos más recientemente) y tres cepas del VHB de los monos (chimpancé, mono lanudo y gorila) que parecen ser los genotipos adicionales del VHB [3].

1.2. Estructura

Estructuralmente el virión está formado por una partícula esférica de 42 nm de diámetro (partícula de Dane), rodeada de una envoltura lipoproteica de unos 7 nm de espesor, la que contiene las proteínas virales de superficie (HBsAg). En el interior del virión se encuentra la nucleocápside icosaédrica, compuesta por el antígeno core (HBcAg), el cual rodea al ADN genómico que en el extremo 5' de la hebra negativa lleva unida covalentemente a la polimerasa viral (P) (figura 1). Además del virus completo, las células infectadas secretan grandes cantidades de partículas lipoproteicas subvirales de 20 nm (esferas) y de hasta 200 nm (filamentos) formadas sólo por el HBsAg y lípidos derivados del huésped, las cuales están implicadas en la evasión de la respuesta inmune [2,4].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

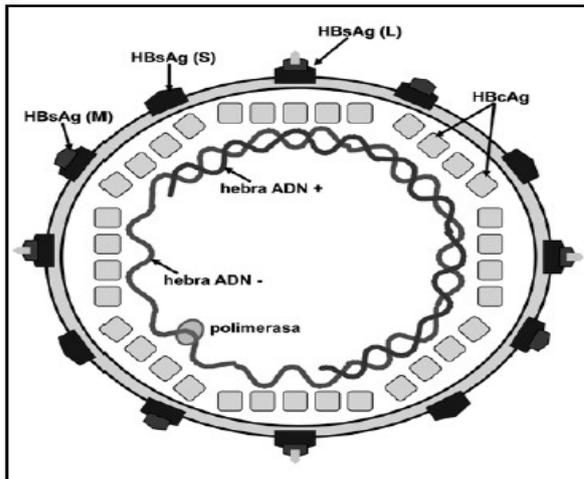


Figura 1. El virus completo (partícula de Dane) consiste de una envoltura lipídica que contiene al HBsAg en sus tres formas: proteínas S (*small*), M (*middle*) y L (*large*). En el interior se encuentra la nucleocápside formada por el HBcAg, el ADN y la polimerasa viral [2,4].

1.3. Ciclo de replicación

El VHB ha evolucionado en un ciclo de vida único que resulta en la producción de enormes cargas virales durante la replicación activa sin llegar a matar a la célula infectada directamente [5]. Puesto que la enzima transcriptasa inversa carece de actividad de corrección de pruebas, la tasa de sustitución de nucleótidos para el VHB es más alta que la de otros virus de ADN y genomas virales mutados surgen con frecuencia. [5,6] Esta diversidad genómica extraordinaria, junto con una alta capacidad de replicación, permite al VHB adaptarse a diferentes hospedadores [7].

La replicación del genoma del VHB puede ser dividida a grandes rasgos en tres fases (figura 2):

1. Viriones infecciosos que contienen en su núcleo interior icosaédrico el genoma como una doble cadena circular de ADN, pero no cerrado covalentemente de aproximadamente de 3.2 Kb de longitud (circular relajado, o CR-ADN);

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

2. Después de la infección, el CR-ADN se convierte, en el interior del núcleo de la célula huésped, en un plásmido de tipo ADN circular cerrado covalentemente (cccADN),

3. El cccADN, genómico y varios ARN subgenómicos se transcriben por la ARN polimerasa celular, de los cuales el ARN pregenómico (pgARN) es selectivamente empaquetado en la capsida de la progenie de los viriones y se transcribe de forma inversa con los coenvasados de proteína P en los nuevos genomas de CR-ADN. Madurado el CR-ADN los ARN que contienen las nucleocápsides que aún son inmaduros y se puede utilizar para la amplificación intracelular de cccADN, o ser envuelto y liberado de la célula como progenie de viriones [8,9].

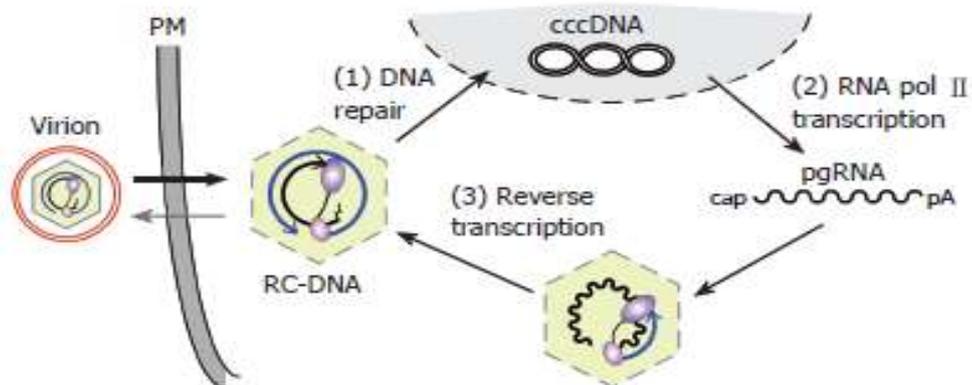


Figura 2. Ciclo de replicación del genoma hepadnaviral. Viriones envueltos antes de infectar la célula, liberando RC-ADN que contienen nucleocápsidas en el citoplasma. RC-ADN se transporta al núcleo, y es reparado para formarse en cccADN (1). La transcripción de cccADN por la ARN polimerasa (2) produce pgARN. El pgARN es encapsulado, junto con la proteína P, y reversion transcritos en el interior de la nucleocápside (3). (+)-Síntesis de ADN a partir de la (-)-ADN plantilla genera nuevo RC-ADN. Nuevos ciclos se llevan de forma intracelular con la amplificación de cccADN, como alternativa, las nucleocápsides RC-ADN que contienen están envueltos y son lanzados como viriones. MP, membrana plasmática [8].

1.4. Genoma del VHB

El genoma viral es un ADN circular, parcialmente de doble hebra, y de una longitud aproximada de 3200 pares de bases (pb) nucleotídicas (figura 3) [1, 6,10]. Funcionalmente presenta cinco promotores transcripcionales, dos regiones potenciadoras (enhancers), y cuatro marcos de lectura abiertos, designados S, C, P, y X, los que se encuentran parcialmente sobrepuesto [2, 3, 6].

El marco de lectura S codifica las 3 proteínas virales de superficie, HBsAg: L (large, LHBsAg), M (middle, MHBsAg), y S (small, SHBsAg). El gen C (Core) incluye las regiones precore y core [2, 10].

El marco de lectura C codifica para la proteína core o HBcAg, unidad estructural de la cápside, y también para el antígeno "e" del virus B HBeAg, dependiendo de la región en donde se inicie la traducción [2,11, 12].

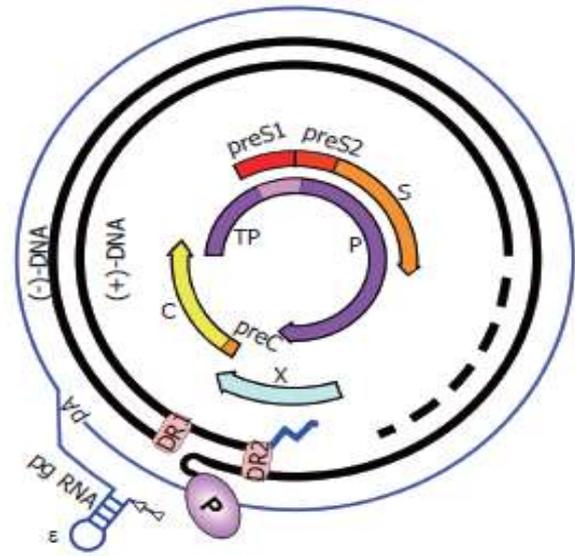
La polimerasa viral es un proteína codificada por el marco de lectura P, y está funcionalmente dividida en 3 regiones: en el extremo aminoterminal se encuentra el dominio denominado proteína terminal (PT), el cual está involucrado en la formación de la cápside e iniciación de la síntesis de la cadena negativa de ADN; en medio de la proteína, el dominio transcriptasa reversa (TR), el que cataliza la síntesis del genoma viral; y en el extremo carboxilo terminal, el dominio ARNasa H que degrada el ARN pregenómico en el intermediario híbrido ARN/ADN y facilita la replicación del genoma viral [2, 11,12].

El marco de lectura X codifica una pequeña proteína viral de aproximadamente 16.5 kDa (proteína X o HBx) que posee múltiples funciones, incluyendo transducción intracelular de señales, activación transcripcional, reparación del ADN e inhibición de la degradación proteica. Los mecanismos moleculares detallados de estas actividades, y la

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

función biológica de la proteína HBx durante el ciclo viral son desconocidos. Sin embargo, se ha establecido que esta proteína es necesaria para una infección productiva por el VHB *in vivo* y que puede contribuir al potencial oncogénico del VHB [2, 11].

Figura 3. Organización del Genoma del VHB. La cadena parcialmente doble, RC-ADN circular se indica por las líneas negras gruesas, con P unido covalentemente al extremo 5' final de la (-)-ADN, y el cebador de ARN (línea en zigzag) en el extremo 5' de (+)-ADN. La parte discontinua simboliza las longitudes de los (+)-hilos heterogéneos. DR1 y DR2 son las repeticiones directas. El círculo exterior simboliza el pgARN terminalmente redundante con ϵ cerca del extremo 5', y la cola poli-A en el extremo 3'. El ARNm precure es casi idéntico, excepto que se inicia ligeramente arriba. Las posiciones relativas de los marcos de lectura abierta para el núcleo (C), P, preS / S, y X se muestran en el interior. TP, dominio Terminal de la proteína P [8].



1.5. Epidemiología

La infección por el VHB representa un importante problema de salud pública, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que al menos dos mil millones de personas (un cuarto a un tercio de la población mundial) ha sido infectado con el virus; 400 millones personas están infectadas crónicamente [2, 6,14]. Hay una estimado 600 000 muertes al año por complicaciones de enfermedad hepática relacionada con el VHB [10,14].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

El VHB es considerado como el segundo agente carcinogénico en humanos conocido después del tabaco, siendo la causa de aproximadamente el 80% de los casos con carcinoma hepatocelular primario [15].

La prevalencia e incidencia epidemiológica de la infección, así como sus secuelas, no siguen un perfil uniforme de endemidad. Entre los países del continente asiático existe una alta endemidad (>8%), que también se presenta entre las poblaciones indígenas del Amazonas en Sudamérica y Alaska en Norteamérica. En contraste, existen zonas de endemidad intermedia (>2-7.9%) en Europa y baja (<2%) en países como Estados Unidos y Canadá. México se ha considerado como una zona de baja endemia; no obstante, recientemente se ha demostrado que en el país existen zonas de alta endemia, principalmente en poblaciones indígenas, al igual que en Centro y Sudamérica [13,16].

Aproximadamente el 45% de la población del mundo, incluidos los que viven en muchos países de África y los países de Asia, la cuenca del Amazonas y partes del medio Oriente, se considera que viven en zonas de alta endemidad con un riesgo de por vida a la infección de más de 60%. Sólo alrededor del 12% de la población mundial vive en zonas de baja endemidad, como Estados Unidos, Europa Occidental y Australia, donde la prevalencia de HBsAg es <1%, y el riesgo de por vida a la infección es <20% [17].

1.6. Genotipos y distribución

Los Genotipos del VHB difieren en más de 8%. Análisis filogenéticos en las que se han utilizado alineaciones de genomas completos han demostrado que hay 8 genotipos, llamados A, B, C, D, E, F, G y H, del VHB [2, 3, 18, 19]. Recientemente, se han propuesto dos genotipos polémicos (I y J) en el sur de Asia [10].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

Un prototipo del genoma del VHB puede tener una longitud de 3215 pb, tal como se encuentra en los genotipos del B, C, F y H. Debido a deleciones e inserciones, los otros genotipos de VHB difieren ligeramente en longitud de genoma. Así el genotipo G con 3248 pb es más largo por 66 pb que el genotipo D con 3182 pb [2, 3, 6].

Amplios análisis filogenéticos han demostrado que los genotipos del VHB se pueden subdividir en subgenotipos [7, 20]. Los subgenotipos de VHB difieren en al menos 4%. En los genotipos A, B y C, los datos epidemiológicos muestran que los respectivos pares subgenotipos A1/A2, B1/B2 y C1/C2 difieren mucho virológicamente y probablemente en algunos parámetros clínicos. Los subgenotipos también muestran una distribución geográfica precisa (figura 4). Sin embargo, esto no es cierto para el genotipo D con subgenotipos D1, D2 y D3 ya que se describe como muy extendida en el mundo, por ejemplo, D3 se encuentran en Asia (India Oriental), Sudáfrica y Europa (Serbia) [7, 21].

Excepto para el genotipo E y G, todos los genotipos del VHB se puede dividir en subgenotipos. Por ausencia de subgenotipos en el genotipo E se ha supuesto que es la consecuencia de un génesis reciente para este genotipo. Por otra parte, el genotipo E no está presente en los americanos de Origen africano de Venezuela y Brasil. El caso para el genotipo G parece ser menos claro. El Genotipo G fue encontrado originalmente en los Estados Unidos de Norteamérica, Francia y Alemania. Más tarde, la secuenciación parcial de genes del VHB señaló una alta prevalencia de genotipo G en México. Sin embargo, el origen geográfico del genotipo G sigue siendo desconocido [6, 7].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.



Figura 4. Mapa de distribución de subgenotipos del VHB [Error! No se encuentra el origen de la referencia. [7].

1.7. Historia natural

El VHB se transmite principalmente por tres vías: parenteral, sexual y vertical, siendo las dos últimas, las de mayor relevancia en la actualidad [22].

La prevalencia del VHB y la principal vía de transmisión del VHB varían geográficamente. En las regiones en desarrollo con alta prevalencia de HBsAg como el sur de Asia Oriental, China, África Subsahariana y la cuenca del Amazonas es más comúnmente adquirida la infección en la infancia. En parte de Europa oriental y meridional, Oriente Medio, Japón y parte de América del Sur, la prevalencia de la infección por VHB es intermedia y la infección se adquiere en los bebés o la infancia. En los países desarrollados, como América del Norte, Europa Occidental y Australia, la prevalencia del VHB es baja y la mayoría infección se adquiere en la edad adulta a través del contacto sexual o uso de drogas inyectables [23].

El VHB puede causar hepatitis aguda y fulminante o crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (HCC) [24].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

La infección por el VHB perinatal o adquirida en la niñez, causa generalmente hepatitis aguda y se asocia con un alto riesgo de cronicidad (30 a 90% de los casos). En adultos, entre el 90 y el 95% de los casos ocurre una hepatitis aguda, solamente entre el 5 y el 10% de los adultos inmunocompetentes que tiene una infección aguda por el VHB evolucionará a hepatitis crónica, hepatitis crónica activa, cirrosis y el desarrollo de carcinoma hepatocelular. El fallo hepático fulminante es inusual (0,1 a 0,5% de pacientes), pero una coinfección aguda con otros virus de hepatitis aumenta el riesgo de hepatitis fulminante [7, 24,25, 26].

El daño hepático en la hepatitis B crónica se debe principalmente a la interacción directa entre el sistema inmune del huésped y los hepatocitos infectados por el VHB. Las citocinas antivirales, tales como el interferón alfa, beta, y gamma (IFN-a, IFN-b, IFN-g), así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), se han implicado como el principal contribuyente a la eliminación del virus, mientras que la destrucción de hepatocitos infectados por los linfocitos T citotóxicos contribuye para tanto el aclaramiento viral y el desarrollo de la enfermedad de hígado [5]. Los pacientes crónicamente infectados con VHB tienen una probabilidad mayor que 100 veces de desarrollar HCC en comparación con personas no infectadas [6, 27].

1.7.1. Fases de la Hepatitis b crónica

La detección de HBsAg en el suero en dos ocasiones con 6 meses de diferencia es diagnóstico de Hepatitis B crónica (CHB) [20, 28].

Fase inmunotolerante: se caracteriza por ausencia de actividad bioquímica (aminotransferasas normales) en presencia de replicación activa y con antígeno "e" del

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

virus B (HBeAg) presente y ADN del virus (VHB ADN) detectado en el suero. La biopsia hepática en esta fase es normal y no muestra actividad inflamatoria. Se presenta después de la transmisión vertical del virus, y se observa en las primeras dos décadas de la vida. Generalmente no se observa cuando la infección se adquiere más tarde. En la fase inmunotolerante no hay depuración espontánea del virus [28, 29].

Fase inmunorreactiva: se caracteriza por exacerbación clínica y bioquímica de la hepatitis crónica, con elevación de aminotransferasas, pero aún niveles elevados del ADN de VHB. La biopsia hepática se presenta con actividad necroinflamatoria indicando destrucción mediada inmunológicamente de los hepatocitos infectados. Hay presencia de HBeAg por la persistencia de replicación viral y se denomina hepatitis B HBeAg positivo, y con el tiempo puede haber seroconversión con desaparición de este antígeno y aparición de su anticuerpo (Anti HBe) mostrando el paso a un estado no replicativo [20, 27, 29].

Fase no replicativa: en esta fase nuevamente desaparecen los síntomas y las manifestaciones clínicas de enfermedad hepática, y los individuos infectados se convierten en "portadores inactivos". Los niveles del ADN del VHB son bajos, las aminotransferasas se normalizan, y ya se ha establecido la seroconversión de HBeAg a Anti HBe [20, 27,29].

Fase de reactivación: esta fase se presenta después de un periodo de tiempo de permanecer en estado de "portador inactivo", y se caracteriza por una nueva elevación de niveles del ADN del VHB posterior a una mutación en el genoma del virus a nivel de la región o del promotor del core. No se producirá HBeAg porque estas mutaciones interfieren en la transcripción de este antígeno [27,29].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

1.7.2. Hepatocarcinoma

En la infección crónica, el genoma del virus B se incorpora al hepatocito y puede causar mutaciones que dan origen a células hepáticas aberrantes que evolucionarán hacia el desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC). El VHB es considerado el segundo carcinógeno después del cigarrillo y es el responsable de la mayoría de hepatocarcinomas en África y Oriente [29].

El carcinoma hepatocelular es un importante problema de salud en todo el mundo, lo que representa una de las principales causas de muerte. La infección por virus de la hepatitis B crónica es el factor etiológico más importante de este tumor, lo que representa para el desarrollo de más de 50% de los casos en el mundo [30].

1.7.3. Cirrosis

La cirrosis es una complicación de la infección crónica, puede progresar a insuficiencia hepática e hipertensión, llegando a cumplir criterios para trasplante hepático. Los resultados iniciales de trasplante en VHB eran muy malos debido a la recurrencia con hepatitis severa fibrosante colestásica que llevaba a la muerte temprana o a retrasplante. Por un tiempo, estos pacientes no fueron considerados candidatos a trasplante por muchos centros. Con el uso de globulina específica para hepatitis B (HBIG), desde la fase anhepática y por tiempo indefinido postrasplante, manteniendo niveles adecuados de anticuerpos antisuperficie (Anti HBs) se logró mejorar la sobrevida a niveles similares de los trasplantados por otras causas. La adquisición de la inmunoprolifaxis con HBIG está disponible, pero a un costo muy alto [29].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

Los estudios longitudinales de los pacientes con hepatitis B crónica indican que, después del diagnóstico, la incidencia acumulada de 5 años de desarrollar cirrosis oscila 8-20% [31].

1.8. Diagnóstico

El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) aparece en el suero de 1-10 semanas tras la exposición aguda al VHB, y lo hace antes del comienzo de la sintomatología clínica y de la elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) sérica. Su persistencia al cabo de 6 meses implica infección crónica. Por otro lado, los pacientes en los que se detecta HBsAg en el suero que no presentan marcadores de replicación viral, ni signos de lesión hepática se conocen como portadores sanos del VHB [32].

La desaparición sérica del HBsAg es seguida por la aparición de los anticuerpos contra el antígeno de superficie (anti HBs), que se consideran como el indicador de recuperación de la enfermedad y persisten de forma indefinida en la mayoría de los pacientes, confiriendo inmunidad frente a la reinfección. Es el único marcador presente en el suero de las personas vacunadas con respuesta inmunológica [32].

La evidencia serológica de hepatitis B aguda o crónica es comúnmente generada por el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) [32].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

1.9. Infección oculta de Virus de la Hepatitis b (OBI)

La infección oculta del VHB (OBI) se caracteriza por la presencia de ADN del VHB en sangre o tejido hepático con HBsAg no detectable, y con o sin anticuerpos a antígeno core de la hepatitis B (anti HBc) o anticuerpos contra HBsAg (anti HBs) [33,34].

Las observaciones clínicas sugieren que los portadores de las OBI pueden ser una fuente de transmisión del VHB a través transfusión de sangre o un trasplante de órganos. También se considera un factor de riesgo para desarrollo HCC [34].

La prevalencia de las OBI en México al parecer varía dependiendo de la población en estudio. En donadores de sangre de Yucatán se reportó una prevalencia de 7.4 % [33], en un estudio de población nativa de México de Nahuas y Huicholes se encontró de un 14.2 % de OBI [22].

Estudios moleculares han demostrado que como resultado de una infección por el VHB pueden ocurrir alteraciones genéticas en el genoma viral en replicación, vale decir, mutaciones puntuales, supresiones e inserciones. Estas alteraciones se generan durante el curso natural de la infección crónica y en respuesta a la presión que ejerce el sistema inmune del huésped, o bien, a presiones exógenas tales como la vacunación, el tratamiento con la inmunoglobulina anti HBs o la terapia con agentes antivirales [2].

En la región precore, la variante más frecuente es la mutación puntual G1896A, que produce un codón de término en el marco de lectura, con la consiguiente pérdida de la expresión del HBeAg [5].

Relacionado a lo anterior, y como se sabe que la región promotora basal del core (PBC) se sobrepone con la región X del genoma del VHB, cuando ocurren mutaciones

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

éstas provocan la sustitución de los aminoácidos 130 y 131 de la proteína X, situación que también ha sido propuesta como marcador pronóstico para el desarrollo de cáncer hepático [2].

Se han reportado la existencia de variantes defectivas “a” del VHB, debido a mutaciones puntuales en diversos residuos de los aminoácidos que componen a la determinante antigénica “a” (del 120 -147) del HBsAg [21].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se reporta una prevalencia de OBI en población indígena de 14.2 %, y puesto que la población indígena de México rebasa los 12 millones, el impacto epidemiológico del VHB podría ser mayor de lo que se ha considerado hasta la fecha. Los estudios epidemiológicos más recientes y de revisión de la literatura muestran que en el país hay por lo menos tres millones de personas adultas que se han infectado (anti HBc positivos) y de éstos un mínimo de 300 000 portadores activos (HBsAg positivos) podrían requerir tratamiento. No obstante, si consideramos a la población indígena como zona de alta endemia, entonces el número de pacientes que se han infectado podría aumentar hasta 7 u 8 millones de mexicanos y a cerca de un millón de portadores activos [16, 22].

Se tienen evidencias de que en México predomina el genotipo H del VHB, a diferencia de otras regiones del mundo. La variabilidad genética del VHB genotipo H podría ser la causa que explicara la poca sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas utilizadas hasta la fecha, ya que las mismas se han diseñado con base en los genotipos D y A, los cuales hasta ahora no son prevalentes en nuestro país [16].

3. Justificación

La evidencia serológica de la hepatitis B aguda o crónica es comúnmente por la detección de la proteína que se presenta como un antígeno de superficie (HBsAg). Pero la transmisión de la hepatitis B por transfusión sigue ocurriendo [5].

La infección oculta de VHB (OBI) se caracteriza por la presencia de ADN del VHB en sangre o tejido hepático con HBsAg no detectable, y con o sin anti HBc o anti HBs [33].

Las observaciones clínicas sugieren que los portadores con OBI pueden ser una fuente de transmisión del VHB a través de la transfusión de sangre o en trasplante de órganos. También se considera un factor de riesgo para desarrollo de hepatocarcinoma [33].

Una región de interés en el genoma de VHB es la S que codifica para el antígeno de superficie (HBsAg), donde se encuentra el determinante “a”, epítotope para el cual van dirigidos los anticuerpos neutralizantes y que es el principal blanco de las pruebas diagnósticas. Las sustituciones de aminoácidos dentro y en las cercanías del determinante “a”, pueden afectar la unión de los anticuerpos neutralizantes, generando mutantes denominadas “de escape”. Estudios realizados en Argentina, donde existen los subgenotipos F1 y F4, han demostrado la presencia de múltiples mutaciones en la región que codifica para el determinante “a”, muchas de las cuales corresponden a mutantes de escape [2, 21].

Por lo mencionado anteriormente se quiere obtener la secuencia completa del genoma del virus de la hepatitis B a partir de un donador de sangre mestizo con infección oculta al virus de la hepatitis B.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

4. Hipótesis

Ha

El genoma del VHB proveniente de un donador de sangre con infección oculta (reactivo a anti HBc y HBsAg no detectable) muestra mutaciones ya conocidas en el “determinante a” que generan mutante de escape.

Ho

El genoma del VHB proveniente de un donador de sangre con infección oculta (reactivo a anti HBc y HBsAg no detectable) no muestra mutaciones ya conocidas en el “determinante a” que generan mutante de escape.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

5. Objetivos

5.1. Objetivos generales

Obtener el genoma completo del virus de la hepatitis B de un donador de sangre reactiva a anti HBc y HBsAg no detectado.

5.2. Objetivos particulares

- Detectar donador de sangre con infección oculta al virus de la hepatitis B.
- Obtener pares de iniciadores ideales para detectar las 4 regiones del VHB.
- Obtener los fragmentos de las diferentes regiones del genoma del virus de la hepatitis B mediante PCR anidado en punto final.
- Clonar los diferentes fragmentos de las diferentes regiones del genoma del VHB.
- Secuenciar los fragmentos de las diferentes regiones del genoma del VHB obtenidos.
- Editar y analizar las secuencias de las diferentes regiones del VHB
- Detectar mutaciones de aminoácidos en la región denominada “determinante a” en proteína HBsAg(S).

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6. Material y método

6.1. Detección de donador de sangre con infección oculta al VHB

La muestra de sangre reactiva a anti HBc y HBsAg no detectado y la muestra de sangre reactiva a anti HBc y HBsAg fueron obtenidas en el banco de sangre de la Unidad Médica de Alta Especialidad. Centro Médico Nacional General de División Manuel Ávila Camacho del Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Puebla.

La detección de Anti HBc fue con el sistema comercial ARCHITECT anti HBc II (2009), son pruebas de inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) recubierta con rHBcAg. Estos sistemas corresponden a segunda generación de la misma prueba, que detecta anticuerpos humanos contra la proteína del núcleo del VHB. La presencia o ausencia de anti HBc en la muestra se determina mediante la comparación de la señal de quimioluminiscencia de la reacción de las muestras con la señal de corte determinado en el análisis de calibración activa. Las muestras con $S / CO < 1, 0$ se consideran negativas y S / CO valores ≥ 1.0 valores se consideran reactivos.

Para la detección de HBsAg se utilizó el Sistema comercial ARCHITECT HBsAg, en un CMIA que utiliza micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal (IgG e IgM) anti HBs. Este sistema detecta el HBsAg y es capaz de detectar la mutación más común de HBsAg (Gly \rightarrow Arg145). Los valores de HBsAg (IgG e IgM) se obtuvieron de una curva de calibración generada previamente. Las muestras con valores ≥ 0.05 UI / ml se consideran reactiva, y hay un valor máximo de detección a 250 UI / ml.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.2. Determinación de las 4 regiones del genoma del virus de la hepatitis B

6.2.1. Diseño de iniciadores para detectar las 4 regiones del VHB

Para obtener los iniciadores de las diferentes regiones del ADN del VHB lo primero que se hizo fue buscar en un banco de secuencias (Genbank) los genotipos del virus más frecuente en América del Norte: (Tabla 1)

Tabla 1. Secuencias empleadas para diseño de iniciadores para detectar las 4 regiones del virus de la hepatitis B			
Genotipo	Identificación GenBank NCBI	Marcadores serológicos	OBI*
H	AB516393.1	Anti HBc (+) HBsAg (-)	Si
G	AB375161.1	Anti HBc (+) AgHBs (+)	No
H	HM117850.2	Anti HBc (+) AgHBs (+)	No
H	AB516394.1	Anti HBc (+) AgHBs (-)	Si
F	FJ657519.1	Anti HBc (+) AgHBs (+)	No
D	EU594396.1	Anti HBc (+) AgHBs (+)	No

*Occult hepatitis B infection

Todas las secuencias se descargaron en formato FASTA. Posteriormente se realizó una comparación de las secuencias utilizando el programa Clustalw, se buscaron las regiones más conservadas de cada una de las 4 regiones del genoma VHB. Las cuales fueron las ideales para el diseño de los iniciadores.

Después las secuencias en formato fasta fueron introducidas a un programa para el diseño de iniciadores (PerlPrimer v1.1.21) éste dio diferentes condiciones para Tm, length, %GC°, dS°, dH°, dG°, los pares de iniciadores fueron escogidos dependiendo de las condiciones ideales.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.2.2. Concentración de partículas virales

La concentración de las partículas virales a partir de suero o plasma fue con polietilenglicol 6000 al 30%. A 500 μ l de suero o plasma fueron añadidos 250 μ l de polietilenglicol al 30%, se dejó reposar 24 horas a 4 °C. Posteriormente se centrifugo a 1,000 g durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante quedando las partículas virales en el botón formado. El botón de partículas virales fue disuelto con buffer de disolución de proteínas (pH 7.4).

6.2.3. Extracción del ADN VHB

La extracción de ADN de VHB se hizo con el equipo Circulating DNA from Plasma NucleoSpin® Plasma XS. MACHEREY-NAGEL MACHEREY-N. Siguiendo el siguiente protocolo: Preparación de la muestra:

*Se añadieron 240 μ l de concentrado de partículas virales a partir de plasma a un tubo de 1.5 ml.

*Se agregaron 20 μ l de proteinasa K a la muestra, se mezcló e incubo a 37 ° C durante 10 min.

*Posteriormente fueron añadidos 360 μ l buffer binding. Se cargó la mezcla de 600 μ l dentro de una columna de sílice colocada previamente sobre un tubo de colección de 2 ml.

*Se centrifugo a 2,000 g durante 30 segundos, y se aumentó la fuerza centrífuga a 11,000 g durante 15 segundos. Se desechó el tubo de colección y fue transferida la columna sobre otro tubo colector de 2 ml.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

Lavado y secado la membrana de sílice.

*Para el primer lavado se pipetearon 500 µl buffer de lavado I en la columna. Se centrifugo durante 30 segundos a 11,000 g. Se desechó el Tubo colector con el filtrado y se colocó la columna nuevamente en otro tubo colector de 2 ml.

*Para el segundo lavado fueron añadidos 250 µL de buffer de lavado II a la columna. Fue centrifugado durante 3 min a 11,000 g. Se descartó el tubo de colección con el filtrado y se colocó la columna en un tubo cónico de 1.7 ml para la elución del ADN.

*Elución del ADN: fueron añadidos 20 µl de buffer de elución a la columna. Se centrifugo durante 30 segundos a 11,000 g, el volumen de elución puede variar en el rango de 5 a 30 µl.

La eliminación del etanol residual.

* Se incubo la fracción de elución con la tapa abierta durante 12 min a 70 ° C. La extracción fue almacenada a -20 °C.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.2.4. Detección del ADN VHB por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

6.2.4.1. La mezcla de reacción para la PCR punto final

Componente	Volumen
Master mix	25.0 µl
Iniciador sentido	1.0 µl
Iniciador anti sentido	1.0 µl
ADN viral	20.0 µl
Agua libre de nucleasas	3.0 µl
Volumen total	50.0 µl

De esta mezcla de reacción se dividió el volumen total en 8 tubos de PCR y se probaron 8 temperaturas de hibridación diferentes para cada región del virus (para cada par de iniciadores diferente). Esto para conocer cuál era la temperatura ideal de alineamiento para cada par de iniciadores.

6.2.4.2. Condiciones del termociclador en gradientes para determinar temperatura de alineamiento Óptima para cada par de iniciadores

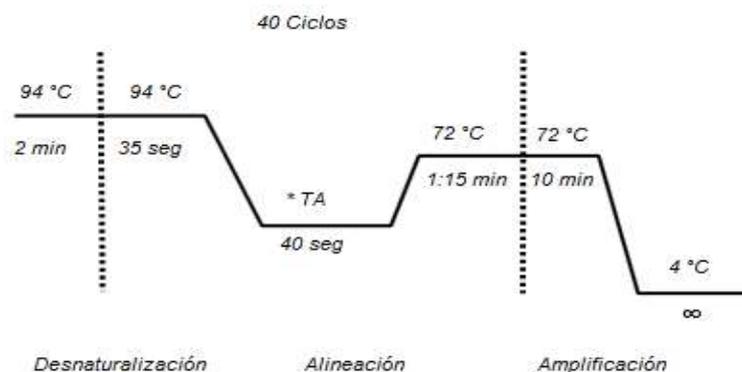


Figura 5. * TA (Temperatura de Alineación) 8 temperaturas diferentes para 8 diferentes reacciones, que oscilaban entre 46 °C y 62 °C.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.2.4.3. Mezcla de reacción para PCR punto final a una sola temperatura de hibridación

Tabla 3	
Componente	Volumen
Master mix	12.5 µl
Sentido	0.5 µl
Anti sentido	0.5µl
ADN	10.0 µl
Agua libre de nucleasas	1.5µl
Volumen total	25.0µl

6.2.4.4. Condiciones del termociclador para la amplificación por PCR de cada fragmento a una sola temperatura de hibridación

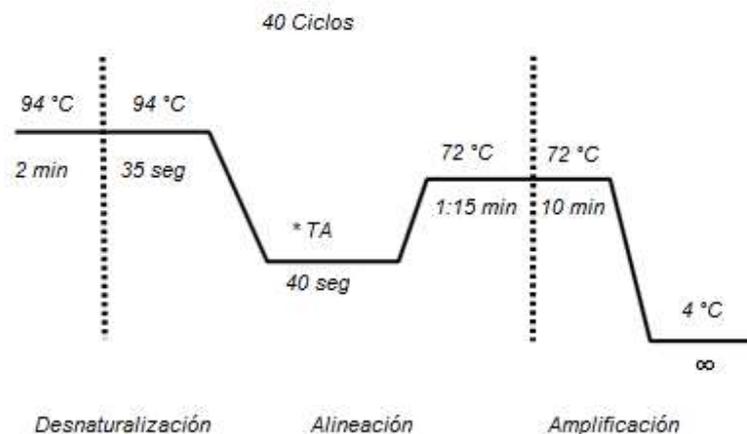


Figura 6. *TA (Temperatura de Alineación) probada y estandarizada para cada par de iniciadores.

6.2.4.5. Obtención y visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1% por electroforesis y visualizados con luz UV.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.2.4.6. Purificación de productos de PCR

Los fragmentos fueron purificados a partir del gel de agarosa al 1%. Se realizó la purificación por banda con el equipo PCR clean-upvGel extraction. Macherey-nagel.

La extracción de ADN a partir de geles de agarosa.

Nota: se minimizó el tiempo de exposición a rayos UV para evitar dañar el ADN.

*Se tomó un bisturí limpio para cortar el fragmento de ADN de un gel de agarosa. Se retiró todo el exceso de agarosa.

*Se determinó el peso de la porción de gel en un tubo limpio.

*Por cada 100 mg de gel de agarosa al 1% se adicionaron 200 µl de Buffer NTI.

*Se incubó la muestra durante 10 min a 50 °C y se agitó la muestra brevemente cada 3 min hasta que la porción de gel estuvo completamente disuelta.

ADN bind

*Se colocó una columna en un tubo de recogida de 2 ml y se cargaron hasta 700 µl de la muestra.

*Fue centrifugado durante 30 segundos a 11,000 g, se desechó el filtrado y se colocó la columna de nuevo en el tubo de recogida.

*Se cargó la muestra restante cuando fue necesario y se repitió la etapa de centrifugación.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

Lavado de la membrana de sílice

*Se añadieron 700 µl de tampón NT3 a la columna. Se centrifugó durante 30 segundos a 11,000 g, se descartó el filtrado y se colocó la columna de nuevo en el tubo de recogida.

Recomendado: se repitió el paso de lavado de la membrana de sílice seco, se centrifugo durante 1 min a 11,000 g para eliminar completamente el tampón NT3.

Nota: el etanol residual de tampón NT3 podría inhibir reacciones enzimáticas. Se logró la eliminación del etanol mediante la incubación de la columna por 5 min a 70 °C antes de la elución.

Elusión del ADN.

*Se colocó la Columna en un nuevo tubo de 1.5 ml.

*Fueron Añadidos 30 µl de Buffer NE y se incubó a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 1 min. Se centrifugó durante 1 min a 11,000 g.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.2.4.7. Cuantificación de ADN viral

Nombre del protocolo: dsDNA Cuantificación Plate.prt blanco

El protocolo requiere una prelectura de la microplaca para restar la absorbancia de fondo de la microplaca a 260 nm, seguido por una medición de absorbancia a 260 nm.

La corrección de paso de luz se selecciona para corregir el valor de absorbancia para reflejar un paso de luz de 1 cm. La absorbancia corregida se utiliza entonces en una sola placa de transformación para calcular la concentración de ADN.

El archivo de experimento contiene todas las determinaciones de absorbancia necesaria, incluyendo la placa de prelectura (260 en blanco), las determinaciones de absorbancia a 977 nm (de prueba) y 900 nm (referencia), que se utilizan para corregir la longitud de recorrido, así como la determinación experimental a 260 nm.

Configuración de la placa:

Configuración de la placa incluye muestras por duplicado.

No hay espacios en blanco o controles.

Informe: El informe contiene una matriz con:

1. Valores de absorbancia primas.
2. Absorbancia corregida a 1 cm de paso de luz.
3. Concentración de ADN Calculado. El informe también contiene una tabla con las densidades ópticas corregidas, concentraciones calculadas y desviación estándar y % CV de los conjuntos de réplicas.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.3. Clonación de productos de PCR de las 4 regiones del VHB

6.3.1. Ligación

Con los fragmentos del ADN del VHB amplificados y purificados se prosiguió a la ligación de éstos a un vector de clonación Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit #K1231, #K1232 (Figura 7).

* Se realizó la siguiente reacción en hielo (Tabla 4, reacción 1)

Tabla 4. Reacción 1	
Componente	Volumen
Buffer de reacción 2x	10.0 µl
Producto de PCR purificado	1.0 µl
Agua libre de nucleasas	6.0 µl
Enzima de despunte ADN	1.0 µl
Volumen total.	18.0 µl

* Se dio brevemente agitación y un spin.

* Se incubo la mezcla a 70 ° C durante 5 min. Se enfrió en hielo.

*Se hizo lo siguiente mezcla de reacción (Tabla 5).

Tabla 5. Reacción 2	
Componente	Volumen
Vector de clonación	1.0 µl
ADN Ligasa	1.0 µl
Reacción 1	18.0 µl
Volumen total	20.0 µl

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

* Se dio brevemente agitación y se le dio un spin.

* Se incubo la mezcla de ligación a temperatura ambiente (22 ° C) durante 5 min.

* Se utilizó la mezcla de ligación directa para la transformación.

Nota. Se mantuvo la mezcla de ligación a -20 °C. Se descongelo en hielo y se mezcló cuidadosamente antes de la transformación.

6.3.2. Células competentes CaCl₂

*Cultivo de células *E. Coli Top 10* en 5 ml de medio de cultivo LB (Luria Bertani).

*Se incubaron toda la noche a 37 °C a 250 rpm en un agitador Barnstead lab line maxq 4000 incubator shaker. A La cepa *E. Coli Top 10* sensible a ampicilina se sembró en medio LB con ampicilina.

*Del cultivo con LB sin ampicilina se tomaron 100 µl y resembraron en 10 ml de LB y fueron incubados por 3 horas a 37 °C y 250 rpm en agitador para obtener una D.O.=0.6-0.7 contra el control de ampicilina.

*Los 10 ml de cultivo fueron separados en 2 tubos de 15 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm a 4 °C por 5 min.

*Se lavó la pastilla con 350 µl de CaCl₂ (0.1 M).

*Se incubo por 30 min en hielo.

*Esto fue centrifugado a 12,000 rpm a 4° C por 10 minutos.

*Se decantó y resuspendió la pastilla en 100 µl de CaCl₂.

Nota: todo fue utilizado.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.3.3. Transformación

*Se añadió el plásmido con el producto ligado a las células *E coli Top 10* competentes.

*Se incubó la reacción en hielo por 30 min.

*Fue dado un choque térmico a 42° C por 1 min.

*Inmediatamente se transfirió la reacción a hielo por 3 min.

*Se agregó 1 ml de LB estéril.

*Fue incubado por una hora a 37 °C y centrifugado 250 rpm.

*Pasado este tiempo se tomaron 100 µl de cultivo y se prosiguió a cultivar (en una caja Petri con LB solidificado con agar).

*El cultivo restante se centrifugo a 3,000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y fue resuspendida la pastilla con 200 µl de LB estéril y se prosiguió a cultivar (en una caja Petri con LB solidificado con agar).

Nota: El cultivo fue rápido moviendo la placa de LB con agar, se tenía LB con antibiótico seleccionado en tubos de 15 ml y se colocó lo último de la reacción transformada.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.3.4. Extracción de plásmido por STET

Para hacer esta extracción fue necesario sembrar 5 ml de células *E.coli* TOP 10 de las colonias formadas en las placas de cultivo (células con el vector de clonación).

Se formó un botón de células por centrifugación a 12,000 rpm por 5 min.

Se lavaron las células con 300 μ l de STET y se centrifugó a 1,200 rpm por 1 min.

Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 350 μ l de STET y se adicionaron 25 μ l de lisozima (2 mg/ml), se dio agitación por 3 segundos, se incubó a 37 °C por 5 min.

Se inactivó la lisozima por ebullición durante 1 min. Y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min.

El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y estéril, se adicionó 1 μ l de ARNasa, se incubó a 37 °C por 15 min.

Se agregaron 75 μ l de Acetato de sodio 3 M y 250 μ l de isopropanol.

Se incubó a temperatura ambiente por 15 min y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min.

Fue eliminado el sobrenadante y se lavó el sedimento con 300 μ l de etanol al 70 % frío.

Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue desechado y se disolvió el sedimento con 50 μ l de agua destilada y libre de ADNasa.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

6.3.5. Detección del producto de PCR insertado en el plásmido

6.3.5.1. Por PCR punto final

Fue necesario hacer nuevamente una PCR y se utilizaron los mismos iniciadores que se ocuparon inicialmente, esto para comprobar que el fragmento insertado en el vector es el adecuado (Tabla 6).

Tabla 6	
Componente	Volumen
Master mix	12.5 μ l
Iniciador Sentido	1.0 μ l
Iniciador Anti sentido	1.0 μ l
Plásmido	1.0 μ l
Agua libre de nucleasas	9.5 μ l
Volumen total	25.0 μ l

6.3.5.2. Por enzimas de restricción

Se realizó una restricción y una doble restricción para asegurar que el fragmento insertado en el vector fuera el de un tamaño específico esperado.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

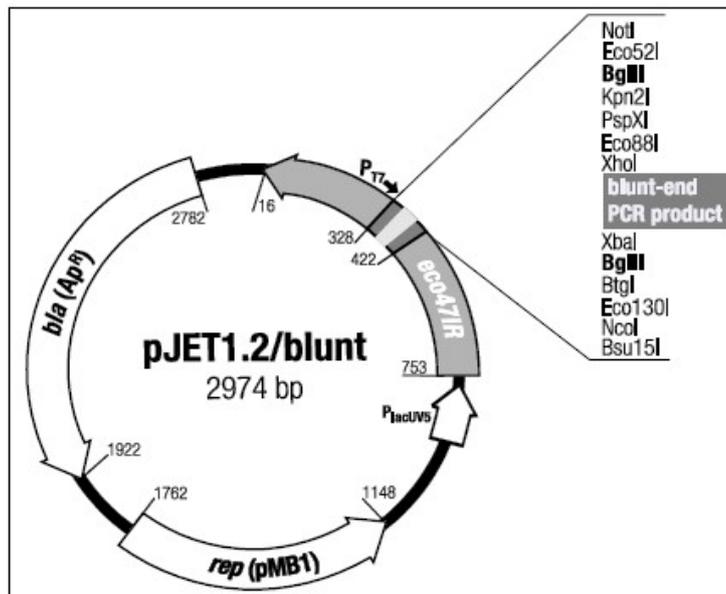


Figura 7. Vector de clonación Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning. El vector contiene un gen de restricción letal que se interrumpe por la ligadura de una inserción de ADN en el sitio de clonación. Contiene dos secuencias de reconocimiento de BglII que flanquean el sitio de inserción. Múltiples sitios de restricción.

El vector tiene sitios de restricción específicos. Y se utilizó la enzima BgLI para la doble restricción y XbaI para un solo corte.

Mezcla de reacción con BgLI para dos cortes (Tabla 7).

Tabla 7	
Componente	Volumen
Buffer	0.5 µl
Enzima BgLI	1.0 µl
ADN	1.0 µl
Agua	7.5 µl
Volumen total.	10.0 µl

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

Mezcla de reacción con Xbal para un corte (Tabla 8).

Tabla 8	
Componente	Volumen μL
Buffer.	0.5 μ l
Enzima Xbal	0.5 μ l
ADN	1.0 μ l
Agua	7.5 μ l
Volumen total.	10.0 μ l

6.4. Secuenciación de plásmidos

Cada uno de los 6 fragmentos obtenidos (SP. a1, SP. a2, SP_{final}, P, PX.a y PC/C) clonados en el plásmido pJet1.2/blunt del donador anti HBc (+) y HBsAg (-) fueron secuenciados. En el servicio de secuenciación CINVESTAV Irapuato, Guanajuato. Usando iniciadores del plásmido pJet1.2/blunt.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7. Resultados

7.1. Pares de iniciadores de las diferentes regiones VHB obtenidos por diseño

Los pares diseñados con el programa PerlPrimer v1.1.21 fueron 5 fragmentos grandes denominados (SP, P, PX, PCC y PS) y para 5 fragmentos menores que fueron obtenidos por PCR anidada denominados (Spa1, Spa2, Spa3, PXa y PS.a. Todos ellos se pueden observar en la (Tabla 9).

Tabla 9. Diseño de Iniciadores de las diferentes regiones VHB						
Nombre del fragmento.	Nombre de Fragmento anidado	Iniciador sentido	Nucleótido de inicio	Iniciador antisentido	Nucleótido de término	Tamaño del producto PCR
SP		PreS2.s	3129	PreS2.a(S P.a)	1071	1142
	SP.a1	SP.a1.s	1	SP.a1.a	384	384
	SP.a2	PS.a2.s	360	SP.a2a	1003	643
	SP _{final}	NF2.s	655	SP.a	1071	416
P		P.s	1039	P.a	1624	585
PX		PX.s	1386	PX.a	1880	414
	X.a	PX.a.s	1582	PX.a.a	1816	234
PC/C		PC/C. s	1775	PC/C	2476	701
PS1		PS1.s	2380	PS1.a	3215	825
	PS1.a	PS1.a.s	2402	PS.a.a	2888	486

En azul fragmentos que lograron ser visualizados por PCR a partir de una muestra anti HBc (+) y HBsAg (-).

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.2. Determinación de las temperaturas hibridación

7.2.1. Fragmento SP

Fragmento SP con un tamaño de 1142 pb la temperatura de hibridación seleccionada fue de 55.7 a 57.7 °C ya que no se observó formación de otros productos (Figura 8).

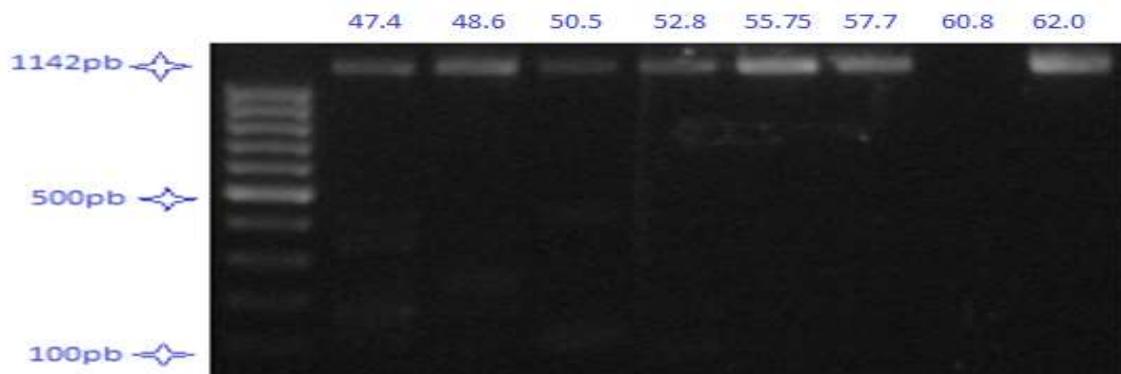


Figura 8 Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores PreS2.s y SP.a para obtener fragmento SP

7.2.2. Fragmento P

Fragmento P con tamaño de 585 pb la temperatura de hibridación seleccionada fue de 55.7 a 57.7 °C ya que no se observó formación de otros productos (a dichas temperaturas) (Figura 9).



Figura 9. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores P.s y P.a para fragmento P

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.2.3. Fragmento PX

Fragmento PX con tamaño de 414 pb la temperatura de hibridación seleccionada fue de 57.7 °C ya que no se observó formación de otros productos (Figura 10).

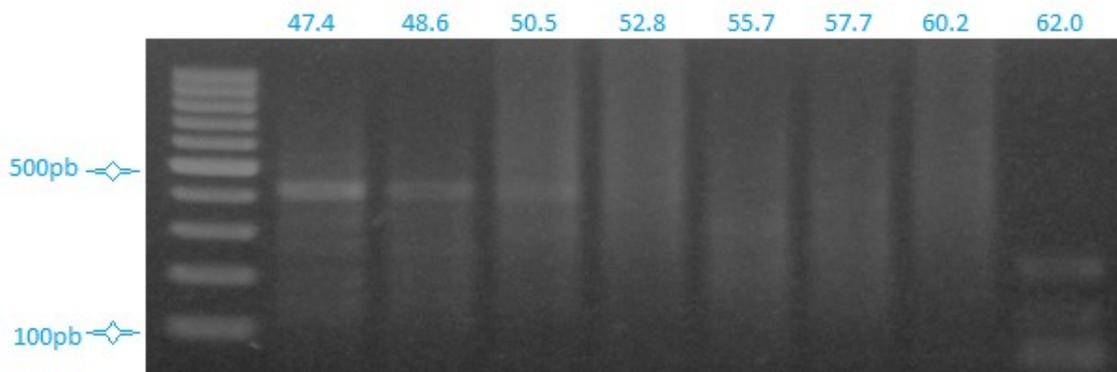


Figura 10. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores PX.s y PX.a para obtener fragmento PX

7.2.4. Fragmento PC/C

Fragmento PC/C con un tamaño de 701 pb la temperatura de hibridación seleccionada fue de 48.6 a 52.8°C en ninguna temperatura se observó subproductos (figura 11).



Figura 11. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores PC/C.s y PC/C.a para obtener el fragmento PC/C

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.2.5. Fragmento PS

Fragmento PS con un tamaño de 825 pb la temperatura de hibridación seleccionada fue de 48.6 °C y 52.8 °C a las temperaturas en las que no observaron subproductos no deseados (figura 12).



Figura 12. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores PS.s y PS.a para obtener el fragmento PS

7.3. Determinación de las temperaturas hibridación ideales para cada par de iniciadores en donador reactivo a anti-HBc y HBsAg no detectado

7.3.1. Fragmento SP

Fragmento SP con un tamaño de 1142 pb la temperatura de hibridación seleccionada fue de 55.7 °C a 57.7 °C no se obtuvo visualización del producto con la muestra del donador reactivo anti-HBc y HBsAg no detectado (figura 13).



Figura 13 Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores SPa y SPs para obtener el fragmento SP.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.3.2. Fragmento SP. a1

Fragmento SP. a1 de 384 pb se obtuvo a partir del producto 1142 pb no visualizado por UV. La temperatura de hibridación ideal fue de 55.7 °C a 57.7 °C. Inició en el nucleótido 1 y terminó en el 384 (figura 14).

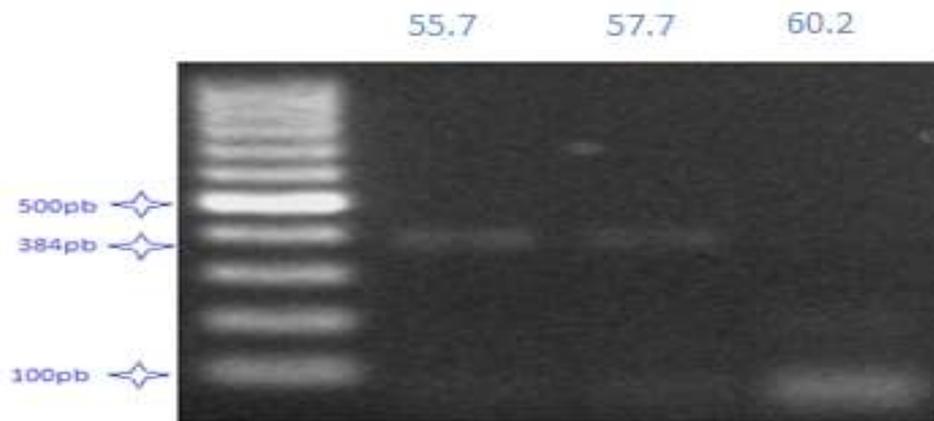


Figura 14. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores SP. a1.s y SP.a1.a para obtener el fragmento SP.a1.

7.3.3. Fragmento SP. a2

Fragmento SP. a2 de 643 pb se obtuvo a partir del producto 1142 pb no visualizado por UV. La temperatura de hibridación ideal fue de 55.7 °C, inicia en el nucleótido 360 y termina en el 1003 (figura 15).



Figura 15. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores SP. a2.s y SP.a2.a para obtener el fragmento SP.a2.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.3.4. Fragmento P

Fragmento P de 585 pb. La temperatura de hibridación ideal fue de 55.7 °C, inicia en el nucleótido 1039 y termina en el 1624 (Figura 16).

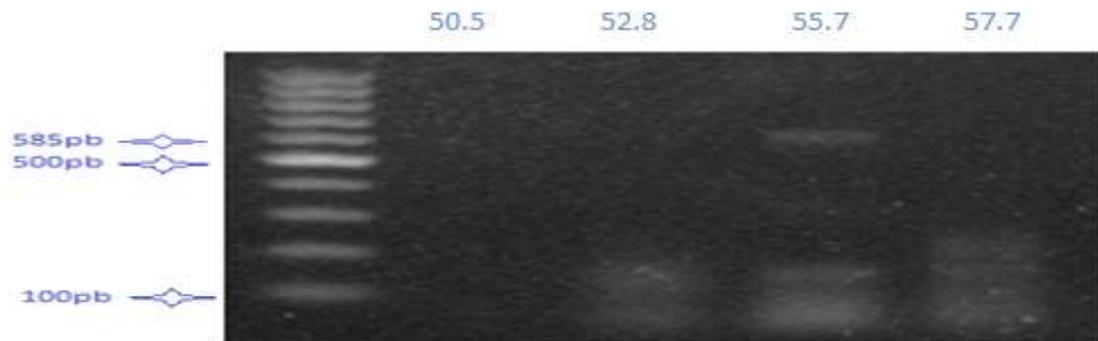


Figura 16. Gradiente de temperatura de hibridación para los iniciadores P.s y P.a en muestra de donador OBI

7.3.5. Fragmento SP_{final}

Para completar el fragmento faltante de nucleótidos 1004 a 1038 se usaron los iniciadores NF2.s y SP.a dando un producto de 417 pb iniciando en el nucleótido 655 y terminando en el 1071 al cual se le denominó SP_{final}. La temperatura de hibridación ideal fue de 57.7°C (figura 17).

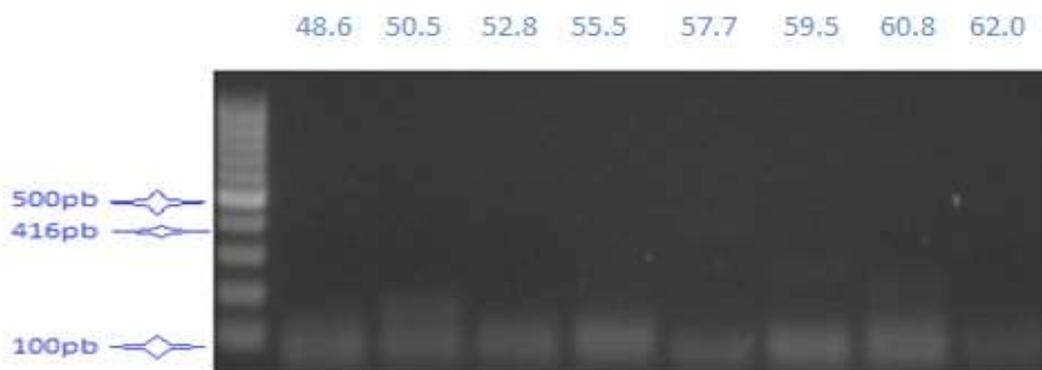


Figura 17. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores NF2.s y SP.a para obtener el fragmento SP_{final}

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.3.6. Fragmento PX

Fragmento PX de 414 pb no fue visualizado con luz UV, pero se obtuvo un fragmento de 234 pb a partir del producto de 414 pb no visualizado con los iniciadores PX.a.s y PX.a.a. Producto que inicio en el nucleótido 1582 y termino en el 1816. La temperatura de hibridación ideal fue a 52.8°C (figura 18).



Figura 18. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores PX.a.s y PX.a.a

7.3.7. Fragmento PC/C

Fragmento PC/C de 701 pb se obtuvo con los iniciadores PC/C.s y PC/C.a, la temperatura de hibridación seleccionada fue a 52.8°C. Inicia en el nucleótido 1775 y termina en el 2476 (Figura 19).



Figura 19. Gradiente de temperatura de hibridación de los iniciadores PC/C.s y PC/C.a para dar el fragmento PC/C.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.3.8. Fragmento PS

Fragmento PS con un tamaño de 825 pb no fue observado. Aún también con los iniciadores PS.a.s y PS.a.a para obtener un producto anidado de 486 pb que iniciaría en el nucleótido 2402 y termina en el 2888.

Por lo tanto, fue posible amplificar 2476 (77 %) nucleótidos de 3200 que es el tamaño del genoma del VHB.

7.4. Productos de PCR obtenidos del donador reactivo a anti HBc y HBsAg no detectado clonados en el Vector de clonación Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning

Se comprobó la inserción del fragmento correspondiente a cada región según el par de iniciadores utilizados. Por PCR usando los iniciadores de cada región y por enzimas de restricción. BglII para dos cortes y liberar el fragmento y XbaI para un corte y linearizar el plásmido.

7.4.1. Fragmento SPa1

Fragmento SPa1 de 384 pb clonado en Vector de clonación (figura 20).

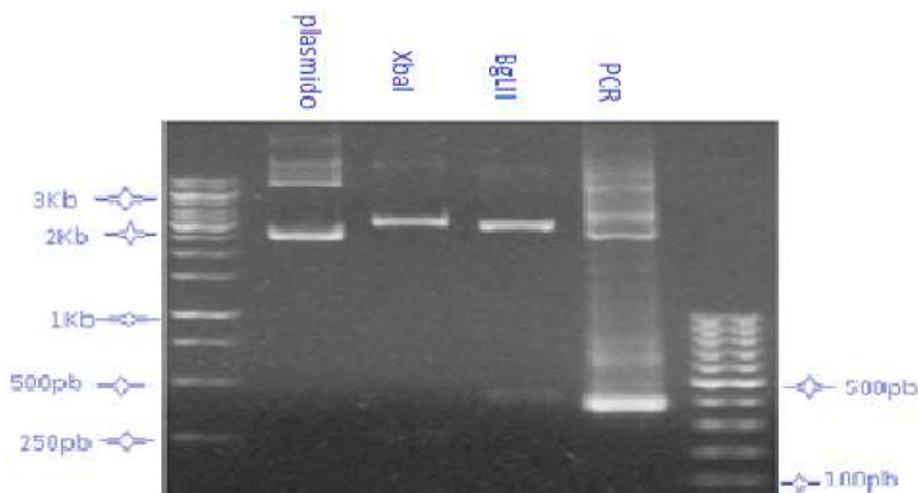


Figura 20. Plásmido con inserto de 384pb (carril 2), plásmido linearizado (carril 3), plásmido con producto liberado (carril 4), producto PCR 385pb (carril 5)

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.4.2. Fragmento SPa2

Fragmento SPa2 de 643 pb clonado en Vector de clonación (Figura 21).

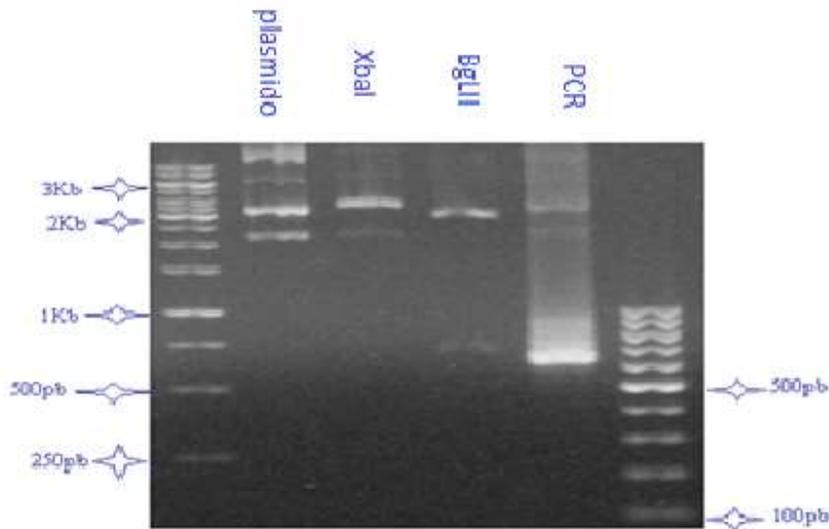


Figura21 Plásmido con inserto de 643pb (carril 2), plásmido linearizado (carril 3), plásmido con producto liberado (carril 4), producto PCR 643pb (carril 5)

7.4.3. SP_{final}

SP_{final} de 416 pb clonado en Vector de clonación (Figura 22).

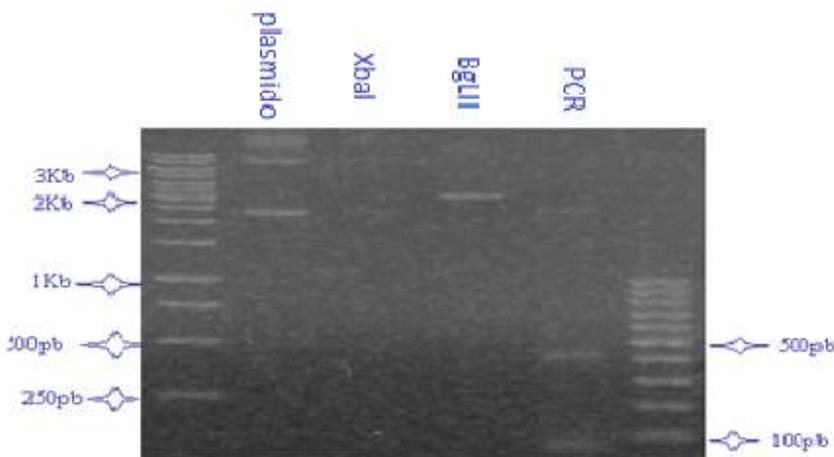


Figura22 Plásmido con inserto de 416 .pb (carril 2), plásmido linearizado (carril 3), plásmido con producto liberado (carril 4), producto PCR 416 pb (carril 5)

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.4.4. P

P de 585 pb clonado en Vector de clonación (Figura 23).

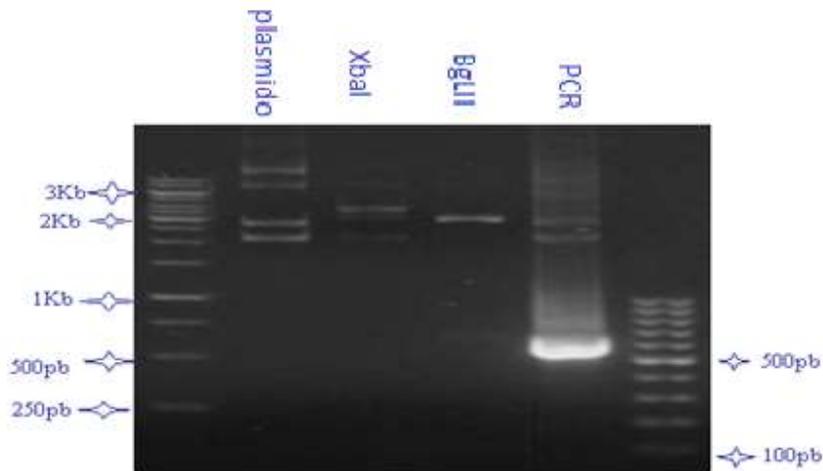


Figura23 Plásmido con inserto de 585 pb (carril 2), plásmido linearizado (carril 3), plásmido con producto liberado (carril 4), producto PCR 585 pb (carril 5)

7.4.5. X: Xa

X: Xa de 254 pb clonado en Vector de clonación (Figura 24).



Ilustración 24 Plásmido con inserto de 254pb (carril 2), plásmido linearizado (carril 3), plásmido con producto liberado (carril 4), producto PCR 254pb (carril 5)

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.4.6. PC/C

PC/C de 701 pb clonado en Vector de clonación (Figura 25).

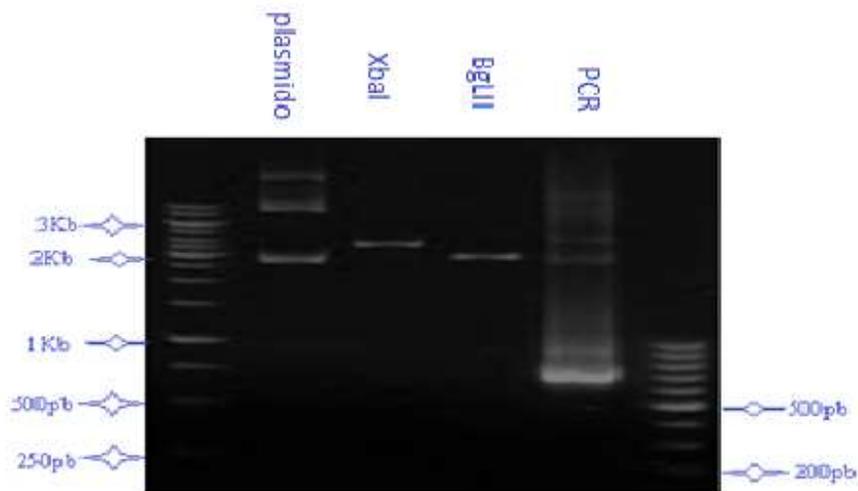


Figura25 Plásmido con inserto de 701pb (carril 2), plásmido linearizado (carril 3), plásmido con producto liberado (carril 4), producto PCR 701pb (carril 5)

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.5. Secuencia nucleotídica de ADN VHB obtenida de un donador de sangre con OBI

Se obtuvieron 2,474 nucleótidos (77.2%) de 3215 nucleótidos que tiene el genoma VHB, basándose en la secuencia nucleotídica HM 117850.2 recuperada de un paciente reactivo a anti HBc y HBsAg (Figura 26).

>700 (donador OBI)

```
ctcaacacag ttccaccaag cactgctgga tccgagagta aggggtctgt attttcctgc
tgggtggctcc agttcagaaa cacagaaccc tgctcogact attgcctctc tcacatcatc
aatcttctcg aagactgggg tccctgttat gaacatggag aacatcacat caggactcct
aggaccctt ctctgtttac aggcgggtgtg tttcttgttg acaaaaatcc tcacaatacc
acagagtcta gactcgtggt gcacttctct caatcttcta ggggtactac ccgggtgtcc
tggccaaaat tcgcagtccc caatctccaa tcaact-acca atct-ctgtc ctccaacttg
tcctggctat cgttggatgt gtctgcggcg ttttatcatc ttc-tcttc- tcctgctgct
atgcctcatc ttcttgttgg ttcttctgga ctatcaaggt atgttgcccg tgtgtcctct
acttccagga tcaacaacca ccagcacggg accctgcaaa acctgcacca ctcttgetca
aggaacctct atgtttccct cctgctgctg taccaaacct tcggacggaa attgcacctg
tattcccatc ccatcatctt gggctttcgg aaaataccta tgggagtggg cctcagcccg
tttctcttgg ctcaagttac tagtgcaatt tgttcagtgg tgcgtagggc tttccccac
tgtctggctt ttagttatat ggatgatttg gtattggggg ccaaatctgt gcagcatctt
gagtcccttt ataccgctgt taccaatctt ttgttatctg tgggcatcca tttgaacaca
gctaaaacaa aaaggtgggg ttattcctta cactttatgg gttatgtaat tgggagtggg
gggacctgac ctcaaggagca tattgtgcat aaaatcaaag attgctttcg caaacttccc
gtgaatagac ccattgattg gaaggtttgg caacgcattg tgggtctttg ggctttgcag
cccctttcac tcaatgtggt tatcctgctc tcaatgccct gtatgcctgt attaccgcta
agcaggcttt tgttttctcg ccacttaaa ggccaggcct ttgccaagtg tttgctgacg caacccccac
tggtctggggc ttggcgattg gccatcagcg catgcggggg acctttgtgt ctctctgccc
gatccatact gcggaactcc tagcggcttg tttcgtctgc agcgggtctg gagcggacat
tatcggcact gacaactccg ttgtcctttc tcggaagtac acctccttcc catggctgct
aggctgcgct gccaaactgga tctcgcgcgg gacgtccttt gtctacgtcc cgtcggcget
gaatcctgcg gacgaccctt ctctgtggtcg cttggggctc taccgccctc ttctccgcct
gccgttccgg ccgacgacgg gtcgcacctc tctttacgcg gactcccctc ctgtgccttc
tcatctgccg gcccggtgtc acttgccttc acctctgcac gtcgcatgga gaccaccgtg
aacgcccctt tggacttgcc aacaacctta cataagagga ctcttgactc ttcgccccag
tcaatgacct ggattgagga atacatcaaa gactgtgtat ttaaggactg ggaggagtca
ggggaggagt tgagggttaa ggtctttgta ttaggaggct gtaggcataa attggtctgt
tcaccggttc catgtaactt tttcacctct gcctaatact cttctgttca tgtcctactg
ttcaagcctc caagctgtgc cttgggtggc tttggggcat ggacattgac ccttataaag
aatttgagc ttctgtggag ttactctcat ttttgctgtg tgacttcttc cgtctgccc
gggacctgct cgacaccgct acagccctct acagagatgc cttagaatca cccgaacatt
gctcccccca ccatactgct ctcaaggcaat ctatcttctg ctgggggtgag ttgatgactt
tggcttctctg ggtgggcaat aatttagagg atcctgcagc aagagatcta gtagttaatt
atgtcaatac tcacatgggc ctaaaaatta gacaattatt atggtttcat ctttctgca
```

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

ttatgtttg aagagaaact gtgcttgagt atttggtgtc ttttgagtg tggattcgca
ctccacctgc ttatagacca gcaaatgccc ctatocctatc aacacttccg gagactactg
ttattagaca acgaagcagg gcccctagaa gaagaactcc ctgcctcgc agacgaagat
ctcaatcacc gcgtcgcaga agatctcaat ctocctgctc ccaatgtag tattccttgg
actcataagg tggg 2474

Figura 26: Secuencia de nucleótidos obtenida a partir de un donador de sangre reactivo a anti HBc y HBsAg no detectado.

7.6. Alineamiento y comparación de secuencia de nucleótidos

Secuencia donador OBI y la secuencia HM117850.2 (pacientes reactivos a anti HBc y HBsAg) (figura 27).

1	CTCAACACAGTTCACCAAGCACTGCTGGATCCGAGAGTAAGGGGTCTGTATTTTCCTGC	60
1	CTCAACACAGTTCACCAAGCACTGCTGGATCCGAGAGTAAGGGGTCTGTATTTTCCTGC	60
61	TGGTGGCTCCAGTTCAGAAACACAGAACCCCTGCTCCGACTATTGCCTCTCACATCATC	120
61	TGGTGGCTCCAGTTCAGAAACACAAAACCCTGCTCCGACTATTGCCTCTCACATCATC	120
121	AATCTTCTCGAAGACTGGGGTCCCTGTTATGAACATGGAGAACATCACATCAGGACTCCT	180
121	AATCTTCTCGAAGACTGGGGACCCTGCTATGAACATGGAGAACATCACATCAGGACTCCT	180
181	AGGACCCCTTCTCGTGTACAGGGGTGTGTTTCTTGTGACAAAAATCCTCACAAATACC	240
181	AGGACCCCTTCTCGTGTACAGGGGTGTGTTTCTTGTGACAAAAATCCTCACAAATACC	240
241	ACAGAGTCTAGACTCGTGGTGCACCTTCTCTCAATTTCTAGGGGTACTACCCGGGTGTCC	300
241	ACAGAGTCTAGACTCGTGGTGCACCTTCTCTCAATTTCTAGGGGTACTACCCGGGTGTCC	300
301	TGGCCAAAATTCGCAGTCCCAATCTCCAATCACTACCAACTCTCTGTCTCCAACTTG	358
301	TGGCCAAAATTCGCAGTCCCAATCTCCAATCACTACCAACTCTCTGTCTCCAACTTG	360
359	TCCTGGCTATCGTTGGATGTGTCTGCGGCGTTTATCATCTTCTCTTCCTCTCATCTCTGCT	416
361	TCCTGGCTATCGTTGGATGTGTCTGCGGCGTTTATCATCTTCTCTTCCTCTCATCTCTGCT	420
417	ATGCCTCATCTTCTTGTGGTCTTCTTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTGTCTCTCT	476
421	ATGCCTCATCTTCTTGTGGTCTTCTTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTGTCTCTCT	480
477	ACTTCCAGGATCAACAACCACCAGCACGGGACCCTGCAAACCTGCACCACCTTTGCTCA	536
481	ACTTCCAGGATCAACAACCACCAGCACGGGACCCTGCAAACCTGCACCACCTTTGCTCA	540
537	AGGAACCTCTATGTTTCCCTCCTGCTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTG	596
541	AGGAACCTCTATGTTTCCCTCCTGCTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTG	600
597	TATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGGAAAATACCTATGGGACTGGGCCTCAGCCCG	656
601	TATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGGAAAATACCTATGGGACTGGGCCTCAGCCCG	660
657	TTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCAATTTGTTTCAGTGGTGCCTAGGGCTTCCCCAC	716
661	TTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCAATTTGTTTCAGTGGTGCCTAGGGCTTCCCCAC	720
717	TGTCTGGCTTTTAGTTATATGGATGATTGGTATGGGGGCCAAAATCTGTGCAGCATCTT	776
721	TGTCTGGCTTTTAGTTATATGGATGATTGGTATGGGGGCCAAAATCTGTGCAGCATCTT	780
777	GAGTCCCTTTATACCGCTGTACCAATTTTGTATCTGTGGGCATCCATTTGAACACA	836
781	GAGTCCCTTTATACCGCTGTACCAATTTTGTATCTGTGGGCATCCATTTGAACACA	840
837	GCTAAACAAAAAGTGGGGTTATTCCTTACACTTTATGGGTATATAATTGGGAGTTGG	896
841	GCTAAACAAAAAGTGGGGTTATTCCTTACACTTTATGGGTATATAATTGGGAGTTGG	900

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

897 GGGACCTTGCTCAGGACCATATTGTGCATAAAATCAAAGATTGCTTTCGCAAACCTCCC 956
901 GGGACCTTGCTCAGGACCATATTGTGCATAAAATCAAAGATTGCTTTCGCAAACCTCCC 960
957 GTGAATAGACCCATTGATTGGAAGGTTTGTCAACGCATGTGGTCTTTGGGCTTTGCA 1015
961 GTGAATAGACCCATTGATTGGAAGGTTTGTCAACGCATGTGGTCTTTGGGCTTTGCA 1020
1016 GCCCCTTACTCAATGTGGTTATCCTGCTCTCATGCCCTTGATGCCTGTATTACCGCT 1075
1021 GCCCCTTACTCAATGTGGTTATCCTGCTCTCATGCCCTTGATGCCTGTATTACCGCT 1080
1076 AAGCAGGCTTTGTTTTCTCGCCACTTACAAGGCCTTCTGTCAACAATACATGAAC 1134
1081 AAGCAGGCTTTGTTTTCTCGCCACTTACAAGGCCTTCTGTCAACAATACATGAAC 1140
1135 CTTTACCCTGTTGCTCGGCAACGGCCAGGCCTTTGCCAAGTGTGCTGACGCAACCC 1194
1141 CTTTACCCTGTTGCTCGGCAACGGCCAGGCCTTTGCCAAGTGTGCTGACGCAACCC 1200
1195 ACTGGCTGGGCTTGGCATTGGCCATCAGCGCATGCGCGGACCTTTGTGCTCCTCTG 1254
1201 ACTGGCTGGGCTTGGCAATTGGCCATCAGCGCATGCGCGGACCTTTGTGCTCCTCTG 1260
1255 CCGATCCATACTGCGGAACCTCCTAGCGGCTTGTTCGCTCGCAGCGGTCTGGAGCGGAC 1314
1261 CCGATCCATACTGCGGAACCTCCTAGCAGCTTGTTCGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCGGAC 1320
1315 ATTATCGGCACTGACAACTCCGTTGTCTTTCTCGGAAGTACACCTCCTCCCATGGCTG 1374
1321 ATTATCGGCACTGACAACTCCGTTGTCTTTCTCGGAAGTACACCTCCTCCCATGGCTG 1380
1375 CTAGGCTGCTGCTGCAACTGGATCCTGCGCGGACGTCTTTGTCTACGTCCCGTGGCG 1434
1381 CTAGGCTGCTGCTGCAACTGGATCCTGCGCGGACGTCTTTGTCTACGTCCCGTGGCG 1440
1435 CTGAATCCTGCGGACGACCCTCTCGTGGTCTGTTGGGCTCTACCGCCCTTCTCCGC 1494
1441 CTGAATCCTGCGGACGACCCTCTCGTGGTCTGTTGGGCTCTACCGCCCTTCTCCGC 1500
1495 CTGCCGTTCCGGCCGACGACGGGTGCGACCTCTCTTTACGCGGACTCCCGCTGTGCCT 1554
1501 CTGCCGTTCCGGCCGACGACGGGTGCGACCTCTCTTTACGCGGACTCCCGCTGTGCCT 1560
1555 TCTCATCTGCCGGCCGTGTGCACTTCGCTTACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACG 1614
1561 TCTCATCTGCCGGCCGTGTGCACTTCGCTTACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACG 1620
1615 TGAACCGCCCTTGGACTTGCACAACCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTTTCGCC 1673
1621 TGAACCGCCCTTGGACTTGCACAACCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTTTCGCC 1679
1674 CAGTCAATGACCTGGATTGAGGAATACATCAAAGACTGTGATTTAAGGACTGGGAGGAG 1733
1680 CAGTCAATGACCTGGATTGAGGAATACATCAAAGACTGTGATTTAAGGACTGGGAGGAG 1739
1734 TCAGGGGAGGAGTTGAGGTTAAAGTCTTTGTATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTC 1793
1740 TCAGGGGAGGAGTTGAGGTTAAAGTCTTTGTATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTC 1799
1794 TGTTCACCGGTTCCATGTAACCTTTTACCTCTGCCTAATCATCTTCTGTTCATGTCC 1853
1800 TGTTCACCGGTTCCATGTAACCTTTTACCTCTGCCTAATCATCTTCTGTTCATGTCC 1859
1854 CTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGGCATGGACATTGACCCTATA 1913
1860 CTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGGCATGGACATTGACCCTATA 1919
1914 AAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTACTCTCATTTTGGCTGTGACTTCTCCCGTCTG 1973
1920 AAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTACTCTCATTTTGGCTGTGACTTCTCCCGTCTG 1979
1974 CCGGGACCTACTCGACACCGCTTACAGCCTCTACAGAGATGCCTTAGAATCACCCGAC 2033
1980 CCGGGACCTACTCGACACCGCTTACAGCCTCTACAGAGATGCCTTAGAATCACCCGAC 2039
2034 ATTGCTCCCCCACCATACTGCTCTCAGGCAACTATTTTGTGCTGGGGTGGAGTTGATGA 2093
2040 ATTGCTCCCCCACCATACTGCTCTCAGGCAACTATTTTGTGCTGGGGTGGAGTTGATGA 2099
2094 CTTGGCTTCTGGTGGGCAATAATTTAGAGGATCCTGCAGCAGAGATCTAGTAGTTA 2153
2100 CTTGGCTTCTGGTGGGCAATAATTTAGAGGATCCTGCAGCAGAGATCTAGTAGTTA 2159
2154 ATTATGTCAATACTACATGGGCCATAAATTAGACAATTATATGGTTTCATCTTTCCT 2213
2160 ATTATGTCAATACTACATGGGCCATAAATTAGACAATTATATGGTTTCATCTTTCCT 2219
2214 GCATTATGTTTGAAGAGAACTGTGCTTGGTGTCTTTGGAGTGTGGATTC 2273
2220 GCATTATGTTTGAAGAGAACTGTGCTTGGTGTCTTTGGAGTGTGGATTC 2279

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

```

2274 GCACTCCACCTGCTTATAGACCAGCAAATGCCCTATCCTATCAACACTCCGGGAGACTA 2333
2280 GCACTCCACCTGCTTATAGACCACCAAATGCCCTATCCTATCAACACTCCGGGAGACTA 2339
2334 CTGTTATTAGACAACGAAAGCAGGGCCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAA 2393
2340 CTGTTATTAGACAACGAAAGCAGGGCCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAA 2399
2394 GATCTCAATCACC CGTCGCAGAAGATCTCAATCTCCAGCTTCCCAATGTTAGTATTCCT 2453
2400 GATCTCAATCACC CGTCGCAGAAGATCTCAATCTCCAGCTTCCCAATGTTAGTATTCCT 2459
2454 TGGACTCATAAGGTGGG 2470
2460 TGGACTCATAAGGTGGG 2476
  
```

Figura 27. Alineamiento de secuencias estudiadas y detección de 67 mutaciones entre ellas.

7.7. Comparación de secuencias de aminoácidos

7.7.1. Comparación de secuencias de aminoácidos de proteína Small HBsAg

Secuencia HM117850.2

Secuencia donador OBI

```

MENITSGLLG PLLVLQAVCF LLTKILTIPQ SLDSWQTSLN FLGVPPGCPG QNSQSPISNH LPISCPPTCP 70
MENITSGLLG PLLVLQAVCF LLTKILTIPQ SLDSWWTSLN FLGVPPGCPG QNSQSPISNH LPTSCPPTCP 70
GYRWMCLRRF IIFLFILLLC LIFLLVLLDY QGMLPVCPLL PGSTTTSTGE CKTCTTLAQG TSMFPSCCCT 140
GYRWMCLRRF IIFLFILLLC LIFLLVLLDY QGMLPVCPLL PGSTTTSTGE CKTCTTLAQG TSMFPSCCCT 140
KPSDGNCTCI PIPSSWAFGK YLWEWASARF SWLSLLVQFV QWCVGLSPTV WLLVLWMIWY WGNLCSILS 210
KPSDGNCTCI PIPSSWAFGK YLWDWASARF SWLSLLVQFV QWCVGLSPTV WLLVMWMIWY WGNLCSILS 210
PFIPLLPIFC YLWASI 226
PFIPLLPIFC YLWASI 226
  
```

Región de doble loop 99 a 169aa

Determinante a 121 a 149aa

Figura 28. En amarillo diferencias encontradas: W36C, T63I, D164E, M195I. Diferencias documentadas no encontradas: G145A, K122R, M103I

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.7.2. Comparación de secuencias de aminoácidos de proteína Middle protein pre-S2/S

Secuencia donador OBI
Secuencia HM 117850.2

```

MLDPRVRGL YFPAGGSSSE TQNPAPTIAS LTSSIFSKTG VPMNMENIT 60
MQWNSTQFHQ ALLDPRVRGL YFPAGGSSSE TQNPAPTIAS LTSSIFSKTG DPAMNMENIT 60
SGLLGPLLQ AVCFLLTKIL TIPQSLDSWC TSLNFLGVLP GCPGQNSQSP ISNHLPTSCP 120
SGLLGPLLQ AVCFLLTKIL TIPQSLDSW TSLNFLGVLP GCPGQNSQSP ISNHLPTSCP 120
PTCPGYRWMC LRRFIIFLFI LLLCLIFLLV LLDYQGMLPV CPLLPSTTT STGPCKTCTT 180
PTCPGYRWMC LRRFIIFLFI LLLCLIFLLV LLDYQGMLPV CPLLPSTTT STGPCKTCTT 180
LAQGTSMFPS CCCTKPSDGN CTCIPISSW AFGKYLWEWA SARFSWLSLL VQFVQVCVGL 240
LAQGTSMFPS CCCTKPSDGN CTCIPISSW AFGKYLWDWA SARFSWLSLL VQFVQVCVGL 240
SPTVWLLVIW MIWYWGPNLC SILSPFIPLL PIFCYLWASI 280
SPTVWLLVMW MIWYWGPNLC SILSPFIPLL PIFCYLWASI 280

```

Figura 29: En amarillo diferencias encontradas: L12M, D51V, A53V, W90C, P97L, T107I, D218E

7.7.3. Comparación de secuencias de aminoácidos de la proteína antígeno core (HBcAg)

Secuencia donador OBI
Secuencia HM 117850.2

```

MDIDPYKEFG ASVELLSFLP VDFFPSARDL LDTATALYRD ALESPEHCSP HHTALRQSIL 60
MDIDPYKEFG ASVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRD ALESPEHCPT NHTALRQAIL 60
CWGELMTLAS WVGNNLEDPA ARDLVNYVN TMGLKIRQL LWFHLSCTMF GRETVLEYLV 120
CWGELMTLAS WVGNNLEDPA ARDLVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV 120
SFGVWIRTPP AYRPNAPIL STLPETTVIR QRGRAPRRRT PSPRRRSQS PRRRSQSPA 180
SFGVWIRTPP -YRPNAPIL STLPETTVVR QRGRAPRRRT PSPRRRSQS PRRRSQSPA 180
SQC 183
SQC 183

```

Figura 30. En Amarillo diferencias encontradas: S21D, V27A, S35T, T49S, N50H, A58S, N92H, I105L, L108I, T109M, P135A, V149I, G153S.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

7.7.4. Comparación de secuencias de aminoácidos de la proteína X

Secuencia donador OBI

Secuencia HM 117850.2

```

MAARLRCQLD PARDVLCRLP VGAESCGRPL SWSLIGALPPS SPPAVPADDG SHLSLRGLPS CAFSSAGPCA 70
MAARLRCQLD PARDVLCRLP VGAESCGRPL SWSLIGALPPS SPPAVPADDG SHLSLRGLPA CAFSSAGPCA 70
LRFTSARRME TTVNRLD-LP TTLHKRTLGL SPQSMTWIEE YIKDCVFKDW EESGEELRLK VFVLGGCRHK 140
LRFTSARRME TTVNAPWNL P TTLHKRTLGL SPRSTTWIEE YIKDCVFKDW EESGEELRLK VFVLGGCRHK 140
LVCSPVPCNF FTSA 154
LVCSPA PCNF FTSA 154
  
```

Figura 31. En amarillo diferencias encontradas: C6R, F34L, A60S, A85R, A86L, W87D, N88-, R103Q, A146V 0

7.7.5. Comparación de secuencias de aminoácidos de proteína polimerasa3

Secuencia HM117850.2

Secuencia donador OBI

```

341
MI-NLLEDWG PCYEHGEHHI RTPRTPSRVT GGVFLVDKNP HNTTESRLVV HFSQFSRGTT RVSWPKFAVP 410
HI-NLLEDWG PCYEHGEHHI RTPRTPSRVT GGVFLVDKNP HNTTESRLVV DFSQFSRGTT RVSWPKFAVP 410
NLQSLTNLLS SNLSWLSLDV SAAFYHLPLH PAAMPHELLVG SSGLSRYVAR VSSTSRIYNH QHGTLQNLHH 480
NLQSLTNLLS SNLSWLSLDV SAAFYHLPLH PAAMPHELLVG SSGLSRYVAR VSSTSRIYNH QHGTLQNLHH 480
SCSRNLYVSL LLLYQTFGRK LHLYSHPIIL GFRKIPMGVG LSPFLLAQFT SAICSVVRRR FPHCLAFSYM 550
SCSRNLYVSL LLLYQTFGRK LHLYSHPIIL GFRKIPMLG LSPFLMAQFT SAICSVVRRR FPHCLAFSYV 550
DDLVLGAKSV QHLESLYTAV TNFLLSVGIH LNTAKTKRWG YSLHFMGYVI GSWGTLPQEH IVHKIKDCFR 620
DDLVLGAKSV QHLESLYTAV TNFLLSVGIH LNTAKTKWVG YSLHFMGYII GSWGTLPQEH IVHKIKDCFR 620
KLPVNRPIDW KVCQRIVGLL GFAAPFTQCG YPALMPYAC ITAKQAFVFS PTYKAFLCQQ YMNLYPVARQ 690
KLPVNRPIDW KVCQRIVGLL GFAAPFTQCG YPALMPYAC ITAKQAFVFS PTYKAFLCQK YMNLYPVARQ 690
RPGLCQVFAD ATPTGWGLAI GHQRMRTFV SPLPIHTAEL LAACFARSS GADIIGTDNS VVLSRKYTSF 760
RPGLCQVFAD ATPTGWGLAI GHQRMRTFV APLPIHTAEL LAACFARSS GADIIGTDNS VVLSRKYTSF 760
PWLGCANW ILRGTSFVYV PSALNPADDP SRGRGLYCRP LLRLPFRPTT GRTSLYADSP PVPSHLPARV 830
PWLGCANW ILRGTSFVYV PSALNPADDP SRGRGLICRP LLRLPFRPTT GRTSLYADSP PVPSHLPARV 830
HFASPLHVAW RPP 843
HFASPLHVAW RPP 843
  
```

Figura 32. En amarillo diferencias encontradas: H341M, I343-, D391H, L519V, M526L, V550M, W588R, I598V, K679Q, L682M, A721S, R739G, L797Y

8. Discusión

El principal propósito de este estudio fue obtener el genoma del virus de la hepatitis B a partir del plasma de un donador de sangre reactivo a anti HBc y HBsAg no detectado el cual cumplió con los criterios para una Occult hepatitis B Infection (OBI) que se caracteriza por la presencia de ADN del VHB en sangre o tejido hepático, con proteína antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) no detectable, y con o sin anticuerpos a la proteína antígeno core de la hepatitis B (anti HBc) o anticuerpos contra la proteína antígeno de superficie de la hepatitis B (anti HBs) [33]. Otra característica de las OBI es la carga viral muy baja como de 11-25 UI/mL [35] y de 100 – 800 copias/MI [36]. El genotipo VHB predominante en población mexicana es el H seguido de los genotipos G, F y D [33].

Considerando las características anteriores, los iniciadores fueron diseñados a partir de 8 secuencias completas del VHB obtenidas en Gene Bank, dos de las cuales correspondieron a pacientes con OBI (AB516393.1) y la (AB516394.1) ambas del genotipo H. Las secuencias más conservadas fueron las ideales para el diseño de los iniciadores que dieron origen a las regiones que denominamos SP (1142 pb), P (585 pb), PX (414 pb), PC/C (701 pb) y PS (825 pb) las cuales se traslapan entre sí.

Los pares de iniciadores fueron probados con el ADN viral de un donador de sangre reactivo a los marcadores serológicos anti HBc y HBsAg, y con una carga viral de Log 8.84 copias /ml. Se obtuvo la amplificación de los 5 fragmentos arriba mencionados donde estuvieron contenidos los 4 genes del genoma VHB (Fig. 28 a Fig. 32).

Considerando la muy baja carga viral que tienen los individuos con OBI sustituimos a la ultra centrifugación, utilizando la precipitando las partículas virales presentes en el plasma con polietilenglicol [37].

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

La región SP (1078 pb) del donador OBI se obtuvo a partir de que ésta que no fue observada en el gel con luz UV y solamente se obtuvo con productos anidados denominados SP. a1 (384 pb) (Fig. 14), SP. a2 (643 pb) (Fig. 15), SP_{final} (416 pb) (Fig.17). Así también fue obtenida como la región PX (414 pb) a partir de esta que no fue observada en el gel con luz UV, pero se obtuvo PX.a (254 pb) (Fig.18). Las regiones que denominamos P (585 pb) (Fig.16) y PC/C (701 pb) (Fig.19) se obtuvieron sin productos anidados.

Los 6 productos de PCR fueron clonados en Vector de clonación Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning (Fig.20 a Fig.25) y posteriormente secuenciados. Se editó y ensambló el genoma y obtuvimos 2,474 nucleótidos (77.3%) de los 3,215 (100%) que tiene el genoma de VHB. Por lo tanto, aproximadamente obtuvimos el 80% del gen S, 75% del gen P, 100% del gen PC/C y 100% del gen X.

Fueron comparadas la secuencia de nucleótidos denominada donador OBI (2,474 nucleótidos) y la secuencia nucleotídica obtenida de Gene Bank HM 117850.2 (3,215 nucleótidos) de un paciente reactivo a ambos marcadores serológicos anti HBc y HBsAg. Fueron detectadas 67 (2.70%) diferencias entre los dos genomas, un porcentaje muy similar encontrado en otros estudios entre secuencias de un mismo genotipo [38]. La diferencia de nucleótidos entre genotipos del VHB es del 8%.

El gen S da lugar a 3 proteínas denominadas Large HBsAg (345 aa), Middle HBsAg (281aa) y Small HBsAg (226aa) esta última contiene un doble loop denominado “determinante a” cuyas mutaciones están relacionada con resistencia a la inmunoterapia,

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

escape a la protección vacunal y con defectos en la detección del HBsAg mediante sistemas de inmunoensayo comercial [39]. La secuencia de nucleótidos del “determinante a” abarca del nucleótido 520 al 640 y en la Small HBsAg entre los aminoácidos 121 al 149 (Fig. 28). En las secuencias de aminoácidos donador OBI y HM 117850.2 no fueron detectadas ninguna de las tres mutaciones M103I, K122R y G145A asociadas a una falla en la detección del HBsAg en pruebas diagnósticas [40]. Las diferencias encontradas entre las dos fueron W36C, T63I, D164E y M195I ninguna de ellas reportada previamente.

Con la traducción *in silico* también obtuvimos la proteína Middle HBsAg (288aa) fueron comparadas las dos secuencias de aminoácidos donador OBI y HM 117850.2 se encontraron 7 diferencias: L12M, D51V, A53V, W90C, P97L, T107I, D218E. En la proteína antígeno core (HBcAg) se detectaron 13 diferencias: S21D, V27A, S35T, T49S, N50H, A58S, N92H, I105L, L108I, T109M, N92H, P135A, V149I, G153S. En la proteína X se detectaron 9 diferencias: C6R, F34L, A60S, A85R, A86L, W87D, N88-, R103Q, A146V y con la proteína Polimerasa de la cual obtuvimos *in silico* el 59 % (502 aa) se detectaron 13 diferencias: H341M, I343-, D391H, L519V, M526L, V550M, W588R, I598V, K679Q, L682M, A721S, R739G, L797Y-. Todas las diferencias detectadas en las 5 proteínas analizadas ninguna ha sido reportada previamente. Las diferencias encontradas quizá alguna o algunas sean determinantes con los defectos en la detección del HBsAg mediante sistemas de inmunoensayo comercial y con la muy baja carga viral con la que cursa las OBI. Faltan más secuencias que analizar para establecer si alguna o algunas son determinante en las características que tienen las OBI.

9. Referencias.

1. Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ. 1986. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology.*; 25(1): 14-29.
2. Venegas M, Villanueva A, Brahm J. 2010. Variabilidad genética del virus Hepatitis B y su significado clínico. *Rev Hosp Clín Univ Chile*; 154 – 61.
3. Schaefer S. 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol.*; 13(1):14-21.
4. Liang TJ. 2009 Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology.* May; 49(5 Suppl):S13-21. doi: 10.1002/hep.22881
5. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis.* 2004; 24 Suppl 1:3-10.
6. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F.2014. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol.*; 20(23):7152-68.
7. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 2005; 12: 111-124.
8. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* 2007 Jan 7; 13(1):48-64.
9. Caruntu FA, Molagic V. 2005. CccDNA persistence during natural evolution of chronic VHB infection. *Rom J Gastroenterol.*; 14(4):373-7.
10. Shan Gao, Zhong-Ping Duan, Carla S Coffin. 2015. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J Hepatol.*; 7(8): 1086–1096.
11. Cubides,Victor Idrovo. 2007 Hepatitis por virus B.,22 (2); 0120-9957. *Revista Colombiana de Gastroenterología.* vol 22, pp 111-117

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

12. Sánchez L., Panduro A., 2005. Genómica y proteómica del virus de las hepatitis B. Investigación en salud. Vol. VII. 12-17.
13. Lavanchy D. 2005. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. J Clin Virol. ; 34 Suppl 1:S1-3
14. Wolfram H Gerlich. 2013. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. Virol J.; 10: 239.
15. Jaspe H, et al. 2009. Infección residual del virus de la hepatitis B en pacientes virus de inmunodeficiencia humana en Venezuela. Rev Panam Infectol .27- 32.
16. Panduro A, Escobedo Meléndez G, Fierro NA, Ruiz Madrigal B, Zepeda-Carrillo EA, Román S. 2011. Epidemiology of viral hepatitis in Mexico. Salud Pública Mex.; 53 Suppl 1:S37-45.
17. W. Hwang E, Ramsey Cheung. 2011. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. North American Journal of Medicine and Science. Vol 4 No.1
18. Catherine MN Croagh, Paul V Desmond, Sally J Bell. 2015. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. World J Hepatol; 7(3): 289–303.
19. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC.2008 Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. J Med Virol. ; 80(1):27-46.
20. Jasmine Samal, Manish Kandpal, Perumal Vivekanandan. 2012. Molecular Mechanisms Underlying Occult Hepatitis B Virus Infection. Clin Microbiol Rev.; 25(1): 142–163.
21. Martínez Méndez, Dilia Karina; Barboza, Luisa; Hernández Valles, Rosaura C. 2007. Genotipos de Hepatitis B: Importancia clínica Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol. 27, núm. 1, pp. 430-437

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

22. Roman S, Tanaka Y, Khan A, Kurbanov F, Kato H, Mizokami M, Panduro A. 2010. Occult hepatitis B in the genotype H-infected Nahuas and Huichol native Mexican population. *J Med Virol.*; 82(9):1527-36.
23. Zohreh SHARIFI. 2014. Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection Based on Laboratory Testing. *Iran J Public Health*; 43(7): 990–993.
24. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. 2008. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.*; 48(2):335-52.
25. Thomas Mina, Samad Amini-Bavil-Olyaei, Frank Tacke, Piet Maes, Marc Van Ranst, Mahmoud Reza Pourkarim. 2015. Genomic Diversity of Hepatitis B Virus Infection Associated with Fulminant Hepatitis B Development. *Hepat*; 15(6): e29477.
26. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. 1991. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 324: 1705–1709
27. Chu CM. 2000. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.*; 15 Suppl: E25-30.
28. Gill US, Kennedy PT. 2015. New insights in the management of chronic hepatitis B. *Clin Med.*; 15(2):191-6.
29. Idrovo V., Suárez C., Álvarez P. 2009. Epidemiología e historia natural de la hepatitis B. *Rev Col Gastroenterol v. 24 supl. 1 Bogotá mar.*
30. Rapti I, Hadziyannis S. 2015. Risk for hepatocellular carcinoma in the course of chronic hepatitis B virus infection and the protective effect of therapy with nucleoside analogues. *World J Hepatol.*; 7(8):1064-73.
31. Marcellin P, Castelnau C, Martinot-Peignoux M, Boyer N. 2005. Natural history of hepatitis B. *Minerva Gastroenterol Dietol.*; 51(1):63-75.

32. Sánchez D., Nogales A., 2009. Interpretación de la serología en las hepatitis virales. JANO. 39-44.
33. Garcia-Montalvo BM, Ventura-Zapata LP. 2011. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico. Ann Hepatol.;10(2):133-41
34. Giovanni Squadrito, Rosaria Spinella, and Giovanni Raimondo. 2014. The clinical significance of occult HBV infection. Ann Gastroenterol.; 27(1): 15–19.
35. Allain JP, Cox L. 2011 Challenges in hepatitis B detection among blood donors. Curr Opin Hematol.;18(6):461-6.
36. Stramer SL, Zou S, Notari EP, Foster GA, Krysztof DE, Musavi F. 2012. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? Transfusion.;52(2):440-6.
37. Sanyal D, Kudesia G and CorbitT G.1991. Comparison of ultracentrifugation and polyethylene glycol precipitation for concentration of hepatitis B virus (HBV) DNA for molecular hybridisation tests and the relationship of HBV DNA to HBe antigen and anti-HBe status. J. Med. Microbiol, 35: 291-293
38. Hannoun C, Hoarl P. Lindh M. 2000. Long-tern mutation rates in the hepatitis B virus genome. J Gen Virology, 81:75 – 83.
39. Martin CM, Welge JA, Rouster SD, Shata MT, Sherman KE, Blackard JT. 2012. Mutations associated with occult hepatitis B virus infection result in decreased surface antigen expression in vitro. J Viral Hepat. ; 19(10):716-23.
40. González R , Echevarria JM, Avellón A, Barea L, Castro E. 2006 Acute hepatitis B virus window-period blood donations detected by individual-donation nucleic acid testing: a report on the first two cases found and interdicted in Spain. Transfusion.;46(7):1138-42.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

ANEXOS

PEG 6000 30 %.

Buffer tris imidazol.

Disolver 2.38 gr de HEPES en 90 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 7.4 con Tris-HCl 1.7 M (disolver 20.59 gr de Tris-HCl en 100 ml de agua).

Disolver 3.4 gr de IMIDAZOL añadir 90 ml de buffer HEPES-Tris, ajustar el Ph 7.4 con HCl y aforar a 100ml.

MEDIO DE CULTIVO LB.

Se disolvió en agua destilada 10 gr Triptona, 5gr Extracto de levadura y 10 gr NaCl, se aforo a un volumen total de 1000 ml. Posteriormente se trasvasó a tubos Falcón, un volumen de 5 ml por tubo y se esterilizo por autoclave. (no todo el volumen fue agregado a tubos falcón ya que parte del medio LB fue utilizado para las placas de cultivo de bacterias)

PLACAS DE CULTIVO.

A 500 ml de medio LB liquido se le agregaron 5 gr de agar y este se hirvió hasta ser disuelto. Fue necesario esterilizar por autoclave. Se dejó enfriar a menos de 42 °C y se le agrego antibiótico (ampicilina) y se agregó aproximadamente 30 ml de medio en cada caja Petri previamente esterilizadas.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

TAE 50X (TAE .5X)

Preparar una solución madre de EDTA.

La solución EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) se prepara antes de tiempo. EDTA no se quedará completamente en la solución hasta que el pH se ajusta a aproximadamente 8,0. Para una solución de 500 ml madre de 0.5 M EDTA, pesar 93.05 gr de sal EDTA disódico (FW = 372.2). Disolver en 400 ml de agua desionizada y ajustar el pH con NaOH. Rellenar la solución a un volumen final de 500 ml.

Prepare una solución madre de TAE.

Haga una solución concentrada (50x) de TAE pesando 242 gr de base Tris (FW = 121.14) y disolver en aproximadamente 750 ml de agua desionizada. Añadir cuidadosamente 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0) y ajustar la solución a un volumen final de 1 litro. Esta solución madre se puede almacenar a temperatura ambiente. El pH de este tampón no se ajusta y debe ser de aproximadamente 8.5.

Preparar una solución de trabajo de TAE.

La solución de trabajo de tampón TAE 0.5x se hace simplemente por dilución de la solución stock de 50x en agua desionizada. El tampón está ahora listo para su uso en la solución de un gel de agarosa .

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

CaCl₂ 0.1 M

ACETATO DE SODIO 3M.

NaC₂H₃O₂

BUFFER HEPPEES TRIS IMIDAZOL 500 Mm

STET

Reactivos.

-Tris-HCL (Ph 8.0) 10 Mm - 1 ml Tris-HCL (1 M)

-Na Cl 10 Mm -2.5 ml NaCl (4 M)

-EDTA (Ph 8.0) 1 Mm -0.4 ml EDTA (0.025 M)

-Triton X-100 -5 ml

-Agua desionizada -c.b.p 10 ml.

Asegurese que el pH sea 8.0 despues de añadir todas las soluciones. No hay necesidad de esterilizar el STET antes de su uso.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

ABREVIATURAS

μL: microlitro

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALT: alanina aminotrasnferasa

Anti HBc: Anticuerpo contra antígeno c

Anti HBe: Anticuerpo contra antígeno e

Anti HBs: Anticuerpo contra antígeno

CHB:

CR ADN: AND circular relajado

D.O.: Densidad óptica

HBcAg: Proteína viral de la cápside

HBeAg:

HBIG: Inmuno globulina especifica de la hepatitis b

HBsAg(L): proteína viral de superficie Large

HBsAg(M): proteína viral de superficie Middle

HBsAg(S): proteína viral de superficie Small

HBsAg: antígeno s del virus b

HBsAg: antígeno s del virus b

HBx: proteína X

HCC-Carcinoma hepatocelular

ICTV.

ARN m: ARN mensajero

ARN: Ácido ribonucleico

ARNs: ARN subgenomico

cccADN: ADN circular cerrado covalentemente

INF-a:interferón alfa

INF-b: interferón beta

INF-g: interferon gama

KDa:kilodaltons

LB: Luria Bertani

M: molar

ml:mililitro

nm: nanómetros

OBI: Occult hepattis B infection

pb:pares de bases

PBC: Región Promotora Basal Core

pgARN: ARN pregenómico

PT: proteína terminal de la polimerasa

Rpm: Revoluciones por minuto

STET

TA: Temperatura de alineamiento

TNF- a-factor de necrosis tumoral alfa

TR: Dominio Transcriptasa Reversa de la polimerasa.

UV: Ultra violeta

VHB- Virus de la Hepatitiis B

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.

Aminoácidos esenciales.

[Ala \(A\)](#)GCU, GCC, GCA, GCG. [Lys \(K\)](#)AAA, AAG. [Arg \(R\)](#)CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG. [Met \(M\)](#)AUG. [Asn \(N\)](#)AAU, AAC. [Phe \(F\)](#)UUU, UUC. [Asp \(D\)](#)GAU, GAC. [Pro \(P\)](#)CCU, CCC, CCA, CCG. [Cys \(C\)](#)UGU, UGC. [Sec \(U\)](#)UGA. [Gln \(Q\)](#)CAA, CAG. [Ser \(S\)](#)UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC. [Glu \(E\)](#)GAA, GAG. [Thr \(T\)](#)ACU, ACC, ACA, ACG. [Gly \(G\)](#)GGU, GGC, GGA, GGG. [Trp \(W\)](#)UGG. [His \(H\)](#)CAU, CAC. [Tyr \(Y\)](#)UAU, UAC. [Ile \(I\)](#)AUU, AUC, AUA. [Val \(V\)](#)GUU, GUC, GUA, GUG. [Leu \(L\)](#)UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG. [Comienzo](#) AUG. [Parada](#) UAG, UGA, UAA.

Obtención del genoma completo del VHB a partir de individuos reactivos a Anti HBc Y HBsAg no detectado.