

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Estudio **PERIODO** 2013

1. **APELLIDO:** Torres

NOMBRES: María Celeste

2. **TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Caracterización molecular de los virus de las hepatitis B y C en la ciudad de Mar del Plata.

3. **OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2013

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:*

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Universidad de Mar del Plata

Facultad: Ciencias Exactas y Naturales

Departamento: Química

Cátedra: Microbiología Clínica

Otros: -----

Dirección: Calle: Funes N°: 3350

Localidad: Mar del Plata *CP:* 7600 *Tel:* 0223-4753150

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Barbini, Luciana Fernanda

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

Con el objetivo de realizar una caracterización molecular del virus de las hepatitis B (HBV) circulante en la ciudad de Mar del Plata, se analizaron muestras de 44 pacientes provenientes de instituciones de salud pública de la ciudad. Todos los sueros presentaban marcadores serológicos positivos para el diagnóstico de la infección por HBV (anticuerpos anti-HBc y HBsAg). El DNA viral fue extraído a partir de 200 µL de suero, empleando el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Dos regiones del genoma viral fueron amplificadas mediante nested PCR: la región del gen S (76-791 nucleótidos) y la región comprendida entre el gen X, BCP (promotor basal del core) y el PC (pre-core) (1260-1976 nucleótidos). En todas las reacciones controles positivos y negativos se largaron juntamente con las muestras a analizar. Para la amplificación del gen S se emplearon los primers 37S (5' TTTTTCACCTCTGCCTAATCATC 3') y 40AS (5' AAAAAGTTGCATGGTGCTGG 3') para la primer ronda, y los primers 27S (5' CTGCTGGTGGCTCCAGTTC 3') y 26AS (5' AGAAAATTGGTAACAGMGGYA 3') para la segunda ronda de amplificación.

La primer ronda se realizó con 5 µL de DNA en un volumen final de 25 µL, bajo las siguientes condiciones de ciclado: 5' a 94 °C, 10 ciclos de: 94 °C 1', 61 °C 2' y 72 °C 3', seguido de 10 ciclos de: 94 °C 1', 61 °C 2' y 72 °C 5', seguido de 10 ciclos de: 94 °C 1', 61 °C 2' y 72 °C 7' y 6 ciclos de: 94 °C 1', 61 °C 2' y 72 °C 9', finalizando con 15' a 72 °C.

La segunda ronda de PCR se realizó en un volumen final de 50 µL, utilizando 1 µL de la primer ronda bajo las siguientes condiciones: 94 °C 5', 36 ciclos de 94 °C 1', 53 °C 1' y 72 °C 1', seguido de 10' a 72 °C. El producto resultaba de 756 pares de bases. Para la región comprendida entre el gen X, BCP y el PC se utilizaron los mismos primers y condiciones de primer ronda que para el gen S, y los primers 69S (5' GCCGATCCATACTGCGGAACT 3') y 64AS (5' ACGGGAAGAAATCAGAAGG 3') para la segunda ronda. Esta última se realizó en un volumen final de 50 µL, utilizando 1 µL de la primer ronda bajo las siguientes condiciones: 94 °C 5', 45 ciclos de 94 °C 1', 45 °C 1' y 72 °C 2', seguido de 10' a 72 °C. El producto de PCR resultante era de 716 pares de bases.

Las muestras que no amplificaron en las condiciones standard anteriormente mencionadas, debido posiblemente a bajas cargas virales o variaciones particulares en las secuencias de los genes a amplificar, se re-amplificaron cambiando criteriosamente algunas condiciones de la reacción de PCR hasta lograr su amplificación.

Los productos de PCR se detectaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV. Posteriormente, se purificaron mediante columnas (QIAquick PCR Purification Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se secuenciaron utilizando los primers internos en el Instituto de Biotecnología, Unidad de Genómica, INTA, Castelar. Las secuencias obtenidas fueron analizadas filogenéticamente. El análisis se realizó mediante la edición y alineamiento con el software BioEdit, utilizando secuencias de referencia de los distintos genotipos de HBV disponibles en el Genbank. Los modelos evolutivos se obtuvieron con el programa Modeltest 3.7 y se construyeron los árboles filogenéticos utilizando los métodos de Neighbor-joining y Maximum likelihood. Mediante los árboles obtenidos se realizó la genotipificación de las muestras por comparación con los prototipos del GenBank. Por otra parte, se realizó la traducción de las secuencias obtenidas a secuencias aminoacídicas (BioEdit) para determinar la presencia de mutaciones de relevancia clínica y epidemiológica en el antígeno de

superficie (HBsAg), la polimerasa de HBV (dominio RT) y el promotor basal del core (BCP) y el pre-core (PC).

Hasta el momento, los resultados obtenidos del análisis filogenético del gen S permitieron determinar en la cohorte estudiada que el genotipo de mayor prevalencia es el genotipo F, particularmente el subtipo F1b (74%), seguido de los genotipos (gt) A (A2) 13% y D (D1 y D3) 13%. Asimismo, de acuerdo a la secuencias de aminoácidos, se dedujeron los siguientes serotipos: adw4 (gt F1b), adw2 (gt A2) y ayw2/ayw3 (gt D). La alta prevalencia de genotipo F1b resulta ser característica de Mar del Plata. Este genotipo, autóctono de Latinoamérica, sería el responsable de los nuevos casos de hepatitis aguda por HBV y estaría desplazando a los genotipos del "viejo mundo" (A y D) presentes desde antes en la ciudad.

Además, en las muestras estudiadas se han encontrado mutaciones asociadas a la historia natural de la infección. Dos muestras genotipo F1b provenientes de pacientes con infección crónica presentaron sustituciones nucleotídicas en A1762T y G1764A en el BCP, asociadas a una potencial disminución en la expresión de HBeAg y traducidas a las mutaciones K130M y V131I sobre la proteína X. Una única muestra genotipo D presentó la sustitución nucleotídica G1896A en el pre-Core, resultante en un codón de stop que confiere el fenotipo HBeAg negativo. Por otro lado, en el inmunodeterminante "a" del HBsAg (aminoácidos 121-149), asociado a los anticuerpos neutralizantes y la protección por la vacunación, 3 muestras presentaron mutaciones (2 genotipo F1b y 1 muestra A2). Dada la estructura del genoma de HBV y la superposición de los marcos de lectura, se pudo analizar el dominio de retrotranscriptasa (rt) de la polimerasa viral a partir de la secuencia del gen S. En esta región se encuentran la mayoría de las mutaciones que confieren resistencia a los diversos antivirales empleados en el tratamiento. En la muestra estudiada se hallaron mutaciones en esta región (19 muestras: 11 F1b, 4 A2 y 4D), pero no se han encontrado mutaciones previamente reportadas asociadas a la resistencia a los antivirales (análogos de nucleósidos). A su vez, se han detectado mutaciones exclusivas de las secuencias marplatenses (por ejemplo T125M en el inmunodeterminante "a", rt-A223S y rt-S105F) que serían características de los aislamientos de la ciudad.

Los resultados generados a partir de estos experimentos fueron presentados en reuniones científicas que se mencionan más adelante.

La información generada durante la ejecución de este proyecto resulta un valioso aporte a nuestra comunidad, ya que la información respecto de la epidemiología y la caracterización molecular de las infecciones por HBV es sumamente escasa en esta región. De este modo, el conocimiento sobre la situación local permitirá la elección de estrategias de diagnóstico, prevención y tratamientos, acordes a las variantes virales de circulación local.

Paralelamente, en lo que respecta al estudio de la infección por el virus de la hepatitis C (HCV) en la ciudad de Mar del Plata se comenzó por analizar las características clínicas y virológicas de 168 pacientes con infección crónica por HCV que se habían atendido en el período 1998-2012 en un hospital público de la ciudad.

El genotipo más prevalente en esta muestra resultó ser el 1 (61%), seguido del 3 (23%), 2 (8%) y 4 (5%). El genotipo 2, en particular el subtipo 2a fue en su mayoría representado por pacientes de edad avanzada, mientras que 1 y 3 por los más jóvenes. Los subtipos 1b, 4a y el genotipo 2 estaban asociados a la transmisión por prácticas médicas, mientras que 1a y 3 al consumo de drogas. El nivel de carga viral y de transaminasas hepáticas fue mayor para el genotipo 1, que para los restantes. Los genotipos 2, 3 y 4 mostraron una mayor progresión de la fibrosis. La mejor respuesta al tratamiento antiviral con IFN-ribavirina se observó en los genotipos 2 y 3, mientras que el 4 y el subtipo 1b mostraron los mayores porcentajes de falla. La información provee este análisis local proporcionará herramientas para mejorar el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de las infecciones crónicas locales por HCV.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo son parte de una publicación científica que se encuentra pendiente de publicación.

Durante este período de beca, se ha logrado un avance muy significativo del proyecto propuesto en la solicitud, aunque hace falta continuar con más experimentos y análisis de los resultados obtenidos, la presentación de los mismos en reuniones científicas y la preparación de manuscritos para su publicación en revistas con referato.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

Torres, C; Arzeno, M; Blanco, M; Civetta, E; Barbini, L. "Characterization of chronic hepatitis C virus infections in patients attending at a public hospital of Mar del Plata city, Argentina." Año 2014.

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

Se encuentra en fase de redacción, la publicación referente a los resultados obtenidos del estudio de la caracterización molecular del virus de la hepatitis B en la ciudad de Mar del Plata, con la correspondiente descripción de los genotipos virales circulantes y su distribución en la muestra representativa de la población marplatense bajo estudio, así como también con un análisis detallado de la prevalencia de las mutaciones detectadas, muchas sobre las cuales deberá hacerse especial foco, dada la continua expansión del virus en la sociedad, a pesar de la existencia de la vacuna.

Actualmente se están analizando también, los resultados (las secuencias) correspondientes a las últimas muestras de HBV hasta el momento procesadas, es decir la determinación de los respectivos genotipos virales y el análisis de mutaciones de relevancia clínica. Los mismos serán incluidos en la publicación previamente citada. Por otra parte, nuevas estrategias de amplificación se están ensayando sobre aquellas muestras con carga viral positiva, pero con resultados de PCR negativos. Por último, hemos recibido recientemente nuevos sueros de pacientes infectados con HBV, y se planifica procesarlos a la brevedad.

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

XVII Congreso Argentino de Hepatología. Caracterización de las Hepatitis Crónicas C y su asociación con los genotipos virales en pacientes del HIGA Dr. O. Alende, Mar del Plata. Torres, C; rzeno, M; Blanco, M; Civetta, E; Barbini, L. Buenos Aires, 6-8 de junio de 2013.

Primer congreso internacional de la Comisión de Investigaciones Científicas. Caracterización de los virus de las hepatitis B y C en Mar del Plata. Torres, C; Barbini, L. La Plata, 19-20 de setiembre de 2013.

XIII Congreso Argentino de Microbiología. Caracterización de las Hepatitis Crónicas C y su asociación con los genotipos virales en pacientes de un hospital público de la ciudad de Mar del Plata. Torres, C; Arzeno, M; Blanco, M; Civetta, E; Barbini, L. Buenos Aires, 23-26 de septiembre de 2013.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

Curso de postgrado teórico-práctico: "Análisis filogenético de genomas virales". Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. 15-19 de julio del 2013.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Docente auxiliar adscripta, dedicación simple, en la cátedra de Microbiología Clínica, FCEyN, UNMdP. Período: agosto a diciembre de 2013.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

Asistencia y participación en los seminarios de investigación y actualización de la Cátedra de Microbiología Clínica de la FCEyN, UNMdP. Período: marzo a diciembre de 2013

14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Caracterización molecular de los virus de las hepatitis B y C en la ciudad de Mar del Plata.

Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario