

Caracterización genotípica del virus de la hepatitis B en la provincia de La Rioja

Romero, N. (1) Tello Roldán, E. D. (2)

Genotype characterization of hepatitis B virus infection in the province of La Rioja

Abstract

The genetic variability is a characteristic common in all the virus. The virus of the B hepatitis (VHB) is a virus DNA with a variability that oscillates in a change by each 1,000 to 100,000 nucleotides incorporated by each replicative cycle. This genetic variability must to errors of the repairing activity of enzymes in charge of this process, transcriptasas inverse, during the process of viral replication. At present, the viral stocks of the VHB are classified in 8 genotypes designated with the letters A-H, each genotype has a differentiated prevalence very world-wide. In the present work the circulating genotypes in the city of La Rioja (150 samples) by means of the RFLP technique. We found up to 94% of cases, genotype F, which was described as originating in Amerindian communities in Central and South America. This prevalence may be because in the city of La Rioja be recorded genetic ancestors originated.

Key words: Virus, Hepatitis B, Oligonucleotides, PCR

Resumen

La variabilidad genética es una característica común en todos los virus. El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus ADN con una variabilidad genética que oscila en un cambio por cada 1.000 a 100.000 nucleótidos incorporados por cada ciclo replicativo. Esta variabilidad genética es debida a errores de la actividad reparadora de las enzimas encargadas de este proceso, las transcriptasas inversas, durante el proceso de replicación viral. En la actualidad, las cepas virales del VHB se clasifican en 8 genotipos designados con las letras A-H, cada genotipo tiene una prevalencia muy diferenciada mundialmente. En el presente trabajo se analizaron los genotipos circulantes en la ciudad de La Rioja (150 muestras) mediante la técnica de RFLP. Se encontró hasta en un 94 % de los casos, el genotipo F, que fue descrito como originario de las comunidades amerindias de América Central y del Sur. Esta prevalencia se debería a que en la ciudad de La Rioja se registrarían ancestros genéticos originarios.

Palabras clave: Virus, Hepatitis B, Oligonucleótidos, PCR.

1-Laboratorio de Nanodiagnóstico. Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CENIIT). Universidad Nacional de La Rioja (UNLaR). Av. Luis Vernet y Apóstol Felipe. La Rioja (5300). nahuelromero@yahoo.com.ar.

2- Laboratorio de Anatomía Patológica. Hospital Escuela y de Clínicas "Virgen María de Fátima". Universidad Nacional de La Rioja.

Introducción

El virus de la Hepatitis B (VHB), es un virus DNA de doble hebra parcial, semicircular, con envoltura, perteneciente a la familia *Hepadnaviridae*. Cada año el VHB infecta de 10 a 30 millones de personas en todo el mundo (WHO 2010).

El VHB es un hepadnavirus, cuyo virión completo (partícula de Dane) es de doble envoltura, esférico y de 42 nm de diámetro. La envoltura externa está compuesta por una bicapa lipídica obtenida por gemación de la membrana celular del hepatocito durante el ciclo replicativo del virus y glicoproteínas de la envoltura viral: Grande L (Large), Mediana M (Middle) y Pequeña o principal S (Small) (Pujol 2000, Martínez et al. 2007). El virus de la hepatitis B infecta básicamente las células hepáticas. Sin embargo, otras células del cuerpo, incluyendo los glóbulos blancos y otros tejidos, pueden albergar al VHB (Hallet et al. 2000, Magnius & Norder 2010).

Como todos los seres vivos, los virus pueden pasar por mutaciones o cambios en su estructura celular mientras se multiplican millones de veces. Aunque el VHB es un virus de ADN, sus instrucciones de replicación provienen de la enzima polimerasa, que es un compuesto del ARN (Mantilla 2000). Su proceso de replicación (similar al del virus VIH) carece de una "función de corrección" común en otras células. Como resultado, el VHB tienen un índice de mutación diez veces más alto que el de otros virus del ADN. Las mutaciones que se han identificado hasta el momento, ocurren en la región central del VHB (región promotora del núcleo o gen pre-núcleo) y también en el antígeno de superficie (Chacón & Aponte 2000). Algunas de las cepas mutantes con mutaciones en la región central son denominadas cepas mutantes pre-núcleo. Los VHB que no tienen ninguna mutación se denominan virus de "tipo silvestre". En algunos niños y adultos, el mutante del pre-núcleo se convierte en la forma dominante del VHB en sus cuerpos durante el transcurso de unos años. Sin embargo, algunas personas están claramente infectadas desde el principio con virus en el cual el mutante del pre-núcleo es la forma viral dominante (Carman et al. 2003). Las mutaciones del pre-núcleo, que tienen componentes faltantes o alterados en su huella genética, pueden hacer que al sistema inmunológico de un niño le sea difícil detectar y combatir el virus (Koike & Takada 2009). Estas mutaciones también pueden hacer que el virus sea resistente a determinadas drogas antivirales, como el interferón. Las mutaciones virales también pueden determinar la rapidez con que un niño o adulto puede desarrollar el anticuerpo (Lee 1998). Otra cepa mutante permite al virus replicarse sin producir o secretar el antígeno. Esto tiende a ocurrir más en personas de Asia y de la región Mediterránea, pero puede predisponer a las personas a infecciones por VHB crónicas o de largo plazo. El segundo grupo de mutaciones, antes mencionado, se produce en el antígeno de superficie (Brunetto 1999). Estos virus mutados, originalmente denominados mutantes escapatorios de vacuna, son preocupantes ya que el actual proceso de detección en la sangre no alcanza a detectar este antígeno de superficie alterado (Bowyer & Sim 2000). Hasta la fecha, estas mutaciones rara vez ocurren y se presentan principalmente en Asia. Las mutaciones descritas en el VHB

son de diferentes tipos, cada una de las cuales tiene una aproximación clínica diferente y para las cuales existen hoy en día ensayos comerciales para su estudio: mutantes pre-core/core promotor; mutantes resistentes a terapia (gen Pol); mutantes del antígeno de superficie, asociadas a vacuna (gen S). Las dos primeras se han relacionado con mayor daño hepático, menor respuesta y/o alta replicación viral (Günther & Fischer 1999).

Con la creciente disponibilidad de diferentes alternativas de tratamiento contra el VHB, nuevos ensayos moleculares van adquiriendo mayor relevancia, especialmente para la detección precoz de mutantes resistentes. En los años 70 se describió, por métodos serológicos, la existencia de cuatro subtipos AgsHB según la expresión del determinante antigénico común "a": adw, adr, ayw, ayr. Años después se identificaron cuatro subdeterminantes de w (1, 2, 3 y 4) y posteriormente se adiciona el determinante q, dividiéndose en q-positivos (+) y q-negativos (-); así, se establece la variabilidad serológica a nivel del AgsHB y se clasifican en nueve subtipos diferentes para el determinante antigénico común "a": adw2, adw4, adr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayrq+, ayrq-. Esta clasificación serológica prevaleció por años, hasta que en la década de los 80 se estableció la distribución geográfica de estos subtipos y se obtuvo la secuencia genómica completa de los aislados del VHB, observándose sustituciones múltiples a lo largo del genoma (Okamoto & Tsuda 1988). Análisis posteriores de secuencias completas demostraron la emergencia de otras diferencias en los subtipos aislados del VHB cuyas sustituciones genómicas basadas en una divergencia del 8% o más entre secuencias del genoma completo y de 4% o más del gen S, hicieron necesaria la clasificación genética del VHB distribuyéndolos en 8 genotipos denominados: A, B, C, D, E, F y G; el genotipo F se ha dividido a su vez en IV conglomerados basándose en la existencia de más del 4% de divergencia en la secuencia nucleotídica. Estudios recientes, han descrito un amplio rango de divergencia entre los genotipos descritos (0,1 a 7,4% y 6,8 a 17,1% respectivamente) por lo que se ha propuesto considerar este hallazgo como un nuevo genotipo denominado "H" sumando los 8 genotipos diferentes para el VHB; hecho considerado como un importante logro de la virología descriptiva (Devesa et al. 2004, Arauz-Ruiz 2002, Quintero et al. 2002).

El genotipo A se encuentra principalmente en Norteamérica, el Noroeste de Europa y en África Central. El genotipo B se encuentra principalmente en el Sudeste de Asia, China y Japón (Berger et al. 2008). El genotipo C se encuentra principalmente en el Sudeste de Asia, China y Japón. El genotipo D se encuentra en el Sur de Europa, en Medio Oriente e India. El genotipo E se encuentra principalmente en África (Nassal 1999). El genotipo F se encuentra principalmente en americanos nativos de Norteamérica y en la Polinesia, y en Sudamérica y Centroamérica. El genotipo G, el último genotipo del VHB identificado, se encontró en Estados Unidos y Francia. Existe una fuerte correlación entre raza/origen étnico y el genotipo del VHB (Hino & Kajino 2009).

Materiales y métodos

Extracción de ADN

Se utilizó 5ml de sangre total de cada una de las 150 muestras y se agregó 2 ml de solución de Lisis (NaCl 0,14 M, acetato de magnesio 1,5 mM, KCl 5 mM y dodecil sulfato sódico al 1%) y 2 ml de FCI (25:24:1 partes de fenol/cloroformo/isoamílico cada uno respectivamente). Se agitó vigorosamente durante 15 segundos y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Luego de la fase acuosa se extrajeron 2 ml y se le agregaron 0,2 ml de acetato sódico 3 M, homogenizando suavemente por inversión. Se añadieron 5 ml de etanol absoluto, centrifugando a 3500rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante por inversión y una vez escurrido el sobrenadante se agregó 100 ul de TE pH 7,5, durante 24hs en la estufa a 37°C.

Diagnóstico Serológico

Los diagnósticos se realizaron por test serológicos que reconocen el antígeno de superficie y el anticore IgM, utilizando para ello la técnica de inmunoanálisis enzimático de micropartículas a través del sistema IMX (ABBOTT Diagnostics Division).

Reacción de PCR

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100, MJ Research, programado de la siguiente manera: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 53 °C por 60 segundos y 72 °C por 90 segundos. Finalmente 1 ciclo extensión final a 72 °C por 7 minutos. La composición de la reacción de PCR fue de 20 µl determinada por: 1X de Buffer Green GoTaq™ ADN polimerasa (Promega), 2 mM de MgCl₂ (Promega), 100 µM de una mezcla de dNTPs (Promega), 0,2 µM de cada oligonucleótido, 0,05 U/µl de GoTaq™ Polimerasa

(Promega), 30 ng de ADN y agua ultrapura (GIBCO). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Biodynamics S.R.L (Argentina). Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis a 90 voltios durante 1 hora 35 minutos en geles al 1,2% de agarosa D1-LE (Biodynamics) preparados con TBE (13,5 g Tris Base; 5,5 g de H₃BO₃, 4 ml de 0,5 M de EDTA pH 8).

Una vez concluida esta etapa, el gel fue fotografiado con un equipo de fotodocumentación dotado con un transiluminador UV (Gel Doc 100 Gel Documentation System, Bio-Rad) y cuya imagen fue digitalizada para su posterior análisis con un programa de análisis molecular (Molecular Analysis de BIO-RAD). Los secuenciamientos se realizaron en ambas hebras de ADN (Magrogen).

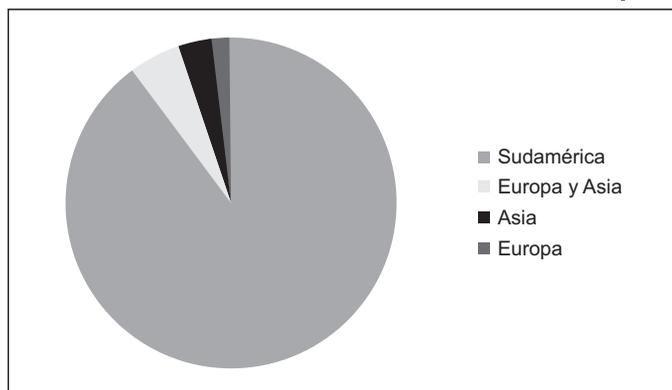
Genotipificación de VHB mediante RFLP

HinfI: Se agregó 12,5 ul del producto de PCR de VHB, junto con 1,5 ul de Buffer 10x y 1 ul de enzima Hinf I. La mezcla se incubó a 37° durante 3 horas. Tsp 590I: Se agregó 12,5 ul del producto de PCR de VHB, junto con 1,5 ul de Buffer 10x y 1 ul de enzima Tsp 590I. La mezcla se incubó a 37° durante 3 horas. Los productos de las digestiones enzimáticas fueron procesados en una electroforesis de gel de agarosa al 3% a 90 V durante 1 hora.

Resultados

Distribución de Genotipos del VHB en la Provincia de La Rioja

Se analizaron 150 muestras de pacientes con VHB positivos recolectados en la Provincia de La Rioja. El estudio mostró que el 94% de los sueros (141 muestras) correspondían al genotipo F, descripto para las comunidades de Sudamérica, en tanto un 3% (4 muestras) correspondía al genotipo C, localizado originalmente en Asia. Un 2% (3 muestras) correspondían al genotipo D, descripto en Europa y Asia y un 1% (2 muestras) fueron del genotipo A de Europa.



Genotipo	Ubicación
A	Europa
B	Asia
C	Asia
D	Europa y Asia
E	Africa
F	Sudamérica
G	Norteamérica
H	Oriente

Fig.1- Gráfico y tabla donde se muestran los diferentes genotipos encontrados para las 150 muestras de la ciudad de La Rioja. Genotipo F, de Sudamérica. Genotipo C, de Asia. Genotipo D de Europa y Asia, y Genotipo A de Europa.

Discusión

Hay aproximadamente 2000 millones de personas infectadas por el virus, y cerca de 350 millones con hepatopatía crónica. Alrededor de 600.000 personas mueren cada año por las consecuencias graves de la hepatitis B. (WHO 2010). Cerca de un millón de muertes al año están relacionadas con hepatocarcinoma primario asociado a la infección por VHB, lo que hace a este virus la cuarta causa de muerte por enfermedades infecciosas a nivel mundial (Lindh et al. 2007). La replicación del VHB posee un potencial de variabilidad genética mayor que la de los virus ADN en general favoreciendo la aparición de mutantes naturales generadas por sustituciones puntuales, por reordenamiento de genes, o por cambios en los marcos de lectura denominados genotipos (Coursaget et al. 2009). La variabilidad genética podría estar asociada con las diferentes vías de transmisión, resistencia al interferón o progresión hacia el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Castro et al. 2003). La epidemiología molecular ofrece herramientas de indudable importancia en el estudio de la infección por el VHB (hibridación molecular, secuenciación genómica y la reacción en cadena de la polimerasa) que permiten establecer las características de los genomas del VHB que circulan tanto en las poblaciones heterogéneas como en las étnicamente definidas, aportando así datos importantes sobre la evolución viral (Telenta et al. 2007). Estas herramientas han permitido elaborar teorías sobre el origen y la evolución del VHB y otros hepadnavirus. Si se estima que el paso de los primeros pobladores del Nuevo Mundo a través del estrecho de Bering ocurrió hace 10.000-30.000 años, es posible que durante ese tiempo hayan emergido los nuevos genotipos del VHB a partir de la cepa progenitora del actual genotipo F, propia del continente Americano, por lo que se ha propuesto que el VHB es originario de este continente, ocurriendo posiblemente, una división posterior entre las cepas B y C por un lado y las cepas A, D y E por el otro (Blitz et al. 2008). La teoría desarrollada luego de la formación del árbol filogenético basado en la caracterización molecular de las secuencias de genomas completos del VHB revelan una amplia divergencia del genotipo F con los otros genotipos (Blitz et al. 2006). El estudio de las variantes genéticas del VHB es uno de los temas de mayor actualidad en el campo de la virología, puesto que ha permitido establecer la distribución geográfica característica de cada uno de ellos evidenciándose que el genotipo A se encuentra principalmente en el viejo mundo (abarcando la costa norte y sur del Mediterráneo) y en algunos aislados de Estados Unidos; los genotipos B y C se reportaron en poblaciones del Sudeste Asiático y en países Árabes; el genotipo D se encuentra ampliamente distribuido por el mundo; el genotipo E en poblaciones del continente Africano; el genotipo F es descrito en poblaciones del continente Americano, sobre todo en poblaciones aborígenes, proponiéndose la posibilidad de que sea originario de las Américas. El genotipo G, descrito en poblaciones de Estados Unidos. El genotipo H, recientemente descrito, propuesto de comunidades de Oriente (Ponce et al. 2004, Del Nunzio et al. 2007, Castro et al. 2010).

Por todo lo planteado, se hace necesario continuar con los estudios sistemáticos del comportamiento de estos genotipos virales, no solo desde el punto de vista molecular, clínico o terapéutico sino también desde el punto de vista de la genética poblacional. Estos estudios permitirán en un futuro comparar las actuales y nuevas vacunas para saber el grado de protección según la zona y su genotipo predominante.

Agradecimientos

El proyecto fue financiado en su totalidad por el Programa "Estancia Científicas UNLaR 2011-2012". Agradecemos a las máximas Autoridades de la Universidad Nacional de La Rioja, Prof. Dr. Enrique Daniel Nicolás Tello Roldán y Prof. Dr. Sergio Eduardo Martín por incentivar y apoyar el desarrollo Científico y Tecnológico. Agradecemos el permanente apoyo y seguimiento recibido por parte de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNLaR.

Referencias

- Arauz-Ruiz, P.; Norder, H.; Robertson, B.H.; Magnius, L.O. 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83: 2059-73.
- Berger, A.; Doerr, H.; Weber, B. 2008 Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus Infection in Pregnancy: Diagnostic Potential of Viral Genome Detection. *Intervirology* 2008; 41:201-7.
- Bowyer, S.; Sim, J. 2000. Relationship Within and Between Genotypes of Hepatitis B Virus At Points Across the Genome: Footprints of Recombination in Certain Isolates. *J Gen Virol* 2000; 81 (2): 379-92.
- Blitz, L.; Monsalve, F.; Atencio, R.; Porto, L.; Monzon, M.; Faradov, M.; Pujol, F.; Echevarría, J. 2006 Serological Survey of Markers of Infection With Viral Hepatitis Among the Yukpa Amerindians From Western Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006; 90 (6): 655-7.
- Blitz, L.; Pujol, F.; Swenson, P.; Porto, L.; Atencio, R.; Araujo, M. y col. 2008. Antigenic Diversity of Hepatitis B Virus Strains of Genotipo F in Amerindians and Other Population Group From Venezuela. *J Clin Microbiol*. 2008; 36 (3): 648-51.
- Brunetto, M.; Aragon, U.; Bonino, F. 1999. Hepatitis B Virus Mutans. *Intervirology* 1999; 42: 69-80.
- Carman, W.; Thomas, H.; Domingo, E. 2003. Viral Genetic Variation: Hepatitis B Virus as a Clinical Example. *Lancet* 2003; 341: 349-52.

- Castro, D.; Arvelo, H.; Cisternas, J. 2003. Estructura de población y factores influyentes en dos pueblos negros venezolanos. *América Negra* 2003; 5:37-47.
- Castro, D.; Arvelo, H.; Rodríguez, A.; Salzano, F. 2010. Genetic Study in Panaquire, a Venezuelan Population. *Hum Hered*, 2010. 46. 323-8.
- Coursaget, P.; Yvonnet, B.; Bourdil, C.; Mevelec, M.N.; Adamowicz, P.; Barres, J.L.; Chotard, J.; N'Doye, R.; Diop Mar, I.; Chiron, J.P. 2009. HBsAg Positive Reactivity in man not due to hepatitis B virus. *Lancet* 2009; 12(2(8572))1354-8.
- Chacón, P.; Aponte, C. 2000. Marcadores serológicos en las Hepatitis Virales. *Acta Cient Soc Ven Bioanal Esp* 2000; 6 (1-2): 53-65.
- Del Nunzio, J.; Brito, J.; Brazón, S.; Carpio, C.; Ledezma, E.; Pujol, F. 2007. Prevalencia de marcadores serológicos para Hepatitis B y C en pacientes Gestantes del Hospital Universitario "Dr. Luis Razetti" de Barcelona, estado Anzoátegui. *GEN*. 2007; 51: 226-9.
- Devesa, M.; Rodríguez, C.; León, G.; Liprandi, F.; Pujol, F. 2004. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. *J Med Virol* 2004; 72(3): 377-84.
- Günther, S.; Fischer, L. 1999. Naturally Occuring Variants of Hepatitis B Virus. *Adv Virus Res* 1999; 52:25-137.
- Hallet, R.; Clewley, J.; Teo, C. 2000. The Molecular Characterization of a Divergent TTV Genome. *Antiviral Ther* 2000; 5 (Suppl.1) pp G.10.
- Hino, O.; Kajino, K. 2009. Hepatitis Virus Related Hepatocarcinogenesis. *Intervirology*. 2009; 37: 133-5.
- Koike, K.; Takada, S. 2009. Biochemistry and Functions of Hepatitis B Virus X Protein. *Intervirology* 2009; 38: 89-99.
- Lee, W. 1998. Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med* 1998; 337:1733-45.
- Lindh, M.; Andersson, A.; Gusdal, A. 2007. Genotypes, nt 1858 Variants, and Geographic Origin of Hepatitis B Virus—Large Scale Analysis Using a New Genotyping Method. *J Infect Dis*. 2007; 175: 1285-93.
- Magnius, L.; Norder, H. 2010. Subtypes, Genotypes and Molecular Epidemiology of the Hepatitis B Virus as Reflected by Sequence Variability of the S-Gene. *Intervirology*. 2010; 38: 24-34.
- Mantilla, P. 2000. Diagnóstico Clínico de las Hepatitis. *Acta Cient Soc Ven Bioanal Esp* 2000; 6 (1-2): 66-79.
- Martínez Méndez, D. K.; Barboza, L. and Hernández Valles, R. C. 2007. Genotipos de Hepatitis B: Importancia clínica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 2007, vol.27, no.1, p.349-363.
- Nassal, M. 1999. Hepatitis B Virus Replication: Novel Roles for Virus – Host Interactions. *Intervirology*; 42: 100-16.
- Okamoto, H.; Tsuda, F. 1988. Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-83.
- Ponce, J.; Cárdenas, L.; García, F.; León, G.; Blitz-Dorfman, L.; Monsalve, F.; Pujol, F. 2004. Alta Prevalencia de Marcadores de Hepatitis B y C en una Comunidad de Indigentes de Caracas, Venezuela. *Invest Clin*. 2004; 35 (3): 123-9.
- Pujol, F. 2000. Biología de los Virus de Hepatitis. *Acta Cient Soc Ven Bioanal Esp* 2000; 6 (1-2):5-12.
- Quintero, A.; Martínez, D.; Alarcón de Noya, B.; Costagliola, A.; Urbina, L.; González, N. y col. 2002. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Afro-Venezuelan populations. *Arch Virol*. 2002; 147:1829-36.
- Telenta, P.; Palacios, G.; López, J.; González, J.; Lemberg, A.; Campos, R. 2007. Increased Prevalence of Genotype F Hepatitis B Virus Isolates in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol*. 2007; 35:1873-5.
- WHO 2010. World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet No. 204.