



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS B (VHB) EN MUESTRAS DE PACIENTES PROVENIENTES DE
DOS POBLACIONES COLOMBIANAS**

YOYNA JOSEFINA RIVAS SALAZAR

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA APLICADA
MENCION MICROBIOLOGÍA

CUMANÁ, 2008

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS B (VHB) EN MUESTRAS DE PACIENTES PROVENIENTES DE DOS
POBLACIONES COLOMBIANAS

APROBADO POR:

Dra. Flor Pujol

Asesora Académica

Jurado Principal

Jurado Principal

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hepatitis viral.....	1
1.2. Virus de la hepatitis B (VHB).....	1
1.2.1. Estructura viral.....	2
1.2.2. Organización genómica.....	3
1.2.3. Ciclo Biológico.....	7
1.2.4. Epidemiología.....	9
1.2.5. Diversidad genética del VHB.....	11
1.2.5.1. Diversidad genética del VHB en América Latina.....	12
1.2.6. Implicaciones clínicas de los genotipos del VHB.....	13
1.2.7. Historia evolutiva del VHB.....	15
OBJETIVOS	17
2.1. General.....	17
2.2. Específicos.....	17
METODOLOGÍA	18
3.1. Población de estudio.....	18
3.2. Determinación de ADN del VHB.....	18
3.2.1. Extracción de ADN viral.....	18
3.2.2. Amplificación específica del gen s del VHB mediante la Reacción en Cadena	

de la Polimerasa en dos rondas (PCR- anidado).....	19
3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	20
3.3. Amplificación del genoma completo del VHB en aislados selectos.....	21
3.4. Purificación y secuenciación de los productos obtenidos por PCR.....	27
3.5. Análisis filogenéticos.....	28
3.5.1. Asignación de los genotipos y subgenotipos del VHB.....	28
RESULTADOS.....	31
4.1. Determinación del ADN del VHB por PCR en muestras Ags positiva.....	31
4.2. Caracterización molecular de los aislados del VHB.....	33
4.2.1. Secuenciación y análisis filogenético.....	33
4.3.1. Secuenciación y análisis filogenético de genomas completos del VHB	39
4.4. Análisis de aminoácidos.....	42
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXO.....	70
HOJA DE METADATOS.....	71

DEDICATORIA

A Dios

A la miel que endulza mi vida, mi hijo

A mis padres, en especial a mi mamá

A mis hermanos y sobrinos

A mi amor, Ronald

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. Flor Pujol, por su excelente calidad profesional, entrega, dedicación y disposición en todo momento. Un ser humano capaz de conducir un grupo de investigación más allá de lo académico, detectando en él situaciones y ofreciendo siempre una respuesta oportuna. Gracias por creer en mí y ayudarme en la realización de este objetivo.

A la Universidad de Oriente, mi segundo hogar, por la formación que me ha dado a todo lo largo de mi carrera

Al Postgrado de Biología Aplicada y a las profesoras Luz Betina y Aracelys Arcia, por abrirme las puertas a los estudios de cuarto nivel.

Al IVIC, quien a través de la calidad su personal, instalaciones y servicios me permitió completar mis estudios de postgrado.

A mis amigos del laboratorio, Marisol, Carmen Luisa, Cheo, Miguel, Héctor, Zoila, Daniela, Yoneira, Maria Zulay, Clarisa, Alberto, Rona, Pereira, Anny, Gladys, Mireya, Idamelis, Yailin, Natalia, por su apoyo y colaboración.

A todos mis compañeros de estudios, Jessica, Zulay, Rosmy, America, Pablo, Evis, Rosa, a todos.

A mis amigos del alma, Auramarina, Greys, Bernal, Dervis y America, a quienes no olvidaré nunca.

A la Sra. Luz, por su colaboración incondicional en el desarrollo de mi tesis.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores empleados para la amplificación del gen s del VHB.....	20
Tabla 2. Iniciadores utilizados para la amplificación del genoma completo del VHB.	24
Tabla 3. Secuencias de genomas completos y de AgsHB, utilizadas en el presente estudio, disponible en la base de datos Entrez Nucleotides (www.ncbi.nlm.gov/entrez).....	29
Tabla 4. Amplificación de dos regiones del gen s del VHB en aislados virales obtenidos de las dos poblaciones estudiadas.....	32
Tabla 5. Genotipos del VHB encontrados en la población estudiada.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una partícula infecciosa del virus de la hepatitis B (http://www.asiahep.org.hk/e_1hepb_1.htm).....	3
Figura 2. Organización genómica del VHB. Las flechas en colores indican los diferentes cuatro marcos abiertos de lectura (ORFs), DR1 y DR2 hacen referencia a las secuencias repetidas ubicadas en los extremos de ambas cadenas (http://www.microbiologybytes.com/virology/Trans3.html).....	5
Figura 3. Ciclo Biológico del VHB (Mandell et al., 2006). Los viriones se unen a los receptores de superficie y son internalizados. Las nucleocapsides son liberadas y transportadas al núcleo del hepatocito donde el ADN es reparado para formar ADNccc, el cual sirve de molde para la transcripción de los distintos ARN, a partir de estos son traducidas todas las proteínas virales en el citoplasma. El transcrito más largo (ARNpg), es empaquetado con la polimerasa viral dentro de la cápside para iniciar la síntesis del ADN genómico por transcripción reversa. Los viriones ensamblados son llevados a Golgi y luego son secretadas al exterior de la célula o retornan al núcleo para mantener el reservorio de ADNccc.....	9
Figura 4. Estrategia de amplificación para el genoma completo del VHB.....	23
Figura 5. Electroforesis de dos regiones del gen s del VHB evaluadas en el presente estudio. C-: control negativo, S3: fragmento de 336 pb, S6-S7: fragmento de 715 pb, C+: control positivo y M: marcador de peso molecular.....	31
Figura 6. Árbol Filogenético (Neighbor-joining, Kimura dos parámetros, DNAMAN versión 5.2.2) construido a partir de fragmentos de 317pb del gen s del VHB. Las secuencias obtenidas en este estudio se encuentran en color azul, mientras que las secuencias de referencia se encuentran en color negro. Las letras verdes indican los diferentes genotipos del VHB y los números en rojo a los valores de bootstrap.....	36

Figura 7. Árbol Filogenético (Neighbor-joining, Kimura dos parámetros, DNAMAN versión 5.2.2) construido a partir de fragmentos de 595 pb del gen s del VHB. Las secuencias obtenidas en este estudio se encuentran en color azul, mientras que las secuencias de referencia se encuentran en color negro. Las letras verdes indican los diferentes genotipos del VHB, la llave hace referencia al subgenotipo F3 y los números en rojo a los valores de bootstrap.....37

Figura 8. Árbol Filogenético (Neighbor-joining, Kimura dos parámetros, DNAMAN versión 5.2.2) construido a partir de fragmentos de 1291 pb del genoma del VHB. Las secuencias obtenidas en este estudio se encuentran en color azul, mientras que las secuencias de referencia se encuentran en color negro. Las letras verdes indican los diferentes genotipos del VHB, la llave hace referencia al subgenotipo F3 y los números en rojo a los valores de bootstrap.....40

Figura 9. Árbol Filogenético (Neighbor-joining, Kimura dos parámetros, DNAMAN versión 5.2.2) construido a partir de genomas completos del VHB. La secuencia obtenida en este estudio se encuentra en color azul, mientras que las secuencias de referencia se encuentran en color negro. Las letras verdes indican los diferentes genotipos del VHB, la llave hace referencia al subgenotipo F3 y los números en rojo a los valores de bootstrap.....41

Figura 10. Alineación de secuencias aminoacídicas de la región correspondiente al determinante “a” (residuos 122-147) del AgsHB. Los aislados señalados son un grupo representativo del patrón de secuencia analizada. La secuencia en azul (secuencia molde) corresponde a un aislado venezolano, los aminoácidos en rosados hace referencia a las cisteínas importantes en la estructura terciaria del AgsHB. En la alineación se indican solo las diferencias.44

Figura 11. Alineación de secuencias aminoacídicas de la región correspondiente al dominio de fusión (residuos 7-18) del AgsHB. Los aislados señalados son un grupo representativo del patrón de secuencia analizada. La secuencia en azul (secuencia molde) corresponde a un aislado venezolano. En la alineación se indican solo las diferencias.....45

Figura 12. Alineación de secuencias aminoacídicas de la región correspondiente al motivo YMDD del dominio RT de la proteína polimerasa del VHB. Los aislados señalados son un grupo representativo del patrón de secuencia analizada. La secuencia en azul (secuencia molde) corresponde a un aislado venezolano. En la alineación se indican solo las diferencias.46

Figura 13. Alineación de secuencias nucleotídicas correspondiente a la región pre-core/core (residuos 1760-2003) del VHB. Las secuencias señaladas pertenecen a aislados de referencia, excepto el aislado Buc8 que fue obtenido en la presente investigación. La secuencia en azul (secuencia molde) corresponde a un aislado colombiano. En la alineación se indican solo las diferencias.....48

RESUMEN

El virus de la hepatitis B (VHB) tiene una amplia distribución geográfica. Alrededor de dos millardos de personas en el mundo han sido infectados con este virus y cerca 350-400 millones de éstos son portadores crónicos. Basado en una divergencia mínima del 8% entre las secuencias del genoma completo, el VHB ha sido clasificado en ocho genotipos definidos con las letras desde la A hasta la H. El genotipo F es autóctono de Suramérica y altamente predominante en la región. Adicionalmente este genotipo ha sido subclasificado en cuatro subgenotipos identificados como F1, F2, F3 y F4, los cuales guardan relación con un área geográfica determinada. El subgenotipo F3 frecuentemente se encuentra en el Norte de Suramérica y se relaciona filogenéticamente con la única secuencia de genoma completo del VHB colombiana reportada hasta el momento. En el presente estudio se caracterizaron molecularmente secuencias del VHB provenientes de dos poblaciones colombianas y se compararon filogenéticamente las secuencias del gen *s* y de genomas completos con secuencias prototipos de aislados de diferentes genotipos del VHB. Para ello se analizaron 126 muestras de sueros positivos para el antígeno de superficie (AgsHB), mediante la técnica de PCR en dos rondas, utilizando iniciadores específicos para las regiones del AgsHB e iniciadores específicos para la amplificación de genomas completos en muestras selectas. Los productos amplificados fueron secuenciados y analizados filogenéticamente. Un total de 47 (37%) amplificaron al menos para una región del AgsHB y solo en uno se amplificó el genoma completo. El análisis filogenético reveló que 41 aislados pertenecen al genotipo F, cuatro al genotipo D, uno al genotipo A y uno al genotipo C. La subgenotipificación de 23 secuencias, logró la asignación eficiente de los subgenotipos, resultando así 17 F3, 3 D2, 1 D3, 1 A2 y 1 C2. Todas las secuencias genotipo F (subgenotipo F3) se encuentran estrechamente relacionada con la única secuencia del VHB colombiana reportada en la base de datos Entrez Nucleotides (www.ncbi.nlm.gov/entrez), lo que se corresponde con la distribución geográfica reportada para el genotipo F y el subgenotipo F3. La presencia de los genotipos A, C y D en la población estudiada podría estar asociada a las diferentes olas migratorias que se han venido dando hacia esta parte del continente. Es evidente observar una alta predominancia del genotipo F sobre otros genotipos (A, C y D) en la población colombiana estudiada, lo cual concuerda con el fuerte acervo genético amerindio que mantiene la población.

INTRODUCCIÓN

1.1. Hepatitis viral

La hepatitis viral es una enfermedad necroinflamatoria del hígado, la cual puede ser causada por virus de distintas familias. Actualmente se conocen cinco virus asociados a esta enfermedad, designados como virus de la hepatitis A (VHA), B (VHB), C (VHC), D (VHD) y E (VHE) (Richman *et al.*, 2002), los cuales no guardan relación en su estructura, modo de replicación (Hollinger, 1996) y vías de transmisión. La transmisión podría ser vía entérica (VHA y VHE), a través de la ingestión de alimentos y aguas contaminadas, o por vía parenteral (VHB, VHC y VHD). En esta última las transfusiones sanguíneas, la drogadicción intravenosa, el contacto sexual, la hemofilia, la hemodiálisis y la transmisión vertical madre-hijo representan los principales factores de riesgo entre otros (Zuckerman & Thomas, 1998).

Adicionalmente otros tres virus con tropismo por el hígado han sido descritos, conocidos como el virus de la hepatitis G (VHG o GBV-C), el virus TT (VTT) y el virus SEN. Sin embargo, su asociación con la enfermedad no ha sido bien establecida (Richman *et al.*, 2002).

1.2. Virus de la hepatitis B (VHB)

El VHB es el miembro prototipo de la familia *Hepadnaviridae*. El nombre de esta familia proviene de la combinación de los términos hepatotrópico y ADN, los cuales enfatizan dos de las propiedades taxonómicas más resaltantes de estos virus (Richman *et*

al., 2002). El VHB constituye uno de los virus más importantes desde el punto de vista médico, presenta un hepatotropismo marcado pero no absoluto. (Richman *et al.*, 2002). El VHB Causa una infección hepática con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales van desde un estado transitorio, hepatitis aguda o fulminante, a un estado crónico que incluye portadores asintomático. (El Khouri & Dos Santos, 2004). La hepatitis crónica podría desarrollarse en cirrosis hepática o en carcinoma hepatocelular (Evans *et al.*, 1998). Además, el VHB representa el primer ejemplo del éxito de una vacuna recombinante para una enfermedad contagiosa humana.

1.2.1. Estructura viral

Estos virus se caracterizan por presentar: 1) una forma esférica de aproximadamente 42 nm de diámetro, 2) un genoma de ADN de 3,2 Kb, circular relajado y parcialmente de doble cadena, 3) una envoltura lipoproteica donde se insertan las proteínas de superficie denominadas S (del inglés small), M (middle) y L (large); 4) una nucleocápside interna que encierra al genoma viral y 5) una polimerasa viral asociada al genoma, la cual cataliza una transcripción reversa produciendo ARN (pregenoma) como intermediario (Richman *et al.*, 2002) (Figura 1).

Unas de las características importantes de la infección por el VHB es la producción y liberación de numerosas partículas subvirales de 20 - 22 nm de diámetro, en forma de esferas o filamentos. Estas partículas subvirales están compuesta sólo por proteínas de superficie o antígeno de superficie (AgSHB), además circulan en sangre y permiten diagnosticar la presencia del antígeno viral mediante inmunoensayos (Mandell

et al., 2006).

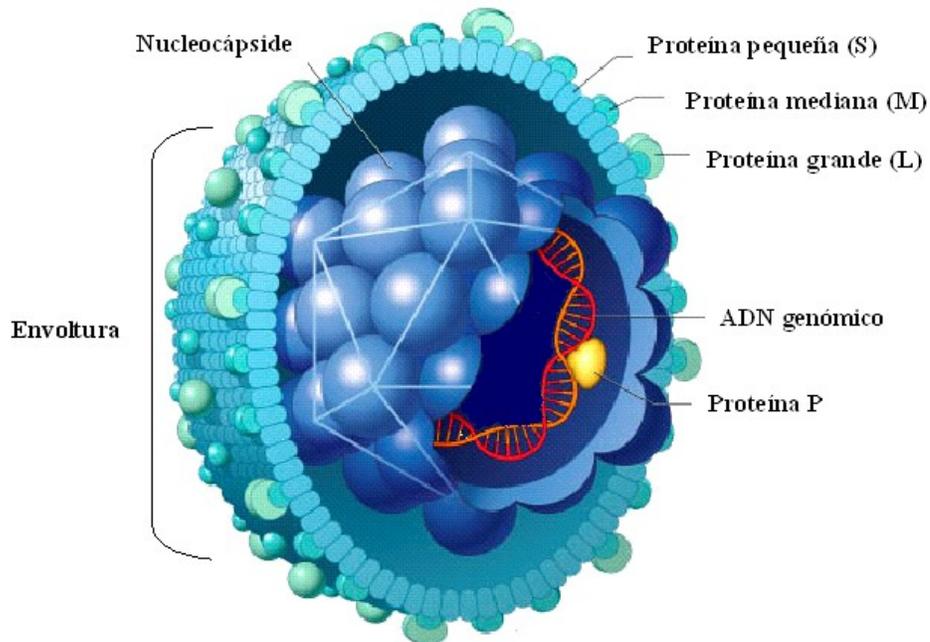


Figura 1. Estructura de una partícula infecciosa del virus de la hepatitis B (http://www.asiahep.org.hk/e_1hepb_1.htm).

1.2.2. Organización genómica

En el genoma viral se pueden distinguir dos hebras de ADN, una larga y una corta. La hebra larga o de longitud completa es la hebra negativa (L-), la cual presenta en su extremo 5' terminal una polimerasa viral (proteína P) unida covalentemente. La hebra corta por su parte es la positiva (S+), es de longitud variable y presenta un oligonucleótido de ARN unido a su extremo 5' terminal, el cual funciona como un

iniciador en el proceso de transcripción (Staruss & Strauss, 2002). La estructura circular del genoma está asegurada por las regiones de cohesión (220 nucleótidos), situadas en los extremos 5' de cada cadena. En esta región existe una secuencia de 11 nucleótidos que se repite directamente en el otro extremo de la región de cohesión. Estas secuencias repetidas, denominadas DR1 para la situada en la cadena L (-), y DR2 para S (+), se encuentran implicadas en la replicación e integración del genoma del virus en los hepatocitos (Nassal, 1999).

En la cadena L (-) se han identificado cuatro marcos abiertos de lectura (ORF del inglés Open Reading Frames) que representan genes codificantes y se encuentran solapados en toda su extensión. Este solapamiento permite que el genoma codifique un 50% más de información, incrementando así su capacidad codificante. Los ORFs son conocidos como ORF P, ORF C, ORF S y ORF X, y codifican para siete proteínas virales (Figura 2).

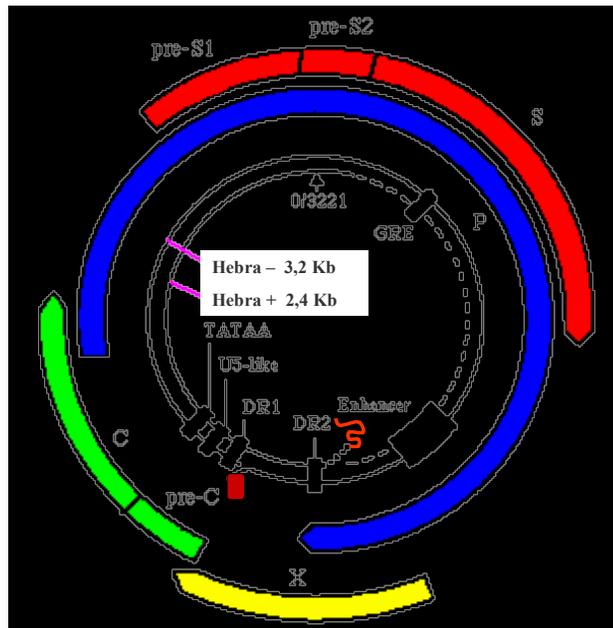


Figura 2. Organización genómica del VHB. Las flechas en colores indican los diferentes cuatro marcos abiertos de lectura (ORFs), DR1 y DR2 hacen referencia a las secuencias repetidas ubicadas en los extremos de ambas cadenas (<http://www.microbiologybytes.com/virology/Trans3.html>).

1.2.2.1. ORF P

Ocupa las tres cuartas partes del genoma viral y se superpone a otros genes. Este ORF codifica la proteína ADN polimerasa, la cual está caracterizada por presentar en su estructura tres dominios, designados como: proteína terminal (PT), transcriptasa reversa (TR) y ribonucleasa H (RNasaH). El dominio PT representa la porción que se une de manera covalente al ADN viral. TR por su parte encargado de la transcripción reversa presenta la región catalítica de la proteína, mientras que el dominio RNasa H se encarga de la hidrólisis del molde ARN pregenómico durante la transcripción reversa (Mandell *et al.*, 2006).

1.2.2.2. ORF C

Contiene dos codones de iniciación (AUG) intramarco. El primer codón es el responsable de la síntesis de polipéptidos del antígeno e (AgeHB), el segundo codón indica la síntesis de la proteína de nucleocápside o antígeno del core (AgcHB) (Mandell *et al.*, 2006). La síntesis del AgeHB resulta del procesamiento proteolítico de los extremos amino y carboxilo del producto completo del gen precore/core. Esta proteína difiere del AgcHB por presentar una extensión de 10 aminoácidos en el extremo amino y por la ausencia del extremo básico carboxilo (Devesa & Loureiro, 2000). El AgeHB es segregado por las células infectadas y se acumula en el suero como antígeno soluble con especificidad inmunológica, actuando como marcador de la replicación viral progresiva (Mandell *et al.*, 2006).

1.2.2.3. ORF S

El presente ORF contiene tres codones de iniciación (AUGs) interno, a partir de los cuales se sintetizan los polipéptidos del AgsHB (S, M y L). Según la ubicación de los AUGs, en este gen, se distinguen tres regiones definidas PreS1, PreS2 y S. La traducción del primer AUG o de PreS1 conlleva a la síntesis de una proteína de 39 kD conocida como proteína L, e involucrada en la unión al receptor. La traducción del segundo codón o de PreS2 permite la síntesis de la proteína M, cuya masa molar es de aproximadamente 31 kD. Finalmente el tercer AUG o la región S promueven la síntesis de la proteína S de 24 kD, la cual representa la proteína más abundante de la superficie del virión y el componente mayoritario de las partículas subvirales de 22 nm. En estas partícula

también se pueden encontrar cantidades menores de proteína M y muy poca o nula de proteína L, mientras que la partícula viral completa contiene las tres formas del AgsHB (Richman *et al.*, 2002; Mandell *et al.*, 2006).

1.2.2.4. ORF X

Codifica la proteína X (AgxHB), la cual se conoce como un transactivador pleiotrópico de la transcripción. Esta proteína juega un rol regulador importante en la replicación del VHB (Seeger & Mason, 2000; Bouchard & Schneider, 2004).

1.2.3. *Ciclo Biológico*

Debido a la ausencia de una línea celular susceptible a la infección por el VHB, los eventos tempranos de su ciclo de vida son pocos entendidos. Estos incluyen la entrada a la célula, la descapsidación y liberación del genoma viral en el núcleo celular (Seeger & Mason, 2000). Sin embargo, se conoce que el ciclo infeccioso (Figura 3) se inicia con la interacción selectiva de la proteína L de la envoltura viral con un receptor específico todavía no identificado presente en la superficie de los hepatocitos (Glebe & Urban, 2007). Posteriormente, un evento de fusión de membranas permite que las nucleocápsides sean liberadas al citoplasma y luego transportada hacia el núcleo. Una vez que el genoma viral es liberado en el núcleo, factores celulares que participan en la reparación del ADN y probablemente la polimerasa viral, completan la hebra positiva del ADN viral, convirtiéndolo en un ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc), formando un episoma o mini-cromosoma no integrado (Tuttleman *et al.*, 1986; Rabe *et al.*, 2003). El ADNccc sirve de molde para la transcripción de por lo menos cuatro

especies de ARN, a partir de los cuales, son traducidas todas las proteínas virales. El transcrito más largo, denominado ARN pregenómico (ARNpg), es empaquetado, mediante un proceso finamente regulado, junto con la polimerasa viral dentro de la cápside (Melegari *et al.*, 2005), donde se va a iniciar la síntesis del ADN genómico por transcripción reversa. Al finalizar la transcripción reversa, el ARNpg es degradado hasta los últimos 18 nt por la actividad de RNasa H de la polimerasa viral, los cuales van a servir posteriormente de cebadores para la síntesis de la hebra positiva del ADN genómico.

Simultáneamente, las proteínas de la envoltura son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, translocadas y posteriormente transportadas al post-retículo y al compartimiento pre-Golgi hacia donde geman las nucleocápsides maduras recién formadas. Los viriones y partículas subvirales ensambladas son transportadas a Golgi, donde las proteínas de la envoltura son glicosiladas. Luego son secretadas al exterior de la célula, finalizando así el ciclo de vida del virus. Algunas nucleocápsides no alcanzan la maduración y retornan al núcleo, manteniendo así el reservorio de ADNccc a un nivel de 30-50 copias por célula (Bruss, 2004; Zoulim, 2005).

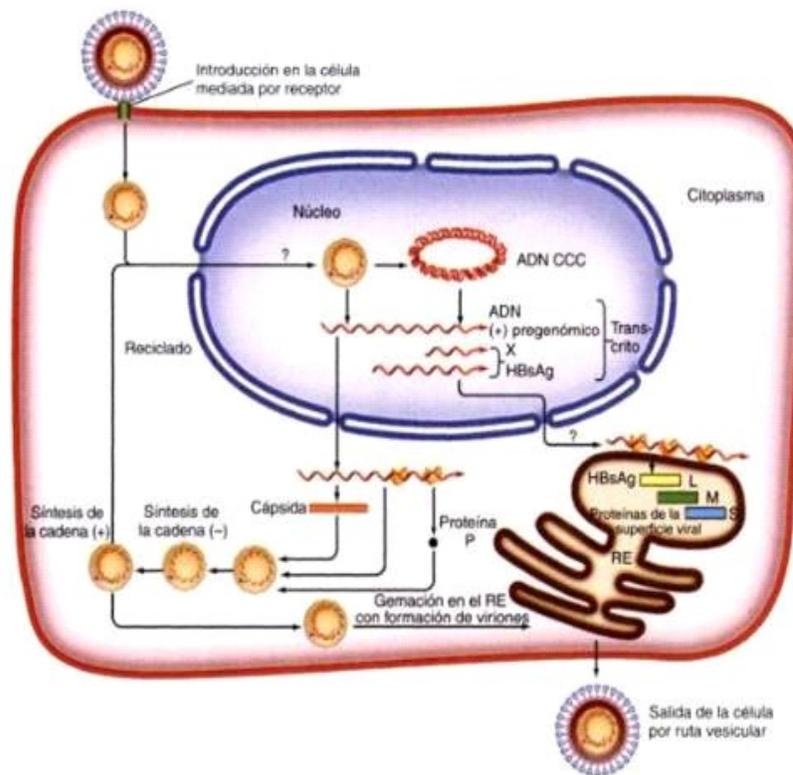


Figura 3. Ciclo Biológico del VHB (Mandell *et al.*, 2006). Los viriones se unen a los receptores de superficie y son internalizados. Las nucleocapsidas son liberadas y transportadas al núcleo del hepatocito donde el ADN es reparado para formar ADNccc, el cual sirve de molde para la transcripción de los distintos ARN, a partir de estos son traducidas todas las proteínas virales en el citoplasma. El transcrito más largo (ARNpg), es empaquetado con la polimerasa viral dentro de la cápsida para iniciar la síntesis del ADN genómico por transcripción reversa. Los viriones ensamblados son llevados a Golgi y luego son secretadas al exterior de la célula o retornan al núcleo para mantener el reservorio de ADNccc.

1.2.4. Epidemiología

A pesar de que existe una vacuna efectiva contra el VHB, este virus está globalmente distribuido. Alrededor de dos millardos de personas en el mundo han sido infectados con el VHB, y cerca de 350-400 millones de estos son portadores crónicos

(McMahon *et al.*, 2005). Cabe destacar que el 25% de los portadores crónicos pueden desarrollar una enfermedad hepática progresiva (Zukerman & Zukerman, 2000) con propensión a desarrollar hepatitis crónica, cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular (Lavanchy, 2005). La infección por el VHB se caracteriza por presentar un período de incubación relativamente largo, descrito entre 45-120 días, con un período de convalecencia que usualmente se extiende a más de 2 meses (Strauss & Strauss, 2002). Si bien la mayoría (90%) de las infecciones en adultos se resuelven, el 80-90% de los niños infectados de manera perinatal, se convierten en portadores crónicos (Milich *et al.*, 1990). La muerte por hepatitis B fulminante no es común y la tasa de mortalidad en los casos agudos es cerca del 1% (Strauss & Strauss, 2002).

La transmisión del VHB es esencialmente parenteral, este virus es adquirido principalmente por contacto con sangre, productos sanguíneos o instrumentos contaminados. Los contactos homosexuales o heterosexuales son reconocidos como el principal factor de riesgo en la transmisión del virus, por otra parte la transmisión perinatal ha sido reportada en aquellos casos donde la madre presenta altos niveles de replicación viral. Cabe destacar que en donantes voluntarios la prevalencia de AgsHB va desde 5%-10% observándose altas prevalencias en aquellos grupos de personas de bajos recursos socioeconómicos, en personas adultas y en personas con una incrementada exposición a productos sanguíneos (Richman *et al.*, 2002).

La vacunación contra el VHB no es un tratamiento para una infección ya establecida, si no que es una forma efectiva para prevenir la infección. Sin embargo los altos costos de los programas de vacunación ha impedido la introducción de la vacuna

en muchos países pobres donde la infección es prevalente, afectando del 5 al 20% de la población (Seeger & Mason, 2000).

Las altas prevalencias de la infección por el VHB son encontradas en el suroeste asiático y África subsahariana, constituyendo cerca del 5% de la población mundial (Zukerman & Zukerman, 2000). Suramérica exhibe una prevalencia intermedia, registrándose zonas de alta endemicidad en poblaciones amerindias (Torres, 1996). Alrededor de 11 millones de personas en esta región están infectadas. En el suroeste de Suramérica (Chile, Uruguay, Paraguay y Argentina) y en América Central se han registrado bajos niveles de prevalencias. En Brasil, Colombia, Perú y Venezuela por su parte se han reportado altas prevalencias de anticuerpos anticore (Devesa & Pujol, 2007).

1.2.5. Diversidad genética del VHB

Basado en una divergencia mínima del 8%, en las secuencias del genoma completo, el VHB ha sido clasificados en ocho genotipos diferentes, los cuales han sido denominados con letras de la A hasta H (A-H) (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Norder *et al.*, 2004). La distribución geográfica de cada genotipo es distinta, registrándose el genotipo A en Europa, India, África y Norte América, los genotipos B y C predominan en el Sureste de Asia, China y Japón. El genotipo D está ampliamente distribuido, con una predominancia en el Mediterráneo y en el Medio Oriente. El genotipo E está restringido a África, mientras que el genotipo F se encuentra principalmente en el Centro y en el Sur de América. El genotipo G ha sido identificado en Francia, México y Norte América

(Stuyver *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2005). Recientemente, un octavo genotipo ha sido descrito en América Central e identificado como genotipo H (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002).

1.2.5.1. Diversidad genética del VHB en América Latina

De todos los genotipos del VHB, F y H son conocidos como los genotipos americanos, se encuentran relacionados entre sí, mostrando una divergencia >14% con respecto a los otros genotipos (A-G), de tal manera que son considerados los genotipos más divergentes (Arauz-Ruiz, 2002). El genotipo F es altamente predominante en poblaciones amerindias y se ha encontrado con alta frecuencia en diversos países suramericanos, particularmente en Venezuela, Bolivia y Argentina (Telenta *et al.*, 1997; Blitz *et al.*, 1998; Huy *et al.*, 2006; Devesa *et al.*, 2008; Piñeiro *et al.*, 2008), y en América Central (Arauz-Ruiz *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2002).

En Suramérica también se ha descrito la presencia de otros genotipos distintos de F. En Argentina Piñeiro *et al.*, (2008) reportan la circulación de los genotipos A y D, donde D es descrito como el genotipo más prevalente de la región metropolitana, mientras que F es el genotipo más frecuente en el norte de la región. En Brasil los genotipos A, B, C y D también han sido reportados, siendo A y D los más prevalentes, B y C descrito en pacientes de origen asiático establecidos en esta región (Sitnik *et al.*, 2004). En Venezuela los genotipos A y D han sido reportados hasta en comunidades Amerindias (Devesa *et al.*, 2004; Devesa *et al.*, 2008). Los genotipos A, H y G han sido detectados en México mientras que A y H son encontrados en Nicaragua (Arauz-Ruiz *et al.*, 1997., Sánchez *et al.*, 2002).

Datos basados en análisis filogenéticos del gen *s* y de genomas completos de diferentes aislados del genotipo F, han revelado una subdivisión del genotipo F en cuatro clados principales, designados I, II, III, IV, donde el clado I a su vez se subclasifica en Ia y Ib (Mbayed *et al.*, 2001; Piñeiro *et al.*, 2003; Devesa, *et al.*, 2004), clasificación que muestra una estrecha asociación con una localización geográfica en particular. Los aislados agrupados en los sub clados Ia y en los clados III y IV exhiben una distribución geográfica bien restringida, reportándose en América Central, al Norte y al Sur de Suramérica respectivamente, mientras que los que se agrupan en el sub clado Ib y en el II se encuentran dispersos en el continente (Devesa *et al.*, 2004; Huy *et al.*, 2006).

Una nueva clasificación del genotipo F fue planteada, esta propone una subdivisión en subgenotipos F1 y F2, F1 está formado principalmente por aislados de América Central, mientras que F2 está constituido por aislados Suramericanos provenientes de Venezuela y Colombia (Norder *et al.*, 2004). Recientemente una caracterización genómica del genotipo F en cepas Bolivianas, propone otra nomenclatura para subclasificar este genotipo. En ella se describen cuatro subgenotipos, definidos como F1, F2, F3 y F4 (Huy *et al.*, 2006).

1.2.6. Implicaciones clínicas de los genotipos del VHB

El curso de la infección por el VHB depende de diversos factores que involucra tanto al virus como al hospedero. El impacto de los genotipos del VHB en el curso natural de la infección y la respuesta al tratamiento ha sido un tema recientemente estudiado. La mayoría de la información disponible proviene de estudios realizados en

áreas endémicas de Asia, donde existe una predominancia del genotipo B y C. Estos análisis han sido extendido a otras regiones del mundo, pero los datos a cerca de la epidemiología molecular de estos virus, por ejemplo en Suramérica son escasos (Campos *et al.*, 2005).

Las implicaciones clínicas de los genotipos del VHB en una infección crónica o en la severidad de una enfermedad hepática, no están bien entendidas. El genotipo C ha sido descrito como uno de los genotipos más prevalentes en pacientes con infecciones crónicas en China, encontrándose hasta por encima de un 90% con respecto al genotipo B; asociándose así al desarrollo de una enfermedad hepática severa (Kong & Li, 2007). Sin embargo, otro estudio ha reportado que la infección con cualquiera de los dos genotipos no muestran diferencias significativas en el desarrollo de una enfermedad hepática severa, dato también observado durante la realización de pruebas de función, inflamación y fibrosis hepática (Zeng *et al.*, 2005). Por otro lado se ha sugerido que la infección por el genotipo B ha mostrado tener una asociación en el desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC) en pacientes jóvenes, mientras que las infecciones con el genotipo C se encuentra más relacionado a la aparición de cirrosis hepática (Kao *et al.*, 2000).

Aún cuando existen numerosas evidencias que indican que el desarrollo de una enfermedad hepática severa está más asociado a infecciones causadas por los genotipos prevalentes de Asia (B y C), es de vital importancia estudiar la significancia clínica de otros genotipos en el mundo. En Suramérica son muy escasos los reportes existentes, sin embargo ciertos hallazgos motivan el estudio de las infecciones por el genotipo F en la

evolución de una enfermedad hepática. Sánchez-Tapias *et al.*, (2002) describió que las muertes causada por una enfermedad hepática en un pequeño grupo de paciente hispanos se asociaba con mayor frecuencia a infecciones con el genotipo F que a infecciones con los genotipos A o D. Recientemente se ha reportado una significativa asociación entre el genotipo F y el desarrollo de CHC en pobladores nativos de Alaska, con infecciones crónicas por el VHB (Livingston *et al.*, 2007).

1.2.7. Historia evolutiva del VHB

La historia evolutiva del VHB ha sido un tema ampliamente discutido en los últimos años y varias hipótesis que reflejan el origen de estos virus han sido propuestas. Algunos autores han sugerido que los VHB humanos y los hepadnavirus de primates no humanos han divergido en los pasados 6000 años, sin embargo, existen numerosas interrogantes todavía por resolver en relación al origen de estos virus (Fares & Holmes, 2002). A pesar de que se ha logrado el aislamiento de hepadnavirus a partir de varias especies de primates del viejo mundo, estrechamente relacionadas con los humanos (Norder *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2000), no hay ninguna evidencia convincente de que estos virus hayan coevolucionado con sus hospederos en millones de años (Fares & Holmes, 2002).

El descubrimiento del VHB en el mono lanudo (VHBML) representa el primer aislado del VHB obtenido de monos del nuevo mundo, sorprendentemente este aislado se encuentra filogenéticamente mas relacionado al genotipo F que a los otros genotipos humanos del VHB (Lanford *et al.*, 1998), por lo que se ha sugerido un origen americano

del VHB teniendo al VHBML como ancestro. Sin embargo, análisis filogenéticos realizados por otros investigadores sugieren un origen asiático para el VHB (Robertson, 2001; Fares & Holmes, 2002). Actualmente se requiere un mayor número de secuencias del VHB, tanto de monos como de humanos suramericanos, con el fin de aportar datos importantes que contribuyan al esclarecimiento de la historia evolutiva del VHB.

Aún cuando existen diversos reportes que muestran una asociación entre la diversidad genética del VHB y un área geográfica en particular, se requiere del análisis de muchas secuencias de otras regiones de Suramérica que ayuden a entender la relación entre la diversidad genética del VHB y su filogenia.

Considerando que el genotipo F 1) es autóctono de Suramérica y altamente predominante en la región, 2) que ha sido subclasificado en diferentes grupos que guardan relación con un área geográfica determinada, 3) que su origen evolutivo podría estar asociado a una localización en particular y 4) que el subgenotipo F3 (predominante en Venezuela) guarda relación filogenética con la única secuencia de genoma completo procedente de Colombia, se planteó la realización de este estudio con el fin de aportar información que ayude a esclarecer la filogenia y la historia evolutiva del virus. Adicionalmente, estos datos contribuirían a la comprensión de su evolución con respecto al huésped y podrían permitir asociar la divergencia viral reportada con los diferentes patrones de migración experimentados en Suramérica, con ciertas costumbres culturales y factores socio-económicos que rigen la transmisión del VHB en algunos países de esta región.

OBJETIVOS

2.1. General

Caracterizar molecularmente aislados del VHB provenientes de sueros de donantes voluntarios, procedentes de dos poblaciones colombianas.

2.2. Específicos

Amplificar, mediante la técnica de PCR en dos rondas, dos regiones correspondientes al gen de superficie (gen *s*) del VHB, a partir de sueros.

Obtener las secuencias del gen *s* y de genomas completos en aquellas muestras que resultasen positivas para la PCR del gen *s*.

Establecer las relaciones filogenéticas entre las secuencias nucleotídicas obtenidas y otras secuencias provenientes de aislados de diferentes genotipos del VHB, depositadas en las bases de datos públicas.

METODOLOGÍA

3.1. Población de estudio

Se analizaron un total de 126 muestras de sueros con reacción positiva para el antígeno de superficie del VHB (AgSHB), provenientes de dos poblaciones de Colombia: 78 muestras procedentes de donantes voluntarios del Banco de Sangre de Bogotá y 48 muestras originarias de Bucaramanga (gentilmente cedidas por la Dra. María Fernanda Gutiérrez, Universidad Javeriana, Bogotá).

3.2. Determinación de ADN del VHB

3.2.1. Extracción de ADN viral

Se realizó mediante el uso de un Kit de extracción para ADN viral (QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen, Alemania). Este método está basado en el uso de columnas de sílica gel, a las cuales se unen el ADN libre de proteínas, mientras que moléculas contaminantes pueden pasar libremente a través de esta. Las proteínas son inicialmente separadas del ADN a través del uso de proteinasa K. Es un método que no usa fenol-cloroformo y que permite obtener ADN libre inhibidores de la PCR, como lo son los cationes divalentes y las proteínas, los cuales son removidos eficientemente durante dos pasos de lavados.

3.2.2. Amplificación específica del gen *s* del VHB mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en dos rondas (PCR- anidado)

Todos las muestras de sueros obtenidos de la población en estudio fueron sometidos a amplificaciones por PCR en dos rondas. Para ello se utilizó un grupo de iniciadores que permitieron la amplificación de dos regiones del gen *s* del VHB. Para la primera ronda de la PCR se emplearon un par de iniciadores externos (58P-1101N) (Invitrogen life technologies, USA), mientras que para la segunda ronda se utilizaron dos grupos separados de iniciadores internos (S3s- S3as y S6-S7). En todos los análisis de la PCR, la mezcla de la reacción contenía de 0,5µl de Taq Polimerasa a 5U/µl (Invitrogen life technologies, USA) en su tampón correspondiente, 2-4µl de una mezcla de nucleótidos (dCTP, dGTP, dTTP, dATP) a 10mM, 1,5-2 µl de MgCl₂ a 50mM y 1-5 µl de cada iniciador a 10mM en un volumen final de 50µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, USA). En todos los casos, se agregaron 10µl del extracto de ADN a la mezcla de la primera ronda de la PCR, y 2 µl del producto así obtenido para la segunda ronda. Para efecto de este ensayo se usaron como controles positivos muestras previamente identificadas como francas positivas para el VHB y como controles negativos se usó la mezcla de reactivos sin ADN. Las condiciones del PCR variaron según las regiones a amplificar (Tabla 1).

Es importante destacar que las dos regiones del gen *s*, evaluadas en la presente investigación, fueron designadas experimentalmente como S3 y S6-S7, en referencia a los iniciadores (S3s-S3as y S6-S7) utilizados durante la amplificación de cada región.

3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa

Una vez que se realizaron las amplificaciones correspondientes a las regiones evaluadas del gen *s* del VHB, se llevó a cabo una electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, según método previamente descrito (Sambrook & Russell, 2001). Para ello se mezclaron 5µl del producto amplificado en la segunda ronda de la PCR con 2µl de buffer de carga (azul de bromofenol al 0,25%, xilen-cianol al 0,25% y 30 % de glicerol en agua).

Tabla 1. Iniciadores empleados para la amplificación del gen *s* del VHB.

PCR (Regiones)	Iniciadores	Posición	Ronda	Producto	Condiciones de amplificación
S	58p 5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC- 3'	58-78 nt	1	1043 pb	1 ciclo 94°c-1 min.
	1101n 3'-GAAAGGCCTTGTAAGTTGGCGAG-5'	1101-1078 nt			43 ciclos 94°-45 5seg. 45°-1 min. 72°-1 min.
S3	S3s 5'-TGCCTCATCTTCTTRTTGGTTCT-3'	422-444 nt	2	336 pb	1 ciclo 95°-10 seg.
	S3as 3'-CCCCAAWACCAVATC ATCCATATA-5'	758-735 nt			13 ciclos 95°-10 seg. 60°-15 seg. 72°-14 seg.
					34 ciclos 95°-10 seg. 48°-15 seg. 72°-14 seg.
					1 ciclo 72°-5 min.

Continuación .de Iniciadores empleados para la amplificación del gen *s* del VHB.

S6-S7	S6 5'-GCACACCGGGATCCGAGGACTGGGGACCCT-3'	130-160 nt	2	715 pb	1 ciclo 95°-1 min.
	S7 3'-GACACCTGCAGTTAGGGTTAAATGTATACC-5'	845-814 nt			6 ciclos 95°-1 min. 50°-1,15 min. 72°-1,30 min.
					26 ciclos 90°-1 min. 50°-1,15 min. 72°-1,30 min.
					1 ciclo 72°-7 min.

El tamaño de los productos amplificados fueron estimados utilizando como referencia el patrón de migración de un marcador en escalera de ADN de 1 Kb (1Kb Plus Invitrogen Life Technologies), la observación de los geles se realizó bajo luz U.V. Una vez verificados la amplificación de las dos regiones del gen *s* del VHB, se procedió a purificar y secuenciar cada fragmento (Aparte 3.4).

3.3. Amplificación del genoma completo del VHB en aislados selectos

En algunos aislados en donde se amplificó por los menos una de las dos regiones evaluadas para el gen *s* del VHB, se realizaron una serie de amplificaciones con un grupo de iniciadores que se solapan a todo lo largo del genoma viral y que conforman diferentes regiones del mismo. Estas regiones fueron experimentalmente definidas como P1-P2, A, B, C, D, X, X₁ y X₂, en referencia a los iniciadores empleados (Figura 4). Para ello se utilizó la estrategia de amplificación del genoma completo del VHB en un solo paso (Günther *et al.*, 1995). Brevemente, esta estrategia consistió en utilizar un par de

iniciadores solapados en la mayor parte de su extensión y antiparalelos (P1-P2), para generar un producto de aproximadamente 3,2 Kb. Posteriormente, este fragmento fue sometido a re-amplificaciones utilizando iniciadores internos solapados, los cuales en conjunto constituyen el genoma completo del virus. Las condiciones de la PCR variaron según las regiones a amplificadas (Tabla 2).

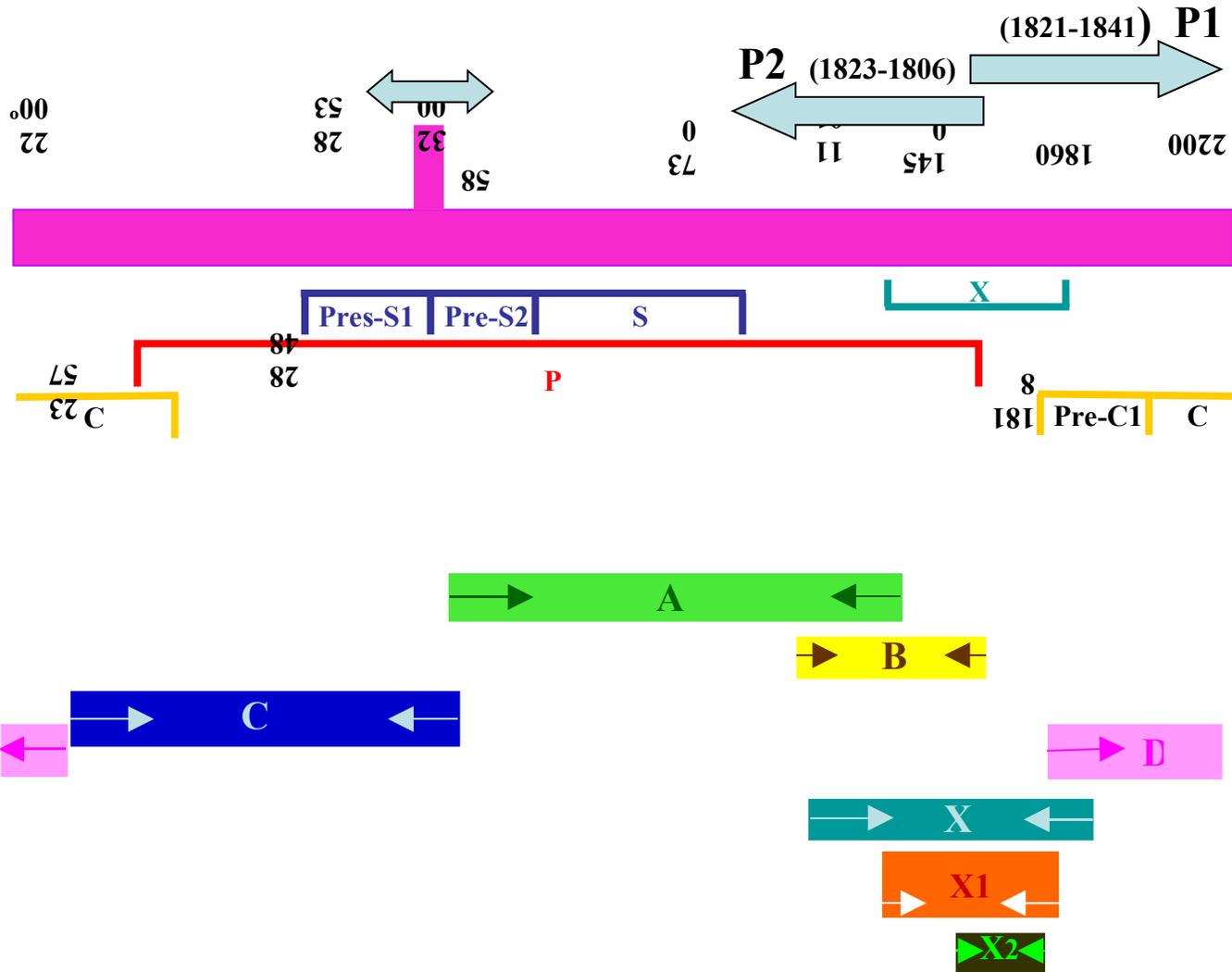


Figura 4. Estrategia de amplificación para el genoma completo del VHB.

En algunos casos se realizó una PCR hemi-anidado, donde uno de los iniciadores utilizados en la primera ronda se repite en la segunda ronda (Tabla 2).

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la amplificación del genoma completo del VHB.

PCR (Regiones)	Iniciadores	Posición	Ronda	Producto	Condiciones de amplificación
P1-P2	<p>P1 5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTCACCT CTGC CTAATCA-3'</p> <p>P2 3'- CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCA TGGTGCTGG-5'</p>	<p>1821-1841 nt</p> <p>1823-1806 nt</p>	1	3,2 kB	<p>1 ciclo 94°c-1 min.</p> <p>10 ciclos 94°-40 5seg. 60°-1,30 min. 68°-3 min.</p> <p>10 ciclos 94°-40 5seg. 60°-1,30 min. 68°-5 min.</p> <p>10 ciclos 94°-40 5seg. 60°-1,30 min. 68°-7min</p> <p>10 ciclos 94°-40 5seg. 60°-1,30 min. 68°-9 min.</p>
A	<p>58p 5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC- 3'</p> <p>1450n 3'-GATTCAGCGCCGACGGGACGTA-5'</p>	<p>58-730 nt</p> <p>1450-1428 nt</p>	2	1392 pb	<p>1 ciclo 94°c-1 min.</p> <p>43 ciclos 94°-45 5seg. 45°-1 min. 72°-1 min.</p> <p>1 ciclo 72°-7min.</p>
B	<p>1101p 5'-CTCGCCAACCTTACAAGGCCTTTC-3'</p> <p>P2 3 'CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCA TGGTGCTGG-5'</p>	<p>1101-1124 nt</p> <p>1823-1806 nt</p>	2	722 pb	<p>1 ciclo 94°c-1 min.</p> <p>43 ciclos 94°-45 5seg. 45°-1 min. 72°-1 min.</p> <p>1 ciclo 72°-7min.</p>
C	<p>2440p 5'-GCCGCGTCGCAGAAGATCTCAA-3'</p> <p>58n 3'-GAACTGGAGCCACCAGCAGG-5'</p>	<p>2440-2462 nt</p> <p>58-38 nt</p>	2	818pb	<p>1 ciclo 94°c-1 min.</p> <p>43 ciclos 94°-45 5seg. 45°-1 min. 72°-1 min.</p> <p>1 ciclo 72°-7min.</p>

Continuación. [Iniciadores utilizados para la amplificación del genoma completo del VHB].

D	1860p 5'-ACTGTTCAAGCCTCCAAGCTG-3'	1860-1881nt	2	580 pb	1 ciclo 94°c-1 min.
	2440n 3'-TTGAGATCTTCTGCGACGCGGC-5'	2440-2418 nt			43 ciclos 94°-45 5seg. 45°-1 min. 72°-1 min.
X	1101p 5'-CTCGCCAACCTACAAGGCCTTTC-3'	1101-1124 nt	1	809 pb	1 ciclo 94°c-3 min.
	1910n 3'-CRATGTCCATGYCCYAAAGC-5'	1910-1890 nt			43 ciclos 94°-45 5seg. 45°-1 min. 72°-1 min.
X1	1450p 5'-TACGTCCCCTCRGCGCTGAATC-3'	1450-1472 nt	2	410 pb	1 ciclo 94°c-3 min.
	1860n 3'-CAGCTTGGAGGCTTGAACAGT-5'	1860-1839nt			43 ciclos 94°-45 5seg. 45°-1 min. 72°-1 min.
X2	1601p 5'-GCACACCGGGATCCGAGGACTGGGGACCCT-3'	1601-1621 nt	2	259 pb	1 ciclo 94°c-3 min.
	1860n 3'-GACACCTGCAGTTAGGGTTTAAATGTATACC-5'	1860-1839nt			43 ciclos 94°-45 5seg. 45°-1 min. 72°-1 min.
					1 ciclo 72°-7min..

En todos los análisis de la PCR, la mezcla de la reacción contenía de 0,5 µl de Taq Polimerasa a 5U/µl (Invitrogen life technologies, USA) en su tampón correspondiente, 1µl de una mezcla de nucleótidos (dCTP, dGTP, dTTP, dATP) a 10mM, 1,5-2,5 µl de MgCl₂ a 50 mM y 1,5-5µl de cada iniciador a 10 mM en un volumen final de 50µl. La

reacción se llevó a cabo en un termociclador (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, USA). En todos los casos, se agregó 10µl del extracto de ADN a la mezcla de la primera ronda de PCR, y 2 µl del producto así obtenido para la segunda ronda PCR. Para efecto de este ensayo se usaron como controles positivos muestras previamente identificadas como francas positivas para el VHB y como controles negativos se usó la mezcla de reactivos sin ADN.

Los productos amplificados se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, según método previamente descrito (Sambrook & Russell, 2001) (Aparte 3.2.3). Una vez verificados la amplificación de los diferentes fragmentos solapados del genoma del VHB, se procedió a purificar y secuenciar cada fragmento (Aparte 3.4), y posteriormente se ensamblaron utilizando el programa computarizado DNAMAN versión 5.2.2 (LynnonBiosoft, USA).

3.4. Purificación y secuenciación de los productos obtenidos por PCR

Todos los productos amplificados por la PCR tanto para las regiones correspondientes al gen *s* así como las que conforman el genoma completo, fueron purificados. Para ello se utilizó un sistema rápido de purificación de productos de la PCR (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN, Alemania), Posteriormente los productos purificados fueron enviados junto con 5 pmoles de el iniciador correspondiente al Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN), del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), quienes se encargaron de determinar de manera automatizada (ABI PRISM™ Dye terminator Cycle Sequencing

ready reaction Kit; Perkin Elmer; Foster; CA, USA) las secuencias de los fragmentos amplificados, utilizando un secuenciador ABI3730XL (Applied Biosystems; Foster; CA, USA). Los alineamientos de nucleótidos y aminoácidos así como los análisis filogenéticos fueron realizados usando el programa computarizado DNAMAN versión 5.2.2 (LynnonBiosoft, USA).

3.5. Análisis filogenéticos

Con el fin de establecer las relaciones filogenéticas entre las secuencias de los aislados del VHB, las secuencias obtenidas en el presente estudio fueron editadas manualmente por inspección visual y se compararon con las secuencias prototipos de aislados del VHB. Estas últimas fueron obtenidas de la base de datos Entrez Nucleotides (www.ncbi.nlm.gov/entrez) (Tabla 3). Los árboles filogenéticos se elaboraron por el método del “vecino más cercano” (*Neighbor-joining*), basado en la matriz de distancias estimadas por el método de Kimura dos-parámetros, utilizando el programa DNAMAN versión 5.2.2. Los análisis fueron sustentados en valores de confianza (*bootstrap*) basados en 1000 réplicas.

3.5.1. Asignación de los genotipos y subgenotipos del VHB

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de cualquiera de las dos regiones del gen *s* del VHB, evaluadas en el presente estudio, fueron alineadas junto con las otras secuencias prototipos del VHB, se procedió a realizar los análisis filogenéticos (Aparte 3.5) y la asignación de los genotipos y subgenotipos correspondientes.

Tabla 3. Secuencias de genomas completos y de AgsHB, utilizadas en el presente estudio, disponible en la base de datos Entrez Nucleotides (www.ncbi.nlm.gov/entrez).

N° acceso	Nombre	Genotipo	País	N° acceso	Nombre	Genotipo	País	N° acceso	Nombre	Genotipo	País
AF297623	A1	A1	Sur África	AY311370	F3	F3	Venezuela	EF397956	Bog64	F3	Colombia
AF143300	A2	A2	Alemania	DQ899148	Yanomami	F3	Venezuela	EF397957	Bog65	F3	Colombia
EF397975	Bog31	A2	Colombia	DQ899149	Piaroa	F3	Venezuela	EF397958	Bog66	F3	Colombia
AB194951	A3	A3	Camerún	AB116549	Panama2	F3	Venezuela	EF397987	Bog67	F3	Colombia
D50521	B1	B1	Japón	AB116550	Panama1	F3	Venezuela	EF397988	Bog68	F3	Colombia
AB073825	B2	B2	China	X75663	Colombia	F3	Colombia	EF397959	Bog69	F3	Colombia
D00331	B3	B3	Indonesia	EF397970	Bog7	F3	Colombia	EF397989	Bog70	F3	Colombia
AB073835	B4	B4	Vietnam	EF397971	Bog9	F3	Colombia	EF397960	Bog71	F3	Colombia
AB033557	C1	C1	Japón	EF397983	Bog16	F3	Venezuela	EF397990	Bog72	F3	Colombia
AY217378	C2	C2	China	EF397972	Bog17	F3	Colombia	EF397961	Bog73	F3	Colombia
EF397978	Bog58	C2	Colombia	EF397973	Bog24	F3	Colombia	EF397979	Bog76	F3	Colombia
X75665	C3	C3	Nueva Caledonia	EF397984	Bog33	F3	Colombia	EF397980	Buc1	F3	Colombia
AB048704	C4	C4	Australia	EF397945	Bog34	F3	Colombia	EF397962	Buc7	F3	Colombia
AF151735	D1	D1	Alemania	EF397985	Bog36	F3	Colombia	DQ899150	Buc8	F3	Colombia
AB090268	D2	D2	India	EF397946	Bog37	F3	Colombia	EF397963	Buc10	F3	Colombia
EF397969	Bog1	D2	Colombia	EF397947	Bog41	F3	Colombia	EF397981	Buc11	F3	Colombia
EF397976	Bog40	D2	Colombia	EF397948	Bog42	F3	Colombia	EF397964	Buc12	F3	Colombia
EF397977	Bog51	D2	Colombia	EF397949	Bog49	F3	Colombia	EF397982	Buc14	F3	Colombia
EF397974	Bog26	D3	Colombia	EF397950	Bog52	F3	Colombia	EF397965	Buc16	F3	Colombia
X85254	D3	D3	Italia	EF397951	Bog55	F3	Colombia	EF397966	Buc17	F3	Colombia
AB048702	D4	D4	Australia	EF397952	Bog56	F3	Colombia	EF397967	Buc18	F3	Colombia

DQ315780	D5	D5	India	EF397953	Bog59	F3	Colombia	EF397968	Buc19	F3	Colombia
AB091256	E	E	Costa I	EF397954	Bog60	F3	Colombia	AB166850	F4	F4	Bolivia
AF223963	F1	F1	Argentina	EF397955	Bog61	F3	Colombia	AF160501	G	G	USA
AY311369	F2	F2	Venezuela	EF397986	Bog63	F3	Colombia	AY090460	H	H	USA

Las secuencias resaltadas en negritas fueron obtenidas en el presente estudio, incluyendo un genoma comple

RESULTADOS

4.1. Determinación del ADN del VHB por PCR en muestras Ags positiva

De las 126 muestras analizadas que conformaron el total de la población en estudio, se pudo determinar el ADN del VHB en 47 (37%) muestras correspondientes a las dos poblaciones colombianas ensayadas. Esta determinación fue evidenciada a través de la amplificación de por lo menos una de las dos regiones del gen *s* del VHB, evaluadas en la presente investigación, designadas experimentalmente S3 y S6-S7, las cuales arrojaron productos de aproximadamente 336 y 715 pb respectivamente (Figura 5).

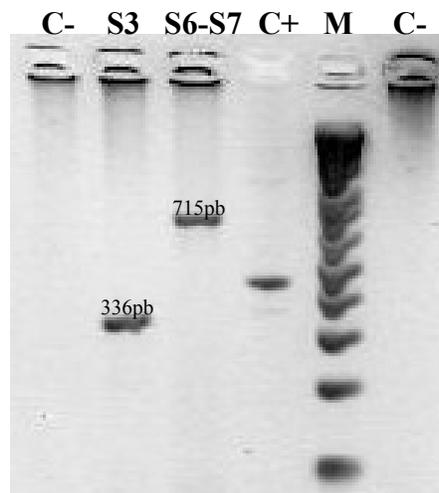


Figura 5. Electroforesis de dos regiones del gen *s* del VHB evaluadas en el presente estudio. C-: control negativo, S3: fragmento de 336 pb, S6-S7: fragmento de 715 pb, C+: control positivo y M: marcador de peso molecular.

De las 78 muestras analizadas provenientes de la población de Bogotá, 36 (46%) resultaron positivas en la determinación de ADN viral. En estas 36 muestras se logró la amplificación de la región S3, mientras que sólo en 19 (24%) se logró amplificación de la región S6-S7.

Por otra parte, de las 48 muestras analizadas procedentes de la población de Bucaramanga, 11 (23%) resultaron positivas en la determinación de ADN viral; todas estas muestras amplificaron para la región S3 y sólo cuatro (8%) mostraron amplificación para la región S6-S7. En resumen, en todos los 47/126 (37%) aislados obtenidos durante la determinación del VHB, se logró la amplificación de la región S3, mientras que para la región S6-S7 sólo 23/126 (18%) de estos aislados fueron amplificados (Tabla 4).

Tabla 4. Amplificación de dos regiones del gen *s* del VHB en aislados virales obtenidos de las dos poblaciones estudiadas.

Población	Muestras positivas		Regiones amplificadas			
			S3		S6-S7	
	N	%	N	%	N	%
Bogotá	36/78	46	36	46	19	24
Bucaramanga	11/48	23	11	23	4	8
Total	47/126	37	47	37	23	18

4.2. Caracterización molecular de los aislados del VHB

Con el fin de asignar genotipos y subgenotipos en los aislados obtenidos, todos los productos de PCR obtenidos de la amplificación de las dos regiones del gen *s* fueron secuenciados y posteriormente analizados filogenéticamente.

4.2.1. Secuenciación y análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron mediante la alineación de las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio y las 28 secuencias de referencia de todos los genotipos del VHB, depositadas en la base de datos Entrez Nucleotides (www.ncbi.nlm.gov/entrez) (Tabla 3). Cabe destacar que entre estas secuencias se encontraba la única secuencia genoma completo del VHB de origen colombiano, disponible hasta el momento en dicha base de datos, la cual fue designada como Colombia.

Como producto del proceso de edición de las secuencias obtenidas de las dos regiones del gen *s* evaluadas en este estudio, se obtuvieron 47 fragmentos de aproximadamente 317 pb (S3) y 23 de 595 pb (S6-S7).

El árbol filogenético basado en las secuencias de 317 pb (S3) permitió la asignación de los genotipos del VHB. Durante el análisis se encontró que la mayoría de estas secuencias (41/47) son genotipo F (87%), las cuales mostraron un grado de identidad del 99% con respecto a nueve secuencias de referencia del genotipo F; gran parte de estas secuencias 30/36 (83%) fueron identificadas en la población de donantes

de Bogotá y 11/11 (100%) en la población de Bucaramanga (Tabla 5).

En la población de Bogotá también fueron detectadas 4/36 secuencias genotipo D (11%), con un grado de identidad del 98,8 %, 1/36 genotipo C (3%) con un grado de identidad de 97,9 % y 1/36 genotipo A (3%) cuyo grado de identidad fue del 98,5 % (Tabla 5). Cabe destacar que los porcentajes de identidad de cada uno de estos genotipos fueron determinados al compararlos con secuencias de referencia del mismo genotipo. Las diferentes ramas del árbol filogenético, correspondientes a cada genotipo, fueron sustentadas con altos valores de bootstrap que sugieren una confiable asignación de los genotipos del VHB (Figura 6).

Tabla 5. Genotipos del VHB encontrados en la población estudiada.

Población	Muestras Secuenciadas		Genotipos							
			A		C		D		F	
			N	%	N	%	N	%	N	%
Bogotá	36/78	46	1	3	1	3	4	11	30	83
Bucaramanga	11/48	23							11	10
										0
Total	47/126	37	1	2	1	2	4	9	41	87

El árbol filogenético formado a partir de las secuencias de 595 pb (S6-S7) no sólo confirmó la formación de los grupos genotípicos, previamente evaluados, sino que también permitió agrupar eficientemente 16/41 aislados genotipo F obtenidos en este estudio, en el subgenotipo F3. Durante este análisis se logró además la agrupación subgenotípica de los genotipos A, C y D, detectados en esta población, resultando así un subgenotipo A2, un C2, tres D2 y un D3. Por otra parte, se validó la estrecha relación

entre estas secuencias y la secuencia Colombia, donde el grado de identidad fue 99,5%. Es importante resaltar que el aislado Bog36, quien fue agrupado dentro del genotipo F, no pudo ser subgenotipado durante este análisis (Figura 7).

El reciente genotipo descrito del VHB, genotipo H, no fue encontrado en esta población colombiana.

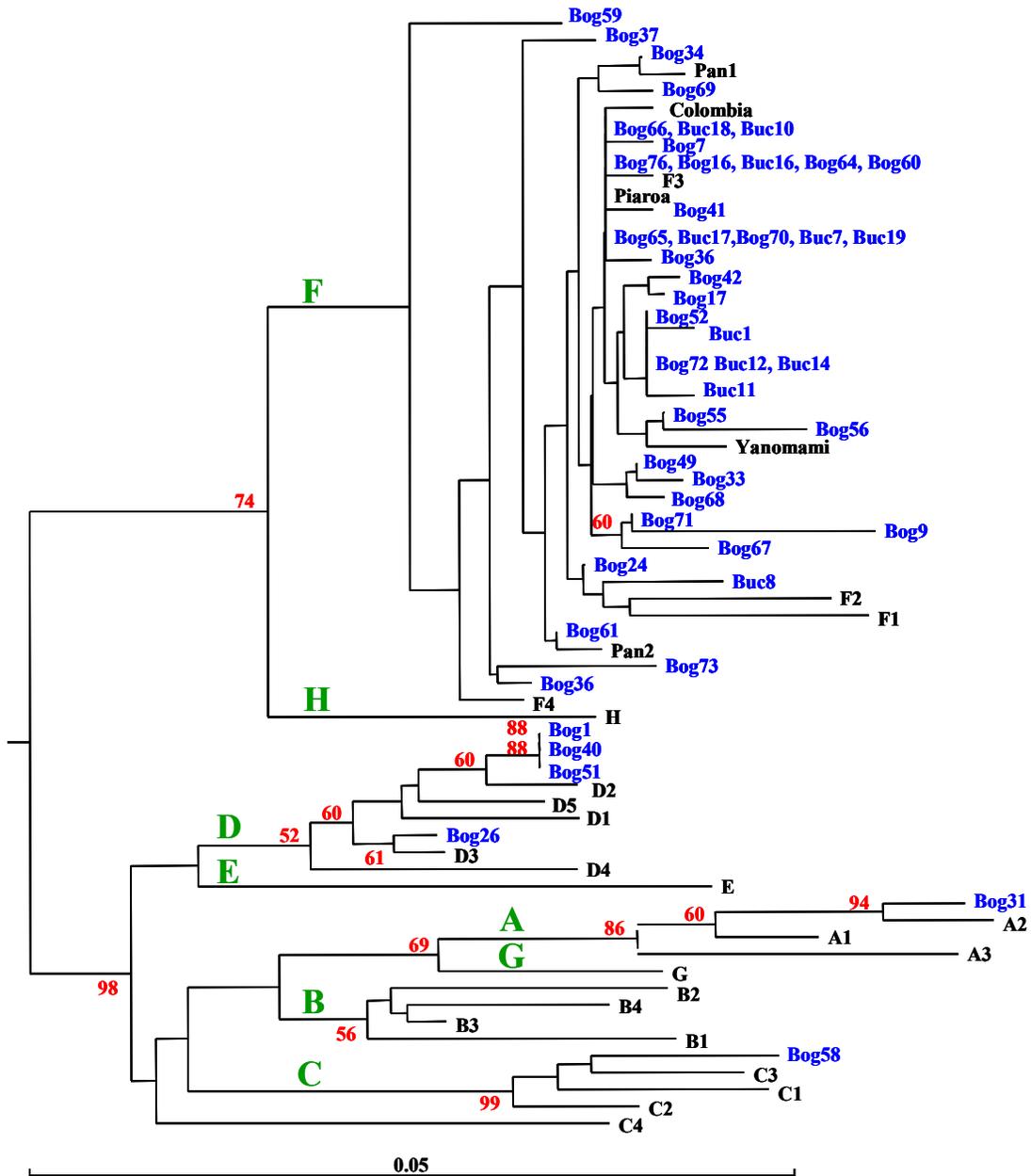


Figura 6. Árbol Filogenético (*Neighbor-joining*, Kimura dos parámetros, DNAMAN versión 5.2.2) construido a partir de fragmentos de 317pb del gen *s* del VHB. Las secuencias obtenidas en este estudio se encuentran en color azul, mientras que las secuencias de referencia se encuentran en color negro. Las letras verdes indican los diferentes genotipos del VHB y los números en rojo a los valores de bootstrap.

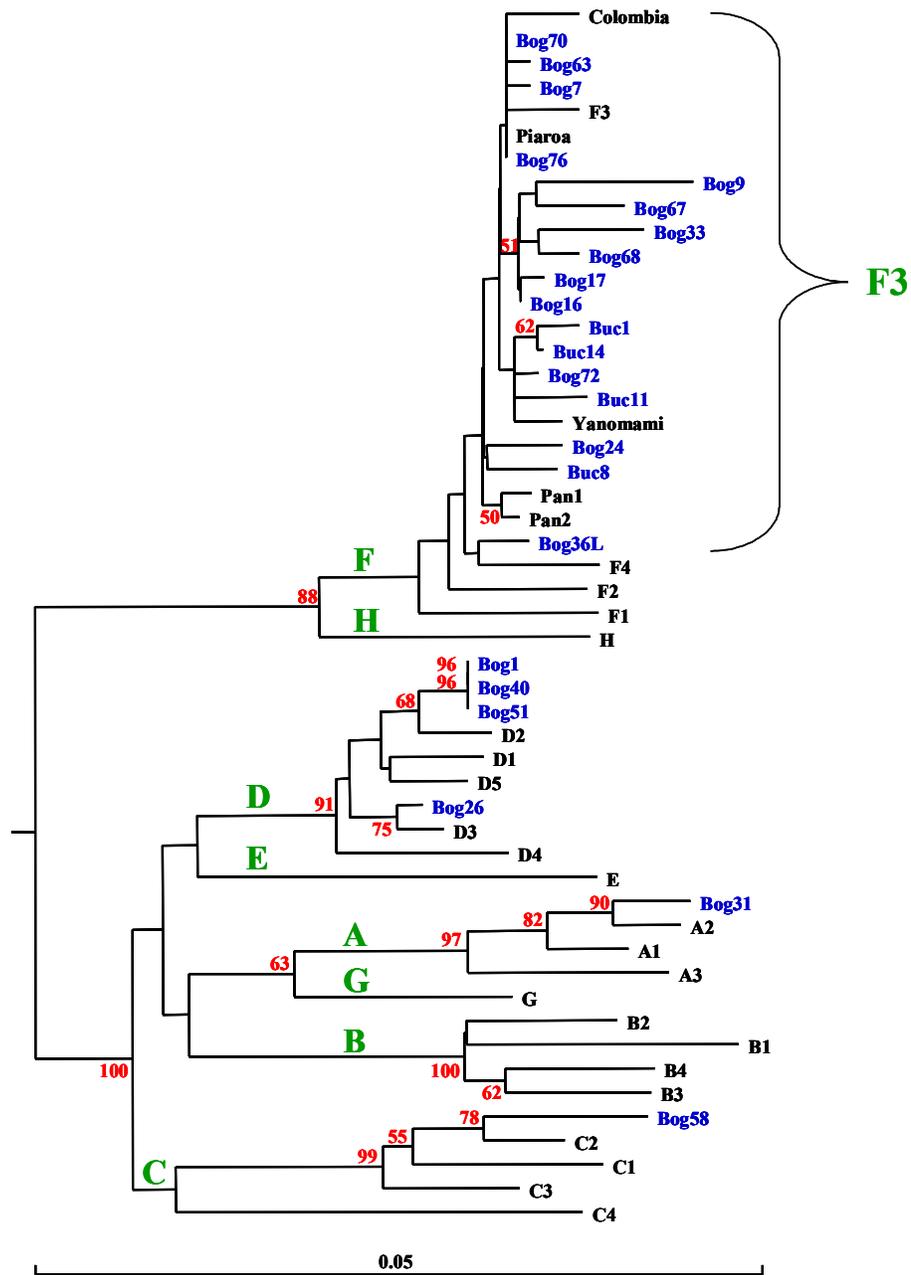


Figura 7. Árbol Filogenético (*Neighbor-joining*, Kimura dos parámetros, DNAMAN versión 5.2.2) construido a partir de fragmentos de 595 pb del gen *s* del VHB. Las secuencias obtenidas en este estudio se encuentran en color azul, mientras que las secuencias de referencia se encuentran en color negro. Las letras verdes indican los diferentes genotipos del VHB, la llave hace referencia al subgenotipo F3 y los números en rojo a los valores de bootstrap.

4.3. Amplificación por PCR del genoma completo del VHB en muestras selectas evaluadas en este estudio

Con el propósito de seguir aportando más datos que contribuyan con el estudio de diversidad genética del VHB en Colombia, se planteó la obtención de amplificadores del genoma completo en algunos aislados colombianos. Para ello un grupo de muestras selectas que resultaron positivas en la determinación del ADN del VHB, a través de la amplificación de dos regiones del gen *s* (S3 y S6-S7), fueron sometidas a distintas rondas de amplificación para obtener fragmentos de diferentes regiones del genoma del VHB.

A pesar de que muchos aislados pudieron ser amplificados en al menos una región de las evaluadas para el genoma completo, sólo en 10/126 aislados (8%) se logró la amplificación eficiente de alguna de estas regiones. De éstos, 8/78 (10%) correspondieron a la población de donantes de Bogotá y 2/48 (4%) a la población de Bucaramanga. Los amplicones obtenidos de los aislados restantes mostraron baja concentración, por lo que no fueron considerados en el proceso de secuenciación y por ende no incluidos en los resultados de este estudio.

Es importante destacar que sólo en 1/126 aislado (1%) de la población total se pudo amplificar eficientemente todas las regiones correspondientes al genoma completo, el cual pertenecía a la población de Bucaramanga y fue designado como Buc8.

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de las distintas regiones que conformaron la estrategia de amplificación de genomas completos fueron secuenciados y

posteriormente analizados filogenéticamente.

4.3.1. Secuenciación y análisis filogenético de genomas completos del VHB

Los resultados del proceso de edición de las secuencias obtenidas de las regiones amplificadas para genoma completo, arrojaron 10 fragmentos de aproximadamente 1291 pb y un genoma completo (3,2 kb). Durante el análisis filogenético de fragmentos de 1291 pb se pudo observar que todas estas secuencias correspondieron a aislados subgenotipo F3, incluyendo el aislado Bog36. Este grupo subgenotípico fue sustentado con un alto valor de bootstrap que permitió una confiable subgenotipificación. Es importante señalar en el análisis la estrecha relación filogenética que se observó dentro de este grupo, a pesar de que el aislado Colombia se separó un poco del mismo (Figura 8). Esta distribución se continuó observando en el árbol filogenético formado a partir de las secuencias de genomas completos de varios aislados del VHB, en el cual se observa aislado Buc8, obtenido en este estudio, relacionarse más con los aislados de origen panameños que con el aislado Colombia (Figura 9).

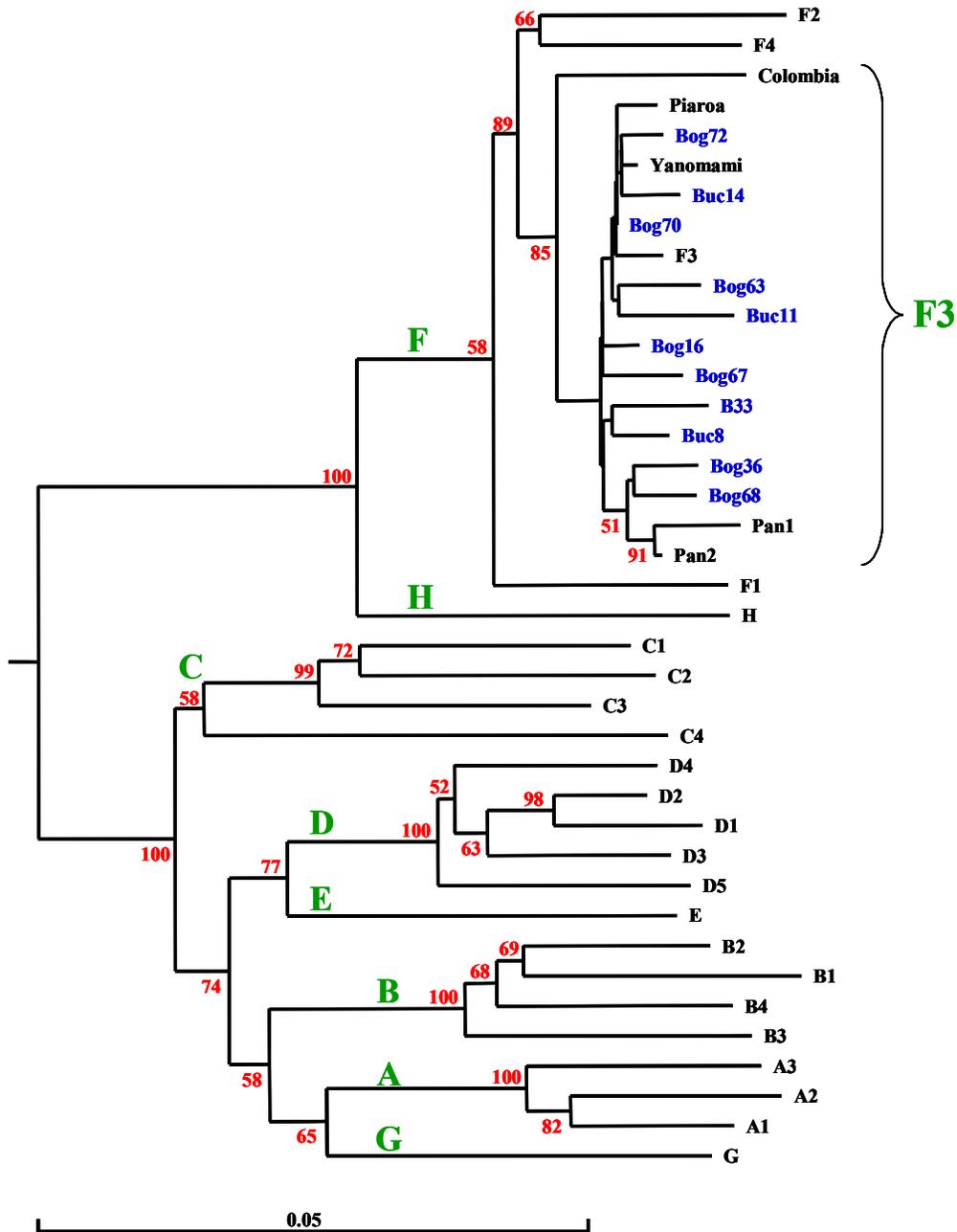


Figura 8. Árbol Filogenético (*Neighbor-joining*, Kimura dos parámetros, DNAMAN versión 5.2.2) construido a partir de fragmentos de 1291 pb del genoma del VHB. Las secuencias obtenidas en este estudio se encuentran en color azul, mientras que las secuencias de referencia se encuentran en color negro. Las letras verdes indican los diferentes genotipos del VHB, la llave hace referencia al subgenotipo F3 y los números en rojo a los valores de bootstrap.

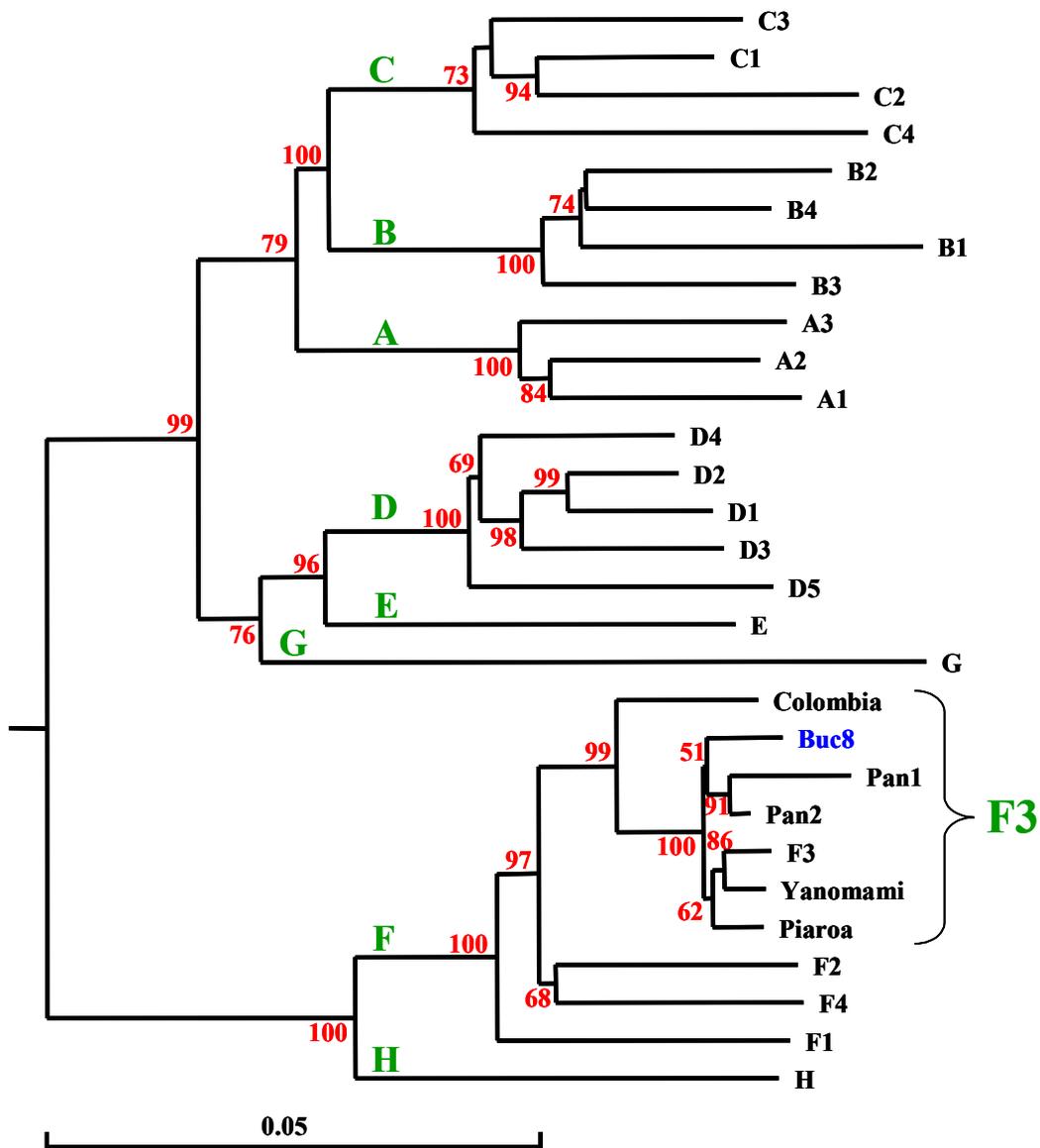


Figura 9. Árbol Filogenético (*Neighbor-joining*, Kimura dos parámetros, DNAMAN versión 5.2.2) construido a partir de genomas completos del VHB. La secuencia obtenida en este estudio se encuentra en color azul, mientras que las secuencias de referencia se encuentran en color negro. Las letras verdes indican los diferentes genotipos del VHB, la llave hace referencia al subgenotipo F3 y los números en rojo a los valores de bootstrap.

4.4. Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos formado a partir de los productos de dos regiones del gen *s* permitió mostrar sustituciones genotipo específico y regiones conservadas entre los residuos 105-155 y 1-20, los cuales incluyen el determinante “a” (residuos 122-147) y el dominio de fusión (residuos 7-18) de la proteína S respectivamente. Las cuatro cisteínas importantes para la conformación de la estructura terciaria del AgsHB, ubicadas en las posiciones 124, 137, 139 y 149, se mantuvieron conservadas. En la región entre los residuos Cys139 - Cys147 que conforman la segunda asa del determinante “a”, se observaron dos sustituciones previamente reportada como sustituciones genotipo específico; éstas correspondieron a los residuos Thr140Ser y Thr143Ser. Estas sustituciones fueron observadas en el 98% de los aislados genotipo F y en el 98% de los aislados obtenidos en este estudio, incluyendo la secuencia molde, respectivamente. Es importante resaltar que la sustitución Thr140Ser ha sido reportada para los genotipos E y F, mientras que Thr143Ser ha sido descrita para los genotipos C, D, E, F y H (Norder *et al.*, 2004). Durante este análisis no se observaron mutantes de escape a la vacuna, las cuales frecuentemente se caracterizan por una sustitución Gly145Arg y Asp144Ala que provocan un cambio de conformación en el determinante “a”, previniendo así la unión de anticuerpos neutralizantes al AgsHB (Devesa & Pujol 2007) (Figura 10).

El análisis en las secuencias del genotipo F permitió observar secuencias bien conservadas, en lo que respecta a la región que incluye el determinante “a” excepto una sustitución Leu110Iso, observada en el aislado Bog73, característica del subgenotipo F4

y frecuentemente encontrada en los genotipos A, B, D y E (Huy *et al.*, 2006). Las sustituciones observadas en los genotipos A, C y D, durante el análisis de esta región, resultaron ser cambios característicos de los mismos (Blitz *et al.*, 1998) (Figura 10).

El análisis correspondiente al dominio de fusión de la proteína S permitió observar secuencias conservadas en la región que comprende el sitio susceptible a proteasa (residuos 2-16). Sin embargo, en todas las secuencias genotipo F se exhibieron dos sustituciones (Gly18Val y Gly19Cys) previamente descritas para estos genotipos (Devesa *et al.*, 2004; Norder *et al.*, 2004) (Figura 11).

El motivo YMDD, ubicado en el dominio TR (transcripción reversa) de la polimerasa del VHB, el cual es alterado (sustitución Met550Iso/Val) en muchas ocasiones tras la aplicación de terapias antivirales con Lamivudina, se encontró conservado en todas las secuencias analizadas para esta región (Figura 12).

Determinante “a”

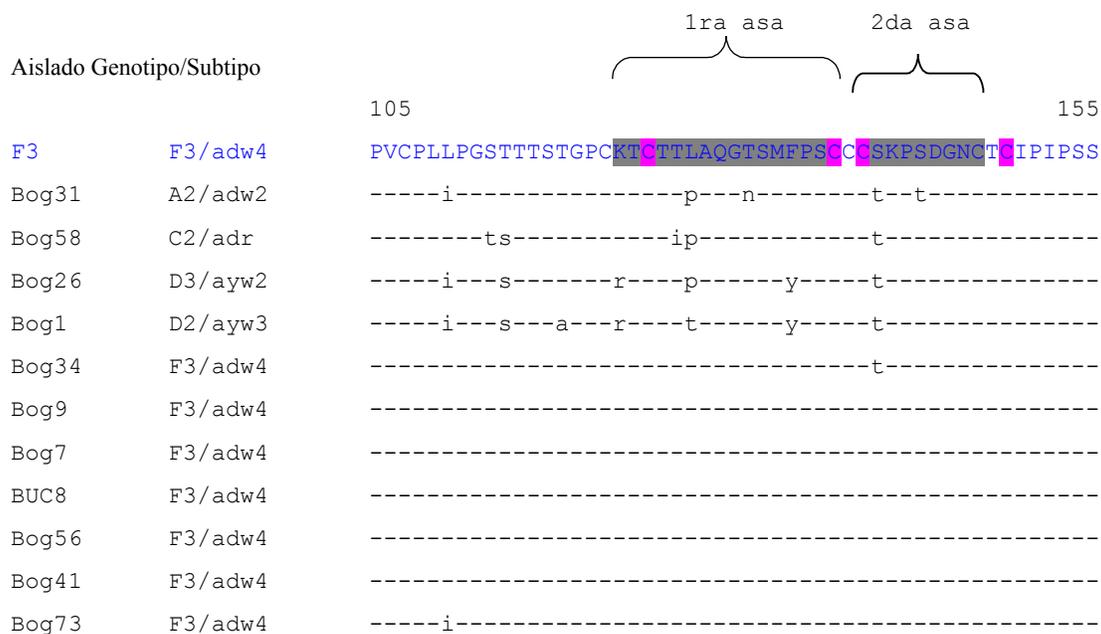


Figura 10. Alineación de secuencias aminoacídicas de la región correspondiente al determinante “a” (residuos 122-147) del AgsHB. Los aislados señalados son un grupo representativo del patrón de secuencia analizada. La secuencia en azul (secuencia molde) corresponde a un aislado venezolano, los aminoácidos en rosados hace referencia a las cisteínas importantes en la estructura terciaria del AgsHB. En la alineación se indican solo las diferencias.

Aislado Genotipo/subtipo

Dominio de Fusión

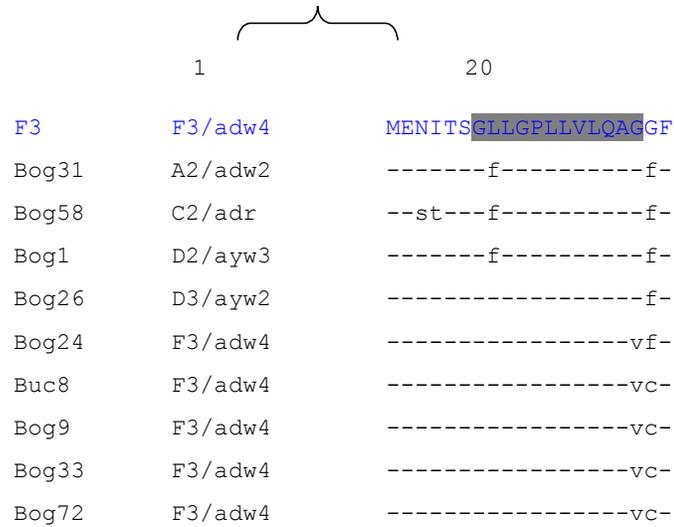


Figura 11. Alineación de secuencias aminoacídicas de la región correspondiente al dominio de fusión (residuos 7-18) del AgsHB. Los aislados señalados son un grupo representativo del patrón de secuencia analizada. La secuencia en azul (secuencia molde) corresponde a un aislado venezolano. En la alineación se indican solo las diferencias.

		Aislado Genotipo/subtipo	
		180	209
F3	F3/adw4	LAQFTSAICSVVRRAFP	YMDDLVL
Bog31	A2/adw2	-----	-----v--
Bog58	C2/adr	-----	-----v--
Bog1	D2/ayw3	-----	-----v--
Bog26	D3/ayw2	-----	-----v--
Buc8	F3/adw4	-----	-----
Bog63	F3/adw4	-s-----	-----
Buc1	F3/adw4	---l-----	-----
Bog9	F3/adw4	-----s-----	-----vi-----..

Figura 12. Alineación de secuencias aminoacídicas de la región correspondiente al motivo YMDD del dominio RT de la proteína polimerasa del VHB. Los aislados señalados son un grupo representativo del patrón de secuencia analizada. La secuencia en azul (secuencia molde) corresponde a un aislado venezolano. En la alineación se indican solo las diferencias.

Debido a que durante este estudio sólo se pudo obtener un sólo genoma completo del VHB y que no se obtuvieron fragmentos grandes que correspondieran a la región pre-core/core del VHB, el análisis de esta región sólo se realizó en el único genoma completo amplificado en esta población (aislado Buc8) y en los aislados prototipos genotipo F (F1, F2, F3, F4, Colombia, Panamá 1 y 2, Yanomami y Piaroa). Es importante recordar que los aislados Colombia, Panamá 1 y 2, Yanomami y Piaroa son subgenotipo F3 (Figura 9).

Un análisis comparativo en las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región pre-core/core de los aislados previamente mencionados, permitió observar secuencias relativamente conservadas en los que respecta a esta región (Figura 13). En los aislados subgenotipo F2 y F3 no se registraron ninguna de las mutaciones reportadas

para esta región (Anexo 1), incluyendo la mutante precore G1896A y la mutación C1858T, además de observar el promotor básico del core (PBC) tipo silvestre (A1762/G1764). Una excepción fue observada en los aislados subgenotipos F1 y F4; En éstos se encontraron la mutación C1858T, mientras que la mutante precore G1896A sólo se pudo evidenciar en el aislado F4. Es importante resaltar que en ambos subgenotipos se detectaron mutaciones en el promotor básico del core (A1762T/G1764A) (Figura 13).

Los diferentes genotipos determinados en este estudio fueron subtipificados, mediante el uso de una tabla guía reportada por Blitz *et al.* (1998), la cual hace referencia de algunas sustituciones aminoacídicas, de la proteína S, genotipo y subtipo específico. Las sustituciones subtipo específico fueron reportadas en las posiciones 122, 127 y 160 de la proteína S. Durante este análisis se encontró que todos los aislados genotipo F (100%) resultaron subtipo adw4 (Lys122, Leu127 y Lys160), 3/4 de los aislados genotipo D resultaron subtipo ayw3 (Arg122, Thr127 y Lys160) y el aislado restante subtipo ayw2 (Arg122, Pro127 y Lys160), mientras que los aislados genotipo A y C resultaron ser subtipos adw2 (Lys122, Pro127 y Lys160) y adr (Lys 122, Pro127 y Arg160) respectivamente.

Aislado Genotipo/Subtipo		1760	1813
COLOMBIA	F3/adw4	AAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATGGTCTGTTCACCAGCACC	
F1	F3/adw4	--t-a-----t-----	
F2	F3/adw	-----	
F3	F3/adw4	-----	
Buc8	F3/adw4	-----a-----	
PANAMA1	F3/adw4	-----	
PANAMA2	F3/adw4	-----	
PIAROA	F3/adw4	-----	
YANOMAMI	F3/adw4	-----	
F4	F3/adw4	--t-a--a-----	

Aislado Genotipo/Subtipo		1814	1867
COLOMBIA	F3/adw4	ATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCACTGTTCAA	
F1	F1/adw4	-----t-----t-----	
F2	F2/adw4	-----t-----	
F3	F3/adw4	-----t-----	
Buc8	F3/adw4	---g-----t-----	
PANAMA1	F3/adw4	-----t-----	
PANAMA2	F3/adw4	-----t-----	
PIAROA	F3/adw4	-----t-----	
YANOMAMI	F3/adw4	-----a-----t-----	
F4	F4/adw4	-----t-----t-----	

Aislado Genotipo/Subtipo		1868	2003
COLOMBIA	F3/adw4	GCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGGCATG	
F1	F1/adw4	-----	
F2	F2/adw4	-----	
F3	F3/adw4	-----	
Buc8	F3/adw4	-----	
PANAMA1	F3/adw4	-----	
PANAMA2	F3/adw4	-----	
PIAROA	F3/adw4	-----	
YANOMAMI	F3/adw4	-----	
F4	F4/adw4	-----a-----	

Figura 13. Alineación de secuencias nucleotídicas correspondiente a la región pre-core/core (residuos 1760-2003) del VHB. Las secuencias señaladas pertenecen a aislados de referencia, excepto el asilado Buc8 que fue obtenido en la presente investigación. La secuencia en azul (secuencia molde) corresponde a un aislado colombiano. En la alineación se indican solo las diferencias

DISCUSIÓN

A pesar de que existe una vacuna efectiva contra el VHB, este virus está globalmente distribuido. Alrededor de dos millardos de personas en el mundo han sido infectados con el VHB, de los cuales 350-400 millones de éstos son portadores crónicos (McMahon *et al.*, 2005). Este virus es el responsable de una importante enfermedad hepática con propensión a hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC) (Zukerman & Zukerman, 2000).

La heterogeneidad genética de las variantes del VHB que infectan humanos está basada en una divergencia mínima del 8%, entre las secuencias del genoma completo. Este dato ha permitido su clasificación en los ocho genotipos descrito hasta ahora (A-H) (Norder *et al.*, 2004).

Los genotipos F y H son conocidos como los genotipos americanos y los más divergentes del resto de los genotipos del VHB (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002). El genotipo F es altamente predominante en poblaciones amerindias y se ha encontrado con alta frecuencia en diversos países suramericanos, particularmente en Venezuela, Bolivia, Argentina y Colombia (Blitz *et al.*, 1998; Devesa *et al.*, 2007; Huy *et al.*, 2006; Telenta *et al.*, 1997), y América Central (Arauz-Ruiz *et al.*, 1997., Sánchez *et al.*, 2002).

Aún cuando el genotipo F se ha reconocido como un genotipo americano, éste ha sido aislado de pacientes de Francia, Holanda, Italia, España, Polonia y Japón (Devesa &

Pujol, 2007); Al mismo tiempo que otros genotipos diferentes de F y H se han hallados en América. En Argentina se han encontrado los genotipos A, B y D (Franca *et al.*, 2004; Telenta *et al.*, 1997; Piñeiro *et al.*, 2008). En Brasil los genotipos A, B, C y D han sido detectados, siendo A y D los más prevalentes, B y C descrito en pacientes de origen asiático (Sitnik *et al.*, 2004), En Venezuela los genotipos A y D han sido reportados hasta en comunidades Amerindias (Devesa *et al.*, 2004; Devesa *et al.*, 2008), mientras que en Centro América, además de encontrarse circulando los genotipos A y D, se ha detectado el genotipo G (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2002).

Los resultados emitidos por la presente investigación representan la primera información acerca de la diversidad genética del VHB en Colombia. La falta de información acerca de las historias clínicas de los pacientes que conformaron la población de estudio, sólo permitió discutir estos datos con lo reportado en la bibliografía, de tal manera que se restringió la discusión de éstos con las experiencias clínicas y epidemiológicas de los donantes.

Aunque todas las muestras que conformaron la población de estudio presentaban una serología positiva para el AgsHB, no se pudo determinar el ADN viral en el total de las muestras analizadas; esto podría estar influenciado por diversos factores externos. La temperatura de almacenaje de las muestras es un factor a destacar, ya que éstas durante su transporte al laboratorio no fueron refrigeradas a la temperatura adecuada. Es posible que este acontecimiento haya alterado la calidad del ADN viral, originando así condiciones adversas que probablemente interfirieron en el ensayo molecular.

Falsos positivos detectados por el ensayo serológico y la carga viral, son también factores a considerar durante el análisis de los resultados. Este último se ve reflejado en los diferentes estadios de la infección por el VHB. La ausencia de historias clínicas, como la de una evaluación serológica para el antígeno “e” (AgeHB), permitieron solamente sugerir ciertos eventos asociados a una baja carga viral, entre los que se destaca: 1) La posibilidad de que las muestras estudiadas hayan sido tomadas de pacientes con hepatitis crónica portadores AgsHB, seroconvertidos (AgeHB a antiAgeHB). 2) Que se haya puesto de manifiesto lo previamente reportado para el genotipo F, donde se ha descrito su circulación con una tasa de replicación relativamente baja (Devesa *et al.*, 2004), considerando que F resultó ser el genotipo más prevalente de la población estudiada. Finalmente se cree que una alta carga viral (en este caso) es bien importante para el desarrollo de la PCR, ya que se requiere de una buena cantidad de virus que ayude a aumentar la sensibilidad del ensayo.

El análisis filogenético formado a partir de secuencias 317 pb del gen *s*, permitió observar, en las dos poblaciones estudiadas, la predominancia del genotipo F sobre otros genotipos (A, C y D), dato que está en estrecha relación con la distribución geográfica que se ha venido reportando para este genotipo. Aún cuando los genotipos F y H comparten ciertas características, el genotipo H no fue detectado en la población evaluada, sugiriéndose así una restringida distribución en el Norte y el Centro de América (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002).

A pesar de lo pequeño que resultaron los fragmentos obtenidos por los iniciadores S3s-S3as (317pb), fue evidente observar durante su análisis, la agrupación bien definida

de cada uno de los genotipos del VHB. El acoplamiento de estos iniciadores al ADN del virus, encierra una región bastante conservada del gen *s* de los *Orthohepadnavirus* (Schaefer *et al.*, 2003); que permite obtener por PCR un buen fragmento para la asignación eficiente de genotipos.

El árbol filogenético formado a partir de las secuencias 595 pb, obtenidas tanto en este estudio como las suministradas por la base de datos, además de confirmar el genotipaje previamente evaluado, permitió la distribución del genotipo F en cuatro grupos diferentes recientemente propuestos como subgenotipos F1, F2, F3 y F4 (Huy *et al.*, 2006). Durante este análisis 16/17 aislados colombianos, que resultaron genotipo F, fueron agrupados dentro del subgenotipo F3. Estos resultados concuerdan con la distribución geográfica que se ha descrito para los diferentes subgenotipos de F, donde F3 junto con los subgenotipos F1a y F4 exhiben una distribución geográfica restringida en el Norte de Suramérica, Centro América y en el Sur de Suramérica, respectivamente, mientras que los subgenotipos F1b y F2 se encuentran dispersos en el continente (Devesa *et al.*, 2004; Huy *et al.*, 2006).

Es importante resaltar que parte del producto de la región S6-S7 (fragmento 595pb) contenían la misma secuencia obtenida en la región S3. Esta última a diferencia de la región S6-S7 mostró tener mayor sensibilidad en los ensayos de PCR. Sin embargo, los productos de la región S6-S7 por ser más grandes y aportar un poco más de información, conllevaron a una confiable subgenotipificación del VHB. En resumen, se podría recomendar el uso de los iniciadores S3s-S3as en pruebas diagnósticas del VHB y asociar parte de la sensibilidad de la técnica de la PCR con el tamaño de los productos

generados durante la misma.

Por otra parte, el análisis filogenético de los fragmentos de 1291 pb del genoma del VHB, permitió la subclasificación del aislado Bog36 en el subgenotipo F3, demostrando cuan importante es el tamaño de un fragmento en los estudios de diversidad genética. La ubicación del aislado Colombia dentro del árbol filogenético de 1291pb fue confirmado en el análisis basado en genomas completos, donde se continuó observando la estrecha relación entre el asilado Buc8 con los aislados de origen panameños. Más allá de la curiosidad que este evento despierta, está la posibilidad a que se deba al tiempo que tiene la cepa Colombia aislada, sugiriendo así cambios genéticos en las cepas del VHB circulantes en Colombia.

La predominancia del genotipo F en América, específicamente en el Sur de esta región, ha sido tema de amplia investigación, en el que se han propuesto diversas hipótesis que explican su aparición en el continente. Se cree que este genotipo entró al continente hace unos 15.000 – 20.000 años, con los primeros pobladores de América (ancestros amerindios) procedentes de Asia, a través del estrecho de Bering. Probablemente el movimiento hacia el Sur del continente se realizó por la costa, a causa de una unión glacial que prohibió su entrada a Norteamérica, facilitando su rápida expansión a Suramérica. Posteriormente hace unos 12.500 años una segunda migración, hacia el Centro y el Norte de América, pudo haber ocurrido a través de una ruta interna (Campos *et al.*, 2005).

Una hipótesis alternativa ha sido postulada, ésta plantea la posibilidad de que las

cepas del VHB humana hayan emergido mediante zoonosis. De tal manera que las cepas del VHB del viejo mundo pudieron haber derivado de cepas del VHB simia originarias de África y Asia, mientras que los genotipos del VHB americanos surgieron de hepadnavirus que infectan a monos del Nuevo Mundo (Devesa & Pujol, 2007).

La alta frecuencia con la que se presenta el genotipo F en Suramérica podría ser el reflejo del grado de mezcla étnica que ha experimentado esta población durante años, donde la contribución maternal del reservorio de genes amerindios se ha mantenido en muchos países latinoamericanos. En Venezuela (Devesa *et al.*, 2008) y más recientemente en Colombia (resultados del presente estudio), donde se ha observado una predominancia del genotipo F superior al 80%, la mayoría del ADNmt es de origen amerindio (Bedoya *et al.*, 2006; De Castro comunicación personal).

Un estudio de demografía genética de Antioquia (Colombia) y el Valle Central de Costa Rica (VCCR) también reporta una importante contribución del ancestro amerindio femenino, a diferencia del ancestro masculino donde predomina el origen europeo. Durante este análisis se comparó la frecuencia del ADNmt de los cuatro linajes principales de nativos americanos, en varias poblaciones latinoamericanas, encontrándose una alta predominancia del aporte amerindio en Antioquia (90%), VCCR (83%) y en el norte del centro de México (90%); En contraste con varias zonas de Brasil en las que se registraron bajas frecuencias de la contribución amerindia (25%-54%) (Carvajal *et al.*, 2003) y en donde se han descrito una significativa contribución de ADNmt africano (Carvalho *et al.*, 2001). Este último dato se correlaciona con la predominancia del genotipo A sobre F en este país.

Por otra parte en Argentina, las diferencias encontradas en el predominio de los genotipos del VHB, en el norte de la región (genotipo F) versus a la región metropolitana (genotipo D) parece obedecer al acervo aborigen (Piñeiro *et al.*, 2008) y al componente europeo (Avena *et al.*, 2001) circulante en ambas regiones respectivamente.

La aparición en el continente americano de otros genotipos distintos de F, como los genotipos A, C y D detectados en la población colombiana, podría estar asociado a las diferentes olas migratorias que se han dado a partir de otras áreas geográficas hacia esta región (Campos *et al.*, 2005).

Un número importante de mutaciones, deleciones e inserciones han sido descritos para el VHB. Estas son producidas en muchos casos durante el curso natural de la infección, en infecciones crónicas o post tratamientos. El surgimiento de diferentes variantes genéticas generadas por cualquiera de estos cambios, ha despertado un elevado interés tanto clínico como epidemiológico. Los resultados obtenidos de los diferentes análisis, evaluados en la presente investigación, muestran secuencias aminoacídicas bastante conservadas, en lo que respecta a las diversas regiones ensayadas (determinante “a”, péptido de fusión y motivo YMDD); Excepto la sustitución Leu110Iso, observada en el aislado Bog73 (subgenotipo F3), característica del subgenotipo F4 y previamente correlacionada con la mutación C1858T (Huy *et al.*, 2006).

Los resultados del análisis comparativo realizado en las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región precore/core, concuerdan con las observaciones descritas en esta región. En ésta se pudo notar una diferencia en la aparición de algunas mutaciones

con respecto a los subgenotipos de F. La mutante precore G1896A que no fue observada en los subgenotipos F2 y F3, en F4 se detectó a través de un cambio TGG (codón 28) que codifica para Trp a un codón stop (TAG); el cual se ha descrito que previene la expresión del AgeHB sin afectar la producción del antígeno de la cápside (AgcHB), promoviendo así la persistencia viral y la progresión a cronicidad (Brunetto *et al.*, 1989; Devesa & Loureiro, 2000).

La frecuencia con que se presenta esta mutante varía en los diferentes genotipos, al mismo tiempo de estar asociada en muchos casos con la mutación C1858T que se opone al nucleótido G1896 en el tallo de la señal de encapsidación (estructura epsilon, ϵ). La presencia del nucleótido C1858, observada en los subgenotipos F2 y F3, generalmente ha sido descrita en los genotipos A, F, H y en algunos genotipos C, donde la aparición de la mutante precore G1896A se encuentra restringida debido al efecto desestabilizador en el tallo de la señal encapsidación. (Li *et al.*, 1993; Alesting *et al.*, 2001). Sin embargo, en el genotipo F se han reportado ambas mutaciones (C1858T, G1896A) en aislados procedentes de América Central (subgenotipo F1) (Norder *et al.*, 2003) y en aislados provenientes del Sur de Sur América [subgenotipo F4 (Argentina y Bolivia) (Franca *et al.*, 2004; Huy *et al.*, 2006)]; pero no en aislados del Norte de Suramérica [(Subgenotipo F3 (Venezuela y Colombia)] (Devesa *et al.*, 2007). En los genotipos B, D, G, E y C1 generalmente también se describen ambas mutaciones.

Las secuencias prototipos F1 y F4 utilizadas en este estudio, por su parte, presentaron una (C1858T) o ambas (C1858T, G1896A) mutaciones respectivamente, además de ser portadores de mutaciones en el PBC (A1762T/G1764A).

Una relación entre genotipos del VHB, la evolución de una enfermedad hepática severa [como cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC)] y la aparición de mutantes precore, mutaciones C1858T o mutaciones en el PBC ha sido ampliamente reportada.

Las infecciones por el genotipo B ha mostrado tener una asociación en el desarrollo de CHC en pacientes jóvenes, mientras que las infecciones con el genotipo C se encuentra más relacionado a la aparición de cirrosis hepática (Kao *et al.*, 2000). Ding *et al.*, 2006, en un estudio realizado en China revelaron que las infecciones con genotipo C son más severas que las infecciones con genotipo B. La presencia de mutaciones en el PBC por su parte ha sido asociada con el desarrollo de CHC en infecciones con algunos de estos dos genotipos, mientras que la mutante precore y su estrecha relación en la aparición de las mutaciones C1858T también juegan un papel importante en el desarrollo de CHC.

Aún cuando en el genotipo F se ha descrito la aparición de estas mutaciones, existe poca información con respecto a este genotipo y la progresión de una enfermedad hepática severa. Sin embargo un estudio describió que las muertes causada por una enfermedad hepática, se asociaba con mayor frecuencia en infecciones con el genotipo F que infecciones con los genotipos A o D (Sánchez-Tapias *et al.*, 2003).

Recientemente se ha reportado una significativa asociación entre el genotipo F y el desarrollo de CHC en pobladores nativos de Alaska, con infecciones crónicas por el VHB. En ese estudio no se encontró una asociación significativa entre CHC y mutaciones en el PBC o mutantes precore, las cuales podrían estar relacionadas con el

desarrollo de CHC en infecciones con algunos genotipos del VHB pero no en infecciones con el genotipo F (Livingston *et al.*, 2007). Sin embargo, tanto en Venezuela como en Colombia, donde prevalece el genotipo F sobre otros genotipos, no existe una preponderancia a CHC (Navas y Pujol comunicación personal). Es posible que otros factores, como el consumo de alcohol, estén favoreciendo la aparición del CHC en Alaska; Además que el subgenotipo prevalente en esa región es F1, mientras que en Venezuela y Colombia predomina F3.

Es necesario profundizar estudios de diversidad genética del VHB en diferentes países de América Latina, a fin de aportar más información que ayude esclarecer la filogenia y la historia evolutiva del virus. Además estos datos contribuirían con los estudios relacionados al grado de virulencia del VHB y asociar la divergencia viral reportada, con los diferentes patrones de migración experimentados en Suramérica, con ciertas costumbres culturales y factores socio-económicos que rigen la transmisión del VHB en algunos países de esta región.

CONCLUSIONES

Se evidenció la sensibilidad de los iniciadores S3s-S3as ante los iniciadores S6-S7, en la determinación del ADN del VHB, por lo que se recomienda el uso de estos iniciadores en pruebas diagnósticas del VHB.

Las regiones S3 y S6-S7, permitieron la asignación eficiente de genotipos y subgenotipos del VHB respectivamente, sugiriéndose así una asignación genotípica y subgenotípica relacionada al tamaño de los productos amplificados.

El análisis filogenético realizado en los fragmentos de 1291 pb confirmó la subgenotipificación previamente observada, además de permitir la asignación subgenotípica del aislado Bog36 en una evaluación basada en altos valores bootstraps.

El árbol filogenético de los genomas completos del VHB sugirió cambios genéticos en las cepas del VHB circulantes en Colombia.

Los altos valores de bootstrap en los análisis filogenéticos, soportan la presencia de 41 genotipos F (17 subgenotipo F3) 3 D2, 1 D3, 1 A2 y 1C2.

Todas las secuencias genotipo F (subgenotipo F3) se encuentran estrechamente relacionada con la única secuencia del VHB colombiana (aislados Colombia), lo que concuerda con la distribución geográfica reportada para el genotipo F y el subgenotipo F3.

La presencia de los genotipos A, C y D en la población estudiada podría estar

asociada a las diferentes olas migratorias que se han dado hacia esta parte del continente.

Existe una alta predominancia del genotipo F sobre otros genotipos (A, C y D) en la población colombiana estudiada, lo cual concuerda con el fuerte acervo genético amerindio que mantiene la población.

BIBLIOGRAFÍA

- Alesting, E., Hannoun, C., Horal, P. & Lindh, M. 2001. Phylogenetic origin of hepatitis B virus strains with precore C-1858 variant. J. Clin. Microbiol. 39:2300-3203.
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. & Magnius, L. 2002. Genotype H: a new Ameridian genotype of hepatitis B revealed in central America. J. Gen. Virol., 83: 2059-2073.
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Visona, K. A. & Magnius, L. O. 1997. Genotype F prevails in HBV infected patients of Hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. J. Med. Virol., 51: 305-312.
- Avena, S. A., Goicoechea, A. S., Dugoujon, J.M., Slepoy, M. G., Slepoy, A.S. & Carnese FR. 2001 Análisis antropogenético de los aportes indígena y africano en muestras hospitalarias de la Ciudad de Buenos Aires. Rev Arg Antr Biol., 3:79-99.
- Bedoya, G., Montoya, P., Garcia, J., Soto, I., Bourgeois, S., Carvajal, L., Labuda, D., Alvarez, V., Ospina, J., Hedrick, P.W. & Ruiz-Linares, A. 2006. Admixture dynamics in Hispanics: a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103: 7234–7239.
- Blitz, L., Pujol, F. H., Swenson, P., Porto, L., Atencio, R., Araujo, M., Costa, L., Monsalve, D., Torres, J., Fields, H., Lambert, S., Van Geyt, C., Norder, H., Magnius, L., Echevarria, J. & Stuyver, L. 1998. Antigenic diversity of hepatitis

- strains of genotype F in ameridians and other population groups from Venezuela. J. Clin. Microbiol., 36(3): 648-651.
- Bouchard, M. J. & Schneider, R. J. 2004. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. J. Virol. 78:12725-12734.
- Brunetto, M., Stemler, M., Schödel, F., Will, H., Ottobrelli, A., Rizzeto, M. & Bonino, F. 1989. Identification of HBV variants wich cannot produce precore derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. Ital. J. Gastroenterol., 21:151-154.
- Bruss, V. 2004. Envelopment of the Hepatitis B Virus nucleocapsid. Virus Res., 106:199-209.
- Campos, R., Mbayed, V., Pineirro, F. & Leone. 2005. Molecular epidemiology of hepatitis B in Latin America. J. Clin. Virol. 34(2):8-13.
- Carvajal, L., Ophoff, R., Service, S., Hartiala, J., Molina, J., Leon, P., Ospina, J., Bedoya, G., Freimer, N. & Linares, A. 2003. Genetic demography of Antioquia (Colombia) and the Central Valley of Costa Rica. Hum Genet., 112: 534–541.
- Carvalho-Silva, D., Santos, F., Rocha, J. & Pena, S. 2001. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. Am. J. Hum. Genet., 68:281–286.
- Devesa, M. & Loureiro C. 2000. Variabilidad genética del virus de la Hepatitis B y sus implicaciones. Act. Cient. Soc. Ven. Bioanal. Especial., 6(1-2): 13-28.

- Devesa, M., Loureiro, C.L., Rivas, Y., Monsalve, F., Cardona, N., Duarte, M.C., Poblete, F., Gitierrez, M. F. & Pujol, F.H. 2008. Subgenotype diversity of hepatitis B virus american genotype F ameridians from Venezuela and the general population Colombia. J. Med. Virol., 80:20-26.
- Devesa M. & Pujol, F.H. 2007. Hepatitis B genetic diversity in latin America. Virus Research, 127:177-184.
- Devesa, M., Rodríguez, C., León, G., Liprandi, F. & Pujol, F. 2004. Clade Análisis and surface antigen polymorphism of Hepatitis B virus American genotypes. J. Med. Virol., 72:377-384.
- Ding, J. J., Zhang, Q., Peng, L., Liu, Y. H., Li, Z., Liu, S. D.& Hu, L. 2006. Distribution of hepatitis B virus genotypes in Guizhou and analysis of clinical significance. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi., 20(3):241-3.
- El Khouri Marcelo and Dos Santos Vera Aparecida. 2004. Hepatitis B: epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo., 59(4):216-224.
- Evans, A. A., O'Connell, A. P., Pugh J. C., Mason, W. S., Shen, F. M., Chen, G. C., Lin, W. Y., Dia, A., M'Boup, S., Dramé, B. & London, W. T. 1998. Geographic variation in viral load among hepatitis B carriers with differing risks of hepatocellular carcinoma. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7(7):559-565.

- Fares, A. & Holmes E. 2002. A Revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). J. Mol. Evol., 54: 807-814.
- Franca, P.H., Gonzalez, J.E., Munne, M.S., Brandao, L.H., Gouvea, V.S., Sablon, E. & Vanderborght, B.O. 2004. Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected Argentinean blood donors. J. Clin. Microbiol., 42: 5015–5021.
- Glebe, D. & Urban, S. 2007. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. World J. Gastroenterol., 13:22-38.
- Günther, S. 1999. “Naturally occurring variants of hepatitis B virus”. Advances in virus research, 25: 25-137.
- Günther, S., Li, C., Miska, S., Kruger, D., Meisel, H. & Will, H. 1995. novel method for efficient amplification of whole Hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. J. Virol., 69(9): 5437-5444.
- Hollinger F. B. 1996. Hepatitis B Virus. En: *Fields Virology*, Third Edition, 86:2739-2763.
- Hu, X., Margolis, H., Purcell, R., Ebert, J. & Robertson, B. 2000. Identification of Hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97: 1661-1664.
- Huy, T., Ushijima, H., Sata, T. & Abe, K. 2006. Genomic characterization of HBV

- genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T¹⁸⁵⁸ variant. Arch. Virol., 151:(3) 589-597.
- Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. & Chen, D. S. 2000. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology, 118(3):554-559.
- Kong H. B. & Li Y. S. 2007. Distribution of hepatitis B virus genotypes and its clinical significance. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 21(4):372-3.
- Lanford, E., Chavez, D., Brasky, K., Burns, R. & Rico-Hesse, R. 1998. isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a new world primate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95: 5757-5761.
- Lavanchy, D. 2005. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. J. Clin. Virol., 34: S1-S3.
- Li, J., Tong, S., Wen, Y., Vitvitski, L., Zhang, O. & Trepo, C. 1993. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as a HBe-minus mutant: possible contribution of single nucleotide in the precore region. J. Virol., 67:5402-5410.
- Livingston, S. E., Simonetti, J. P., McMahon, B. J., Bulkow, L. R., Hurlburt K. J., Homan, C. E., Snowball, M. M., Cagle, H. H., Williams, J. L. & Chulanov V. P. 2007. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. J. Infect. Dis., 195(1):1-4.

- MacDonald, D., Holmes, E., Lewis J. & Simmonds, P. 2000. Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. J. Virol., 74: 4253-4257.
- Mandell, G., Gordon, D., Bennett, J & Dolin R. 2006. Enfermedades Infecciosas Principios y Prácticas. Sexta Edición, Volumen 2. Elsevier España.
- Mbayed. V., Barbini, L, López, & Campos, R. 2001. Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. Arch. Virol. 146: 1803-1810.
- McMahon, B. J. 2005. Epidemiology and natural history of hepatitis B. Semin. Liver Dis., 25:S3-S8.
- Melegari, M., Wolf, S. K. & Schneider, R. J. 2005. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. J Virol. 79:9810-9820.
- Milich, D. R. 1990. Is a function of the secreted Hepatitis B e Antigen to induce immunologic tolerance in utero?. Proc. Natl. Acad. Sci USA., 87:6599-6003.
- Nassal, M. 1999. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. Intervirology, 42: 100-116.
- Norder H., Couroucé, A., Coursaget, P., Echevarria, J., Lee, S., Mushahwar, I., Robertson, B., Locarnini, S. & Magnius L. 2004. Genetic diversity of hepatitis B

virus strain derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBs Ag Subtypes. Intervirology, 47: 289-309.

Norder, H., Ebert, J., Fields, H., Mushahwar, I. & Magnius, L. 1996. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. Virology, 218: 214-223.

Piñeiro, F., Leone, F., Mbayed, V. & Campos, R. 2003. Evolutionary history of Hepatitis B virus genotype F: an in-depth analysis of Argentine isolates. Virus Genes, 27(1): 103-10.

Piñeiro, Y., Leone, F. G., Pezzano, S. C., Torres, C., Rodríguez, C. E., Garay, M., Fainboim, H. A., Remondegui, C., Sorrentino, A.P., Mbayed, V. A. & Campos, R. H. 2008. Hepatitis B virus genetic diversity in Argentina: Dissimilar genotype distribution in two different geographical regions; description of hepatitis B surface antigen variants. J. Clin. Virol. (Epub ahead of print).

Rabe, B., Vlachou, A., Panté, N., Helenius, A. & Kann, M. 2003. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 9849-9854.

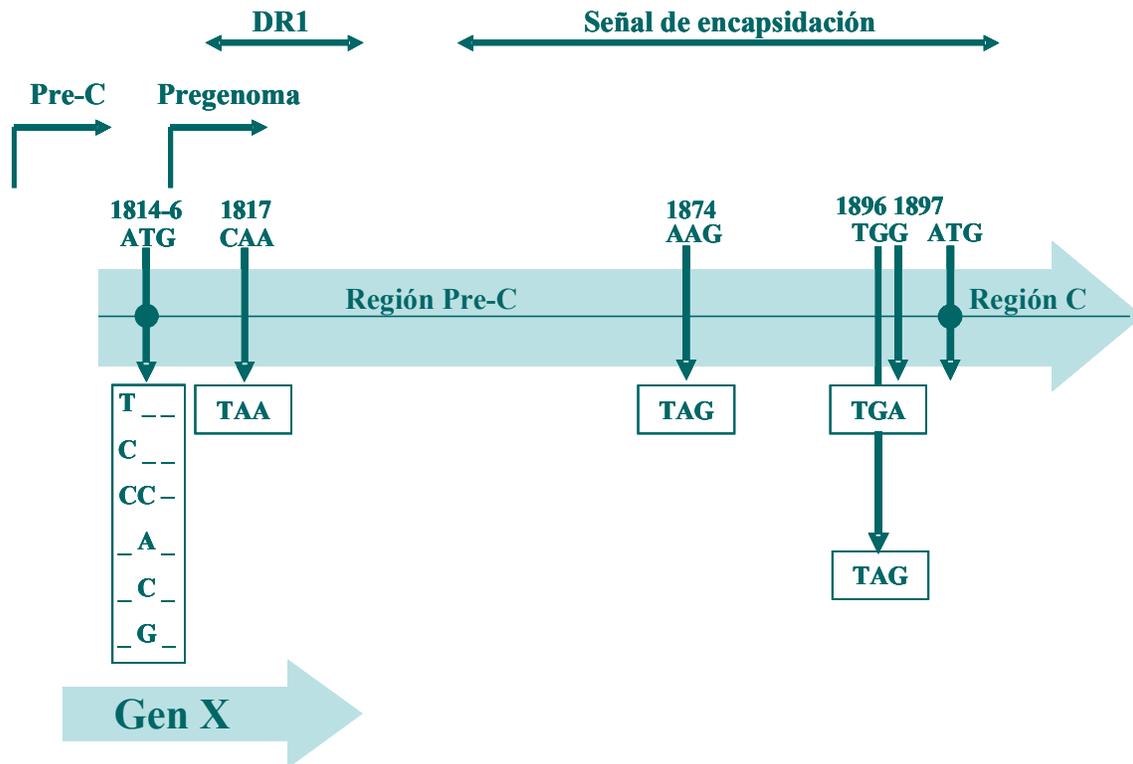
Richman, D. C., Whitley, R. J. & Hayden, F. G., 2002. Clinical Virology. Second Edition. ASM Press. Washington D.C., USA.

Robertson, B. 2001. Viral hepatitis and primates: historical and molecular analysis of human and nonhuman primate. J. Viral Hepatitis, 8: 233-242.

- Sambrook, S. & Russel, D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
Third Edition, volumen 2.
- Sánchez, L., Maldonado, M., Bastidas, B., Norder, H., & Panduro, A. 2002. Genotypes and S-gene variability of mexican Hepatitis B Virus strains. J. Med. Virol., 68: 24-32.
- Sánchez-Tapias, J. M., Costa, J., Mas, A., Bruguera, M. & Rodés, J. 2002. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. Gastroenterology, 123(6):1848-1856.
- Schaefer, S., Glebe, D., Wend, U., Oyumbileg, J. & Gerlich, W. 2003. Universal primers for real-time amplification of DNA from all know *Orthohepadnavirus* species. J. Clin. Virol., 27: 30-37.
- Seeger, C. & Mason, W. 2000. Hepatitis B Virus Biology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:51-68.
- Sitnik, R., Pinho, J.R., Bertolini, D.A., Bernardini, A.P., Da Silva, L.C., Carrilho, F.J. 2004. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. J. Clin. Microbiol., 42: 2455–2460.
- Strauss, J. H. & Strauss, E. G. 2002. *Viruses & Human Disease*. Second Edition. Academic Press, San Diego, 384 pp.
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van, C., zoulin, F., Friend, M., schinazi, R. & Rossan, R.

2000. A new genotype of hepatitis B virus : complete genome and phylogenetic related ness. J. Gen. Virol., 81: 67-74.
- Telenta, P.F., Poggio, G.P., Lopez, J.L., Gonzalez, J., Lemberg, A., Campos, R.H., 1997. Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. J. Clin. Microbiol. 35:1873–1875.
- Torres, J. R.1996. Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America. Gut, 38:S48-S55.
- Tuttleman, J., Pourcel, C. & Summers J. 1986. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus infected cells. Cell, 47:451-460.
- Zeng, G., Wang, Z., Wen, S., Jiang, J., Wang, L., Cheng, J., Tan, D., Xiao, F., Ma, S., Li, W., Luo, K., Naoumov, N. V. & Hou, J. 2005. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. J. Viral. Hepat., 12(6):609-617.
- Zoulim, F. 2005. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. J. Hepatol. 42:302-308.
- Zuckerman A.J & Thomas, H.C. 1998. Viral hepatitis. Second Edition Churchill Livingstone, London.
- Zuckerman, J. & Zukerman, A. 2000. Current topics in Hepatitis B. J. Infect., 41: 130-136.

ANEXO



Anexo 1. Representación gráfica de las mutaciones pre-core que previenen la síntesis del AgeHB por modificación de los codones de iniciación o por generación de codones stop (Günther, 1999). ATG: codón de iniciación, las flechas indican la posición nucleotídicas donde ocurre la mutación.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB) EN MUESTRAS DE PACIENTES PROVENIENTES DE DOS POBLACIONES COLOMBIANAS
---------------	---

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Rivas S., Yoyna J.	CVLAC	12166435
	e-mail	yoynar@yahoo.com

Palabras o frases claves:

Virus de la hepatitis B, Genotipo, PCR, Análisis Filogenético
--

Líneas y sub-líneas de investigación:

Área	Sub-área
Ciencia	Biología Aplicada

Resumen (abstract):

El virus de la hepatitis B (VHB) tiene una amplia distribución geográfica. Alrededor de dos millardos de personas en el mundo han sido infectados con este virus y cerca 350-400 millones de éstos son portadores crónicos. Basado en una divergencia mínima del 8% entre las secuencias del genoma completo, el VHB ha sido clasificado en ocho genotipos definidos con las letras desde la A hasta la H. El genotipo F es autóctono de Suramérica y altamente predominante en la región. Adicionalmente este genotipo ha sido subclasificado en cuatro subgenotipos identificados como F1, F2, F3 y F4, los cuales guardan relación con un área geográfica determinada. El subgenotipo F3 frecuentemente se encuentra en el Norte de Suramérica y se relaciona filogenéticamente con la única secuencia de genoma completo del VHB colombiana reportada hasta el momento. En el presente estudio se caracterizaron molecularmente secuencias del VHB provenientes de dos poblaciones colombianas y se compararon filogenéticamente las secuencias del gen *s* y de genomas completos con secuencias prototipos de aislados de diferentes genotipos del VHB. Para ello se analizaron 126 muestras de sueros positivos para el antígeno de superficie (AgsHB), mediante la técnica de PCR en dos rondas, utilizando iniciadores específicos para las regiones del AgsHB e iniciadores específicos para la amplificación de genomas completos en muestras selectas. Los productos amplificados fueron secuenciados y analizados filogenéticamente. Un total de 47 (37%) amplificaron al menos para una región del AgsHB y solo en uno se amplificó el genoma completo. El análisis filogenético reveló que 41 aislados pertenecen al genotipo F, cuatro al genotipo D, uno al genotipo A y uno al genotipo C. La subgenotipificación de 23 secuencias, logró la asignación eficiente de los subgenotipos, resultando así 17 F3, 3 D2, 1 D3, 1 A2 y 1 C2. Todas las secuencias genotipo F (subgenotipo F3) se encuentran estrechamente relacionada con la única secuencia del VHB colombiana reportada en la base de datos Entrez Nucleotides (www.ncbi.nlm.gov/entrez), lo que se corresponde con la distribución geográfica reportada para el genotipo F y el subgenotipo F3. La presencia de los genotipos A, C y D en la población estudiada podría estar asociada a las diferentes olas migratorias que se han venido dando hacia esta parte del continente. Es evidente observar una alta predominancia del genotipo F sobre otros genotipos (A, C y D) en la población colombiana estudiada, lo cual concuerda con el fuerte acervo genético amerindio que mantiene la población.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Pujol F., Flor H.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.301.975
	e-mail	fhpujol@gmail.com
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2008	10	16
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-RivasY.doc	Applications/word

Alcance:

Espacial : Nacional/Internacional (Opcional)

Temporal: **Temporal** (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Magíster Scientiarum en Biología Aplicada

Nivel Asociado con el Trabajo Magíster Scientiarum

Área de Estudio:

Biología Aplicada

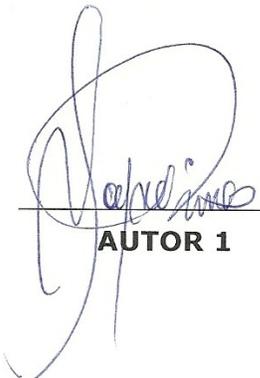
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad De Oriente

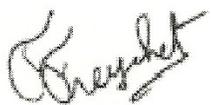
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

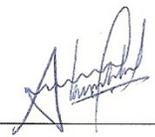
Yo, Rivas S., Yoyna J. venezolana, portadora de la C. I. V- 12.166.435,
Autora intelectual del presente trabajo de investigación intitulado
"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS B (VHB) EN MUESTRAS DE PACIENTES PROVENIENTES DE
DOS POBLACIONES COLOMBIANAS", autorizó a la Universidad de Oriente
a divulgar los alcances obtenidos en el referido trabajo.



AUTOR 1



Pujo F., Flor H.



JURADO 1



JURADO 2

POR LA COMISIÓN DE TESIS:

