

Tesis de Doctorado

Área: Biología
Sub-Área: Biología Celular y Molecular
PEDECIBA

Caracterización Molecular y Variabilidad genética del Virus de la Hepatitis E

MSc. Santiago Mirazo

Director de Tesis

Prof. Dr. Juan Arbiza

Sección Virología, Facultad de Ciencias. UdelaR

TRIBUNAL

- . Dr. Gustavo Folle
- . Dr. Oscar Bruna-Romero
- . Dr. Rodney Colina

2014

CONTENIDO

RESUMEN



CAPÍTULO 1



- I. Introducción al Virus Hepatitis E (HEV)
- II. Biología viral y virología molecular
- III. Epidemiología
- IV. Cuadro clínico
- V. Trasmisión de HEV
- VI. Diagnóstico
- VII. Situación epidemiológica en Sudamérica

CAPÍTULO 2



- I. Importancia de la problemática a abordar. Fundamentación.
- II. Objetivo General
- III. Objetivos Específicos
- IV. Hipótesis de Trabajo

CAPÍTULO 3



- I. Relevamiento e identificación de HEV en Uruguay.
- II. Aislamiento de cepas de HEV en líneas celulares continuas y hepatocitos primarios de rata
- III. Caracterización molecular de cepas de HEV y análisis filogenéticos
- IV. Análisis de coalescencia bayesiana: historia evolutiva de HEV

CAPÍTULO 4



- I. Clonado, expresión y purificación de ORF2 y ORF3 en *Escherichia coli*
- II. Estudios de localización de ORF3 en línea celular A549 y hepatocitos primarios de rata
- III. Construcción y evaluación preliminar de un sistema de presentación de antígenos de HEV basado en la proteína Z del virus Junín

CAPÍTULO 5



- I. Relevamiento de reservorios animales de HEV y caracterización de cepas.

CONCLUSIONES



RESUMEN

El virus de la hepatitis E (HEV), agente etiológico de la hepatitis E aguda, es considerada endémica en muchos países en desarrollo de África y Asia.

Se transmite principalmente por vía fecal-oral, siendo responsable de importantes epidemias en zonas subdesarrolladas generadas fundamentalmente por el consumo de agua contaminada. Sin embargo, en la última década se han registrado en varios países con alto desarrollo, un número creciente de casos esporádicos de hepatitis E adquiridos localmente. Desde el punto de vista epidemiológico la infección por HEV en estas zonas no endémicas tiene características distintivas., incluyendo presentación clínica, tasa de ataque y modos de trasmisión del virus.

La transmisión zoonótica de reservorios animales a humano se ha sugerido como un factor fundamental en la propagación de la infección por HEV. Otras tres rutas adicionales de transmisión se han identificado: parenteral, persona-persona y vertical. Además de los seres humanos, cepas del HEV se han aislado de otras especies animales, incluyendo cerdos domésticos y jabalíes, venado, pollo, rata, hurón, conejo y, recientemente, camello. La hepatitis E es considerada una zoonosis, siendo los cerdos y jabalíes los principales reservorios para las infecciones humanas.

Actualmente, el HEV está clasificado como un miembro del género *Hepevirus* en la familia *Hepeviridae*. El genoma viral, de ~ 7200 nt consiste básicamente en tres marcos de lectura abierta (ORF) discontinuos y parcialmente superpuestos (ORF1, 2 y 3) . El ORF1, ubicado en el extremo 5 ' es la unidad codificante más grande y abarca aproximadamente dos tercios del genoma viral. Esta región está implicada en la replicación viral y en el procesamiento proteolítico post traduccional. El ORF2 codifica la proteína de la cápside viral de 660 aa que encapsida el genoma, mientras que el ORF3 se superpone a los otros dos ORFs y codifica una pequeña fosfoproteína de 123 aa implicada en la replicación y egreso viral.

Las secuencias de HEV capaces de infectar humanos han sido clasificadas en cuatro genotipos principales, 1-4, que a su vez se clasifican en subtipos (1a-1e; 2a-2b; 3a-3j; 4 a- 4g). Sin embargo la reciente identificación de nuevas variantes, junto con el creciente número de secuencias HEV-like (con cierto grado de identidad nucleotídica con HEV) ha puesto en discusión el actual sistema de clasificación dentro del género *Hepevirus*. Los aislados del Genotipo 1 consisten en cepas epidémicas y se han reportado en varios países de Asia y Latinoamérica, mientras que las secuencias del Genotipo 2 se han identificado en brotes en México y, posteriormente, en algunos países de África central. Estos dos genotipos son considerados antroponóticos. Por su parte el Genotipo 3 está ampliamente distribuido en el mundo y se han identificado cepas en cerdos, jabalíes y ciervos. El Genotipo 4 comprende cepas humanas y porcinas geográficamente restringidas a Asia y algunos países de Europa Central .

La infección aguda por HEV es diagnosticada mediante la detección de anticuerpos específicos anti-HEV (IgM e IgG). Sin embargo la baja especificidad y sensibilidad de los ensayos comerciales disponibles, ha derivado en el uso creciente de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Actualmente existe una única vacuna comercial, que aún sigue en fase de estudio, desarrollada en China, pero que no está disponible en todo el mundo. Paralelamente, otros desarrollos están siendo llevados adelante. Sin embargo, el real impacto de la aplicación de estas vacunas es controversial.

En América del Sur, donde no existen zonas endémicas para HEV, los datos relativos a la incidencia, prevalencia y epidemiología molecular de HEV en humanos y reservorios animales es todavía escasa. Sin embargo, en los últimos años han surgido varios reportes en esta materia y convirtiéndose el HEV en un foco principal de interés para los investigadores

Esta tesis tiene como objetivo general investigar diversos aspectos vinculados con la emergencia de la infección por HEV en Uruguay, analizando en profundidad la variabilidad genética de las cepas circulantes y la distribución de genotipos y sub-genotipos. Asimismo pretende comenzar a indagar aspectos del ciclo replicativo viral, básicamente a través del estudio de expresión y localización de proteínas en dos sistemas eucariotas. A su vez, es de interés

investigar la presencia del HEV circulante en reservorios animales (cerdos, jabalíes y ratas), de forma de evaluar el impacto zoonótico que esta infección puede presentar en la población.

A través de la estrategia y metodologías implementadas en este estudio, se detectó y caracterizó por primera vez en el país la circulación de cepas de HEV en la población. Así, se identificó la co-circulación de cepas del Genotipo 3 (subtipos 3i y 3h), el tipo predominante en la región, y del Genotipo 1, consistente en cepas epidémicas más frecuentemente encontradas en zonas endémicas. Los aislados del Genotipo 3 mostraron una relación filogenética muy estrecha con cepas identificadas en Alemania y Francia, habiendo compartido un ancestro común hace aproximadamente 100 años, de acuerdo a los resultados obtenidos derivados de la inferencia Bayesiana. Por su parte la cepa del Genotipo 1 presentó un muy alto porcentaje de identidad nucleotídica con aislados de Cuba y Venezuela.

Paralelamente, se logró desarrollar un sistema para propagar el virus detectado en las muestras humanas *in vitro* a través del uso de las líneas celulares A549 y Hep-G2.

Se implementó y evaluó un sistema de expresión de antígenos basado en las propiedades biológicas de la proteína Z del Virus Junín (*Arenavirus*). El antígeno seleccionado del HEV Genotipo 3 fue la cápside viral (ORF2), y se logró obtener VLP (*Virus-Like Particles*) derivadas de la expresión en un sistema eucariota en marco continuo de Z y ORF2. La inmunogenicidad de estas partículas será evaluada en el corto plazo en un modelo murino.

Del estudio de los reservorios animales, surgieron algunos resultados interesantes. En la población de cerdos domésticos de nuestro país circulan cepas del Genotipo 3 y 1. Sin embargo la frecuencia de infección es extremadamente baja. No se detectaron, por su parte jabalíes infectados con HEV, así como tampoco roedores (rata de campo, *Scapteromys tumidus*, y rata doméstica, *Rattus rattus*).

En resumen, esta Tesis es el resultado de una primera aproximación en el país, al estudio desde una enfoque multidisciplinario, de HEV y la hepatitis E, incluyendo aspectos epidemiológicos, virológicos y de aplicación biotecnológica.

CAPÍTULO 1

I. INTRODUCCIÓN AL VIRUS HEPATITIS E (HEV)

El virus de la hepatitis E (HEV) es el agente etiológico de la hepatitis E aguda, y la infección por este patógeno es considerada endémica en muchos países en desarrollo de África y Asia¹.

El primer reporte documentado de la enfermedad fue una gran epidemia de hepatitis transmitida por fuentes de agua contaminada ocurrida en Nueva Delhi, India en 1955¹. Si bien inicialmente se consideró que el brote estaba asociado con el virus de hepatitis A (HAV), las pruebas de laboratorio realizadas 25 años después a los sueros almacenados de esta epidemia, y a los de otro brote posterior reportado en Cachemira, India en 1978 no demostró marcadores serológicos para HAV².

El HEV se transmite principalmente por vía fecal-oral, siendo responsable de importantes epidemias en zonas subdesarrolladas generadas fundamentalmente por el consumo de agua contaminada³⁻⁵. Sin embargo, en la última década se han registrado en varios países con alto desarrollo, un número creciente de casos esporádicos de hepatitis E adquiridos localmente, en los que a menudo no es posible establecer la ruta de adquisición de la infección^{6,7}. Además de los seres humanos, cepas del HEV se han aislado de otras especies animales, incluyendo cerdos domésticos y jabalíes, venado, pollo, rata, hurón, conejo y, recientemente, camello⁸⁻¹⁰. La hepatitis E es considerada una zoonosis, siendo los cerdos y jabalíes los principales reservorios para las infecciones humanas⁸.

Actualmente se considera que la mayor carga de incidencia de la infección por HEV se debe a los casos transmitidos de forma esporádica, y no a los casos ocurridos durante las epidemias en zonas endémicas. Se ha estimado que dos mil millones de personas, lo que representa un tercio de la población del mundo, viven en áreas endémicas para HEV y, por lo tanto, están en riesgo de infección¹¹. Sin embargo, aún se desconoce si las tasas de incidencia de HEV en áreas no endémicas efectivamente están aumentando o si este cambio se debe a una mayor detección derivada de una mayor vigilancia¹².

El HEV causa típicamente una infección aguda y autolimitada en individuos inmunocompetentes con bajas tasas de mortalidad en general, aunque la hepatitis fulminante y una alta mortalidad se describen en algunas condiciones clínicas¹. Sin embargo, en los últimos años, aspectos desconocidos con respecto a la infección por HEV se ha descubierto en los países no endémicos, tales como la posibilidad de que la enfermedad se vuelva crónica en pacientes trasplantados y/o inmunocomprometidos¹³. La infección crónica por HEV en estos individuos es de hecho actualmente un problema clínico emergente de importancia a nivel global.

II. BIOLOGÍA VIRAL Y VIROLOGÍA MOLECULAR

Actualmente, el HEV está clasificado como un miembro del género *Hepevirus* en la familia *Hepeviridae*^{14,15}. El virión constituye una pequeña partícula esférica sin envoltura de aproximadamente 32-34 nanómetros (nm) de diámetro, y contiene un genoma de una sola cadena de ARN sentido positivo rodeado por una cápside proteica icosaédrica¹.

i. Organización genómica

El genoma viral, de ~ 7200 nucleótidos (nt) consiste en un región pequeña no codificante 5'UTR (27 -35 nucleótidos, nt), tres marcos de lectura abierta (ORF) discontinuos y parcialmente superpuestos (ORF1, 2 y 3) y una 3' UTR (65 a 74 nt), seguida por una cola poli (A) (Fig. 1.1). El extremo 5' metilado, esencial para la infectividad viral, y el extremo 3' del genoma viral constituyen elementos que actúan en cis, participando en la regulación de la replicación viral y la traducción^{16,17}.

El ORF1, ubicado en el extremo 5' es la unidad codificante más grande y posee ~ 5000 nt abarcando aproximadamente dos tercios del genoma viral. Esta región está implicada en la replicación viral y en el procesamiento proteolítico post traduccional. Codifica proteínas no estructurales incluyendo metil transferasa, guanilil transferasa, cisteín proteasa tipo papaína, helicasa de ARN y ARN-polimerasa dependiente de ARN^{18,19}. Además, algunos dominios no

caracterizados homólogos a otros virus de ARN de cadena positiva que infectan animales y vegetales se han identificado en la ORF1¹⁷. La región hipervariable (HVR) por ejemplo, una región no codificante dentro de ORF1, que presenta una gran diversidad genética entre los diferentes aislados de HEV, cumple una función esencial en la modulación de la eficiencia de la replicación viral²⁰. Sorprendentemente, las diferencias en el largo de los genomas entre las distintas cepas de HEV se limitan principalmente a este región²¹.

El ORF2 codifica la proteína na de la cápside viral de 660 aminoácidos (aa) que encapsida el genoma¹⁶. Esta proteína (Cap) es la única estructural y se autoensambla en un multímero altamente estructurada de 60 copias^{22,23}.

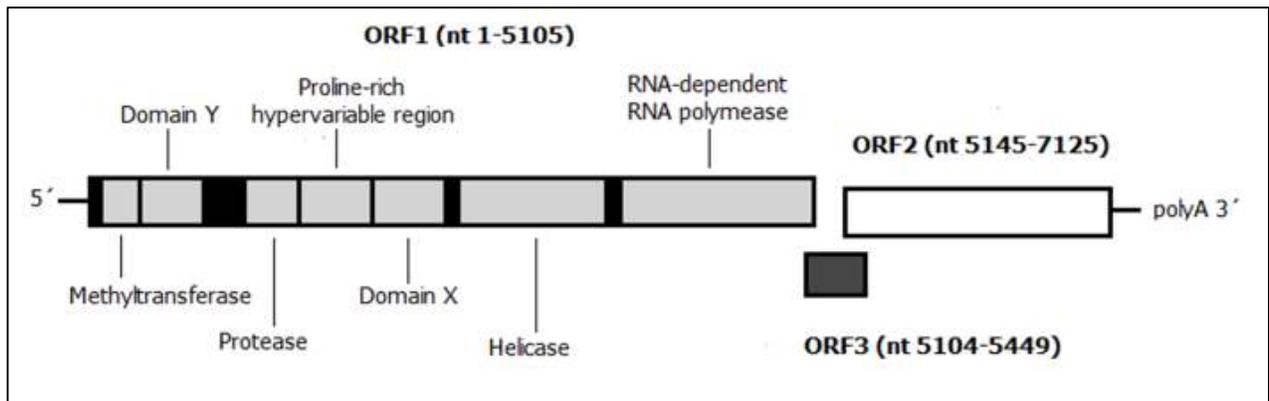


Figure 1.1. Esquema de la organización de los tres marcos de lectura (ORF) del HEV. ORF1 codifica una poliproteína no estructural que comprende una metiltransferasa, un dominio Y (sin función asignada), una proteasa de tipo papaína, un dominio Hipervariable rico en prolina, un dominio X (sin función asignada), una ARN-Helicasa y una ARN Polimerasa-ARN Dependiente; ORF2 codifica la proteína de cápside (Cap) y ORF3 codifica una pequeña fosfoproteína. Las posiciones en el genoma son en relación a la cepa SAR-55 del Genotipo 1. nt, nucleótido. Extraído de ¹¹.

Por su parte, el ORF3 se superpone a los otros dos ORFs y codifica una pequeña fosfoproteína de 123 aa implicada en la replicación y síntesis del citoesqueleto^{24,25}. Existen evidencias de que interactúa con MAP quinasas fosfatasa celulares y otras quinasas celulares, promoviendo la supervivencia celular mediante la activación intracelular de las vías de señalización²⁶.

Las proteínas codificadas por el ORF2 y 3 se describen con mayor profundidad en el **Capítulo 4**.

ii. Variabilidad genética

Si bien solo un serotipo ha sido descrito²⁷, las cepas de HEV presentan una muy amplia diversidad genética a lo largo de todo el genoma²⁴.

Las secuencias de HEV capaces de infectar humanos han sido clasificadas en cuatro genotipos principales, 1-4, según análisis de genomas completos y/o regiones genómicas parciales variables dentro de la ORF1 y ORF2²⁸⁻³⁰. Recientemente, se ha propuesto la existencia de dos nuevos genotipos de HEV (5 y 6), aislados de jabalíes³¹.

Similarmente, se han descrito cepas de HEV aisladas de conejo, rata y murciélago, denominadas cepas HEV-like, las cuales si bien son muy divergentes con las cepas humanas (60-47% de identidad aminoacídica) están siendo profusamente estudiadas y se desconce su real impacto zoonótico⁷ (ver **Trasmisión de HEV** más abajo). Estas nuevas variantes, junto con el creciente número de secuencias de HEV y secuencias HEV-like (con cierto grado de identidad nucleotídica con HEV) publicados en los últimos años, lo que aumenta el número de nuevos genotipos potenciales o grupos genéticos, ha puesto en discusión el actual sistema de clasificación dentro del género *Hepevirus*³². En la Figura 1.2 se muestra la reconstrucción filogenética más reciente de las cepas de HEV y HEV-like.

De acuerdo con el sistema actualmente aceptado de clasificación, los cuatro genotipos principales de HEV se subclasifican en subtipos definidos en función de reconstrucciones filogenéticas realizadas mediante el análisis de una de cuatro regiones genómicas distintas; 5' ORF1, 3' ORF1, 5' de ORF2, 3' de ORF2, o del genoma completo²⁹.

Así, las secuencias clasificadas dentro del Genotipo 1 se dividen en cinco subtipos 1a-e, y las del Genotipo 2 en dos subtipos, 2a y 2b²⁹. El Genotipo 1 es responsable de la mayoría de los casos endémicos y epidémicos de infección por HEV en Asia y otras regiones de alta endemicidad, y se ha detectado también en pequeños brotes y casos esporádicos de Cuba, Venezuela y Uruguay (artículo derivado de esta Tesis)^{1,33,34} (Fig. 1.3). Por su parte, el Genotipo 2 es prevalente en México (probablemente subtipo 2a, basado en la caracterización de una sola

otra parte, el Genotipo 1 tiene hasta 11,8% de la diversidad intra-genotípica, mientras que los Genotipos 3 y 4 muestran una amplio rango de variabilidad intra-genotipo (0-19,3% y 0,1-17,0%, respectivamente)²⁴. En el caso del Genotipo 2, la información de su diversidad intra-genotípica es más limitada debido fundamentalmente al hecho de que son pocas las secuencias disponibles. Así, las diferencias intra-genotipo se observaron sobre la base de la única secuencia de nucleótidos completa (la cepa mexicana MEX-14)³⁷ y las secuencias parciales de una región 3 'de ORF2 de 16 aislados africanos. El análisis comparativo de estas secuencias indicó que las 16 cepas africanas se diferencian entre sí en hasta un 10,3% y entre 12,3 a 16,8% con la cepa MEX-14²⁴.

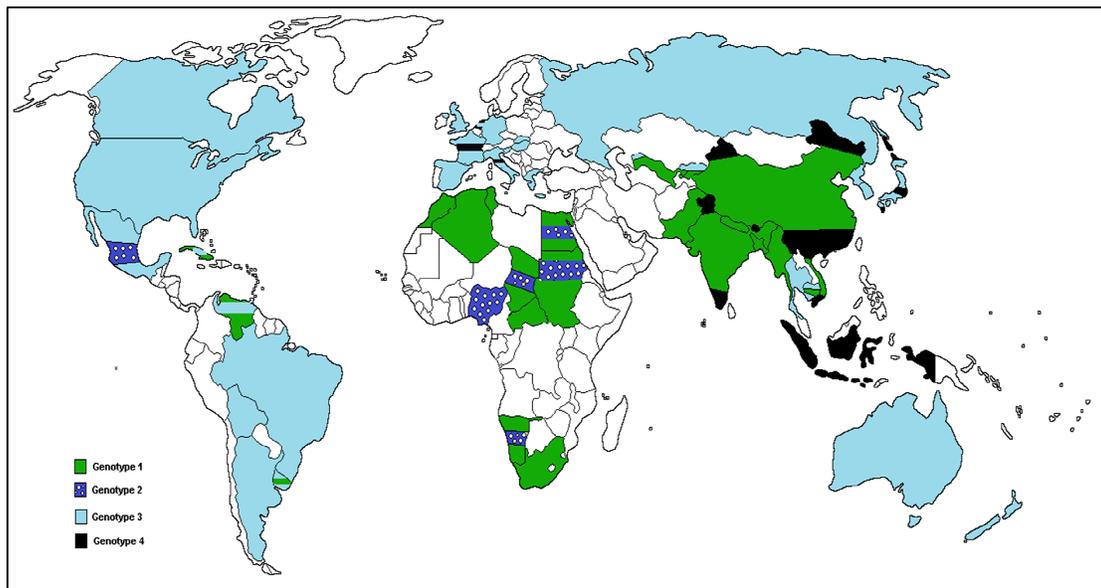


Figura 1.3. Distribución de Genotipos de HEV. Los Genotipos 1 y 2 constan de cepas epidémicas reportadas en Asia y varios países de América Latina y África y México, respectivamente; Genotipos 3 y 4 son cepas consideradas zoonóticas y se han aislado de casos esporádicos de hepatitis E aguda en humanos y de varios reservorios animales, en particular cerdos domésticos y salvajes y ciervos. El Genotipo 3 se distribuye en todo el mundo en los cerdos y humanos mientras que el Genotipo 4 está más restringido y se ha reportado en el Este de Asia y Europa Central. Extraído de ³⁸.

Recientemente, la clasificación basada en el subtipos también ha sido cuestionada por el trabajo de Smith et al. ³⁶, en el que un exhaustivo y completo análisis molecular y filogenético reveló varias inconsistencias con las

denominaciones de subtipos definidos de la forma actual. Esta observación también fue apoyada por otros estudios similares ³².

III. EPIDEMIOLOGÍA

La hepatitis E es considerada hiperendémica en muchos países en desarrollo incluyendo India, Bangladesh y China, donde frecuentemente ocurren importantes brotes epidémicos transmitidos por fuentes de agua, por lo general asociado a cepas de los Genotipo 1 y 2 (Fig. 1.4.). Por su parte, el caso de México, un país que también suele ser calificado en la literatura como altamente endémico, es actualmente materia de discusión. De hecho en ese país, ningún brote de hepatitis E se ha vuelto a reportar en las últimas dos décadas.

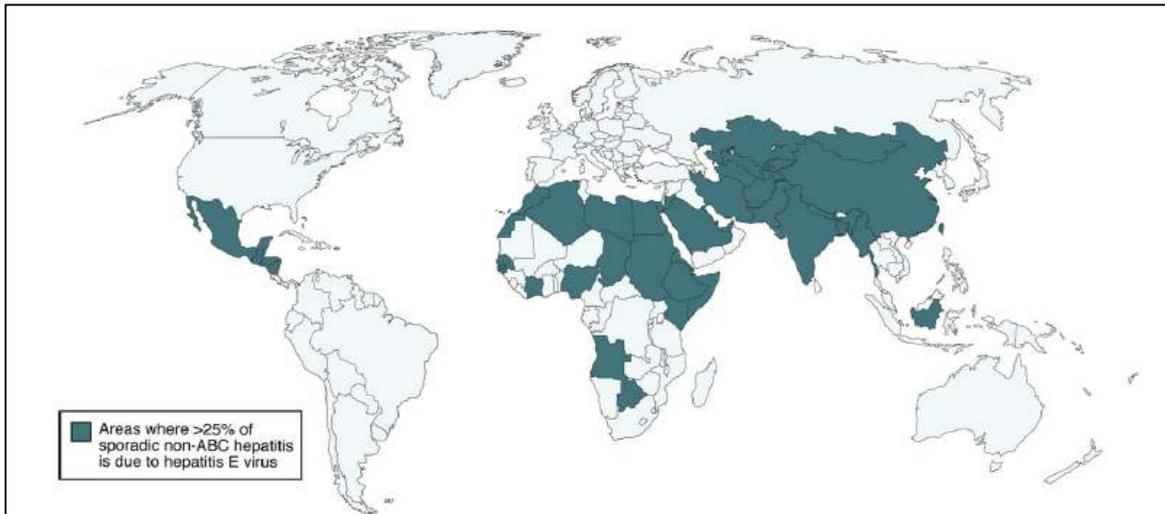


Figura 1.4. Areas de endemicidad de HEV en el mundo. La situación de México, si bien sigue siendo considerado un país endémico, está bajo activa discusión. Por detalles ver texto. Extraído de ³⁹.

Los Genotipos de HEV, además de presentar características epidemiológicas distintivas y diferencias en la distribución geográfica, presentan a su vez diferencias en el rango de huésped. Así es que el Genotipo 2 parece ser antroponótico, dado que se ha aislado exclusivamente de casos humanos, mientras que el Genotipo 1, si bien infecta principalmente seres humanos, también se ha detectado en cerdos ^{29,40, 41}.

En los países desarrollados y regiones no endémicas, la aparición de infecciones por HEV históricamente se ha asociado a viajeros que regresan de países endémicos ⁴². Sin embargo, en los últimos años la acumulación de evidencias

epidemiológicas recogidas en regiones y países no endémicos, indican que casos esporádicos localmente adquiridos (autóctonos) de hepatitis E asociados a los Genotipos 3 y 4, también se producen en individuos de estos países, sin existir antecedentes de viajes a zonas endémicas,^{8,43-45}. De hecho, en la última década el número de casos autóctonos asociados a los Genotipos 3 y 4 detectados en zonas desarrolladas se ha incrementado dramáticamente, junto con las evidencias que sugieren que la transmisión zoonótica a partir de reservorios animales mamíferos juega un rol preponderante en la diseminación del HEV en regiones no endémicas⁸.

Tabla 1.1. Características epidemiológicas y clínicas de los cuatro Genotipos (1-4) de HEV.

Genotipo	1	2	3	4
Hospedero	Humano. También aislado de cerdos.	Humano	Humano, cerdos y otras especies mamíferas	
Vía de transmisión	Fecal-oral. Persona-persona. Materno-fetal. Genotipo 1 probablemente zoonótico.		Zoonótico. Consumo de carne de reservorios cruda o mal cocida. Ambiental (mariscos); a la fecha reportado exclusivamente para Genotipo 3. Parenteral.	
Disitribución geográfica	Asia y Latinoamérica (Cuba, Venezuela y Uruguay)	México y varios países Africanos	Mundial	Este de Asia y Europa central
Características epidemiológicas	Endémico en Asia y Cuba. Genera brotes epidémicos y casos esporádicos. Más frecuente en personas jóvenes y viajeros	Endémico en México ?. Genera brotes y casos esporádicos en regiones sub desarrolladas Feciente en personas jóvenes.	Causa casos autóctonos en regiones industrializadas y países no endémicos. Mayor tasa de ataque en adultos y adultos mayores. Mayor letalidad, comparado con Genotipo 1	
Presentación clínica en humanos	Asintomática en la mayoría de los casos. Hepatitis aguda auto-limitada de gravedad moderada. Mayor letalidad en pacientes embarazadas y/o con enfermedades hepáticas crónicas subyacentes	Infección asintomática en la mayoría de los casos . Hepatitis aguda auto-limitada de gravedad moderada	Hepatitis aguda auto-limitada de gravedad moderada o asintomática. Puede derivar en cronicidad en pacientes transplantados (hasta la fecha exclusivamente reportado para Genotipo 3) e inmunocomprometidos	

Cepas de HEV de estos dos genotipos zoonóticos, cuya capacidad de infectar seres humanos haya sido demostrada, han sido aislados de cerdos, jabalíes y ciervos^{10, 46-49}.

La mayoría de los episodios de transmisión zoonótica, asociados a los Genotipos 3 y 4 han sido relacionados con la ingestión de carne cruda o poco cocida de estos mamíferos^{50,51}. En la Tabla 1.1 se resumen las principales características epidemiológicas de los cuatro Genotipos de HEV humanos reconocidos.

Los recientes avances en la comprensión de la epidemiología mundial de la infección por HEV, revela un cuadro bastante más complejo que el asumido inicialmente. Sin embargo, aún se observan distintivos patrones epidemiológicos en las regiones endémicas en comparación con las áreas no endémicas.

Los países endémicos presentan una prevalencia general de HEV que abarca el 25% de todos los casos de hepatitis aguda no-A, no-B, reportados⁵², mientras que la seroprevalencia anti-HEV IgG entre los donantes de sangre sanos puede ser tan alta como 45% en algunos países hiperendémicos⁵². Por el contrario, los reportes de los países industrializados, aunque suelen mostrar tasas muy variables de un estudio a otro, reportan prevalencias que van del 1 al 4%⁵³. No se observan, sin embargo, diferencias dramáticas adicionales en el tamaño y la frecuencia de los brotes, las tasas globales de ataque y la duración de la viremia⁵³. Estos temas vinculados a la epidemiología de HEV son revisados exhaustivamente por Kumar et al.¹⁰.

IV. CUADRO CLÍNICO

Históricamente, los datos sobre las manifestaciones clínicas de la hepatitis E se han obtenido básicamente de dos fuentes de evidencias; 1) informes de brotes de infección por HEV e infecciones esporádicas de zonas altamente endémicas, y 2) datos de serie de casos de hepatitis E de países no endémicos desarrollados. Por otro lado, la reciente observación de que la infección por HEV puede tender a la cronicidad en pacientes trasplantados y/o inmunodeprimidos, ha aumentado la complejidad de la enfermedad y aumentado su impacto, convirtiéndola en un problema de salud pública de gran preocupación.

i. Infección por HEV en regiones con alto endemismo

En las zonas de moderada y alta endemidad, la infección por HEV es la causa más común de hepatitis viral aguda^{13,54}. La presentación clínica de la enfermedad varía en gravedad, desde subclínica a una hepatitis fulminante. La mayoría de los casos agudos de hepatitis E tienen un curso clínico silencioso y los pacientes eliminan el virus rápidamente^{55,56}. Por su parte, la enfermedad sintomática se observa en aproximadamente el 20% de los pacientes ingresados y es más frecuente en los jóvenes y los adultos (14-40 años)⁵⁴. El cuadro clínico asociado a la infección por HEV es moderadamente grave y generalmente autolimitado, con tasas de letalidad de 0.5 a 4%. En los casos sintomáticos, el período de incubación varía de 2 a 8 semanas (media 40 días) y los síntomas iniciales son inespecíficos. Típicamente, estos incluyen síntomas pseudo-gripales, mialgia, artralgias, anorexia, hepatomegalia, fiebre, debilidad y vómitos, pero también los pacientes pueden presentar signos más específicos, como ictericia, prurito, heces de color claro, y orina oscura. Además, los síntomas clínicos suelen ir acompañados por un aumento de los niveles de enzimas hepáticas, especialmente la bilirrubina, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT)⁵⁴⁻⁵⁶. En ciertos casos, la infección por HEV puede conducir a una enfermedad hepática más grave en las mujeres embarazadas o pacientes con enfermedades hepáticas crónicas, lo cual puede progresar a una insuficiencia o falla hepática fulminante (FHF)⁵⁷.

Actualmente, se investiga con mucho énfasis la relación entre la infección por los Genotipos 1 y 2 de HEV y el embarazo. En pacientes gestantes, la enfermedad hepática aguda puede conducir más frecuentemente a la FHF, con una mortalidad de hasta un 30% en regiones endémicas¹⁰. Esta asociación se informó por primera vez durante varios brotes en la India, pero también se ha encontrado en casos esporádicos en áreas de alta incidencia de HEV². La infección durante el embarazo también se asocia con episodios de aborto, prematuridad, bajo peso al nacer y un mayor riesgo de mortalidad perinatal⁵⁸. Si bien el papel de factores inmunológicos y hormonales se ha sugerido en esta asociación, actualmente no es claro por qué el embarazo promueve una manifestación más grave de la hepatitis E^{59,60}.

ii. Infección por HEV en regiones no endémicas

Las diferencias en las características clínicas y epidemiológicas de la infección aguda por HEV entre los pacientes que viven en países no endémicos y áreas altamente endémicas son evidentes: mayores tasas de ataque en adultos de edad media y avanzada, tasas generales de mortalidad más alta y una mayor frecuencia de síntomas inespecíficos, son claramente distinguibles. Por otro lado, manifestaciones clínicas severas por infección por Genotipo 3 o 4 durante el embarazo sólo se han reportado ocasionalmente^{61,62}.

iii. Infección crónica por HEV

Aunque convencionalmente se considera que la infección por HEV es autolimitada con una eliminación espontánea del virus en la mayoría de los pacientes, en los últimos años se han reportado episodios de viremias persistentes fundamentalmente en países de baja endemicidad y en casos esporádicos en regiones endémicas^{63,64}.

La capacidad de HEV de persistir en estado crónico es un problema importante en los receptores de trasplantes de órganos que reciben medicamentos inmunosupresores para evitar el rechazo. Este grupo de pacientes es la principal población en riesgo de desarrollar una hepatitis E crónica, lo cual está bien documentado en casos de trasplante de hígado y el riñón⁶⁵⁻⁶⁷. Recientemente se ha sugerido también que la infección crónica por HEV es una causa importante de anormalidades en los valores de enzimas hepáticas observadas luego de trasplante de pulmón y corazón, con una posterior desarrollo de fibrosis hepática⁶⁸. Además, este cuadro crónico se ha evidenciado en pacientes con otras afecciones asociadas con la inmunosupresión, tales como la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), distintos tipos de linfoma y leucemia^{61,63}. Sin embargo, el establecimiento de una infección viral persistente por HEV parece ser mucho menos frecuente en este grupo que en los pacientes con trasplante de órganos sólidos.

Por lo tanto, la infección crónica por VHE en individuos inmunocomprometidos es un problema clínico emergente importante. Recientemente, González et al.⁶⁹ reportó el primer caso de un paciente sano, inmunocompetente, que desarrolló

un episodio de hepatitis aguda por HEV, con progreso a enfermedad hepática crónica en un período de 1 año.

V. TRASMIÓN DE HEV

El consumo de agua contaminada con materia fecal en las regiones altamente endémicas, frecuentemente con prácticas deficientes de saneamiento y el consumo de carne o productos derivados crudos o poco cocidos de animales infectados, especialmente en los países industrializados, dan cuenta de la mayoría de los eventos de transmisiones de HEV, resultando en una importante problema para la salud pública^{8,10}.

Frecuentemente, el modo exacto de transmisión de HEV sigue siendo controvertido y las fuentes de infección de virus a menudo no están bien identificados, en particular en casos esporádicos de hepatitis E aguda. En este sentido, investigaciones recientes refuerzan la idea de la existencia de tres rutas adicionales de transmisión de HEV: parenteral (transmisión hematológica)⁷⁰, transmisión humano-humano⁷¹ y vertical de madre a hijo (transmisión intrauterina y perinatal)⁷² (Fig. 1.5.).

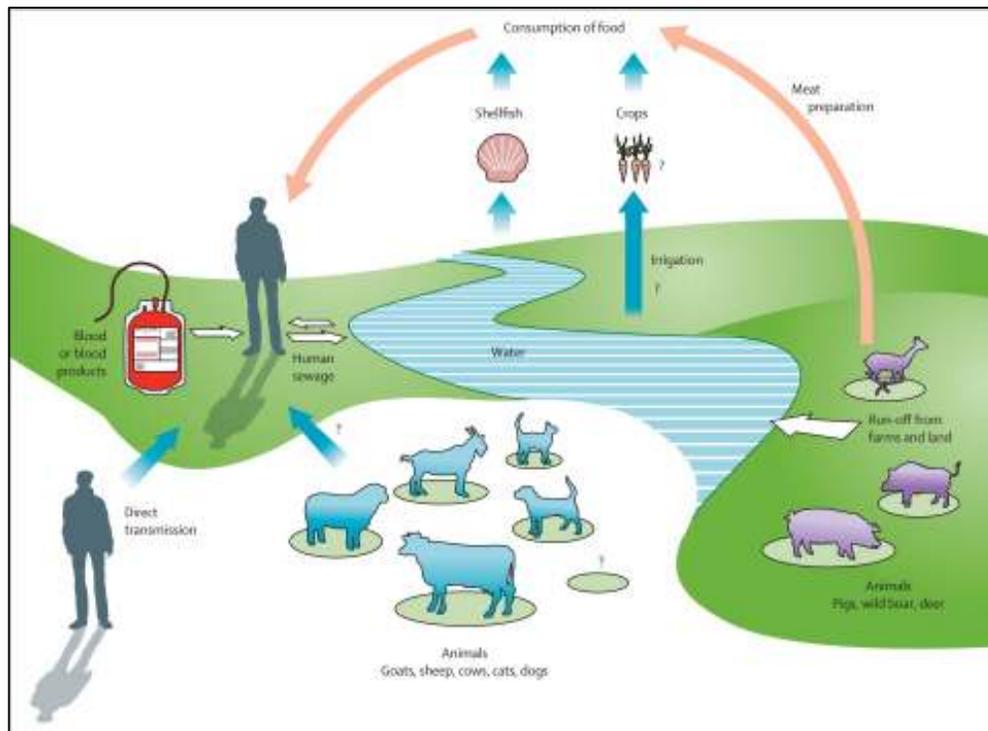


Figura 1.5. Vías de transmisión de HEV y ciclo propuesto en la naturaleza. Por detalles ver texto. Extraído de MedlinePlus <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>.

A pesar de que se cree estas vías de transmisión son menos frecuentes, las crecientes líneas de evidencia en esta materia conducen a la necesidad de optimizar las medidas profilácticas tendientes a prevenir la infección por HEV.

i. Trasmisión por fuentes de agua. Vía fecal-oral.

El reporte documentado más antiguo de ocurrencia de hepatitis E fue generado en una gran epidemia transmitida por el agua en Nueva Delhi, India, en 1955. A partir de ese momento, innumerables brotes han ocurrido en regiones endémicas⁷³. El HEV es un patógeno de transmisión principalmente entérica, y se ha demostrado claramente el rol de fuentes de agua contaminada en la generación y emergencia brotes epidémicos. A su vez, en las regiones subdesarrolladas, ocasionalmente se identifica la infección con HEV en el transcurso de brotes de HAV, en la forma de doble infección o asociadas¹. Esta particularidad claramente aumenta la complejidad de la epidemiología de HEV y dificulta aún más su comprensión³³. Es notable que estos brotes de origen hídrico, se han asociado exclusivamente con cepas del Genotipo 1 y 2, no existiendo reportes de epidemias por los otros dos genotipos⁷⁴⁻⁷⁷. No obstante, la presencia de cepas infecciosas de HEV en el ambiente (cursos de agua, aguas recreacionales, moluscos bivalvos) estrechamente relacionados desde un punto de vista filogenético con las cepas que circulan en los seres humanos y otros animales también se ha demostrado tanto en los países industrializados como en vías de desarrollo⁷⁸⁻⁸³. Numerosos informes han identificado al Genotipo 3 como el principal tipo que circula en el ambiente en zonas de bajo endemismo, jugando un papel potencial en la propagación de la infección por HEV entre los humanos⁸¹⁻⁸³. Sin embargo, si bien se han reportado estudios que sugieren que el virión de HEV es lo suficientemente estable como para ser transmitido desde fuentes ambientales hacia humanos o animales reservorios, deben llevarse a cabo estudios adicionales para evaluar su capacidad patógena y riesgo asociado en los casos en que los niveles de contaminación del virus son bajos⁸³.

ii. Trasmisión zoonótica

Considerando que el HEV es único entre los virus hepatotrópicos conocidos, con varias especies animales susceptibles capaces de desempeñar un papel como reservorio de la enfermedad (cerdos, jabalíes y ciervos)⁸⁴, la transmisión zoonótica, causada por cepas de los Genotipos 3 y 4 cepas de HEV, ha sido profusamente investigada^{6,7,40,46,47,85,86}.

El virión o partícula viral de HEV es muy estable y resistente a las condiciones físico-químicas adversas, y tiene la capacidad de permanecer infeccioso en un ambiente de hasta 60 °C, lo que sugiere la posibilidad de transmisión del HEV por el consumo de carne contaminada, aún cocida⁸³. De hecho, eventos de transmisión por el consumo de carne de animales salvajes (ciervos y jabalíes) y domésticos (cerdos y conejo), se ha demostrado claramente existiendo pruebas convincentes^{8,87}.

Recientemente, en un revelador estudio, se han detectado y aislado viriones de HEV infecciosos a partir de salchicha de hígado de cerdo producida en Francia⁵⁵. Esto prueba que el consumo de productos embutidos derivados de carne de cerdos o jabalíes puede ser un riesgo factor para la infección por HEV en los seres humanos, y para lo cual un origen seguro debe estar garantizado.

Asimismo, se ha descrito la transmisión zoonótica de HEV a través de contacto directo con animales reservorios infectados⁸⁸⁻⁹⁰. En este sentido los agricultores, veterinarios y trabajadores en general que manipulan este tipo de animales, comprenden el grupo más expuesto al riesgo de infección por HEV. El consumo de mariscos, a su vez, también se ha sugerido como posible fuente de infección para los seres humanos y los reservorios animales. Said et al.⁹¹ han identificado recientemente a un plato elaborado a base de mariscos contaminados con HEV como el factor de riesgo casi exclusivo involucrado en un brote ocurrido a bordo de un barco de crucero en aguas europeas. Posteriormente, cepas de HEV han detectadas y caracterizadas en mejillones comerciales en distintos países europeos^{92,93}.

El rol de otros reservorios como potencial fuente de transmisión de HEV es materia de discusión en la comunidad científica. Uno de los animales en los que se ha puesto más énfasis es en las ratas. Diversos estudios han reportado la

detección y caracterización de cepas de HEV o HEV-like con un cierto grado de identidad nucleotídica con cepas del Genotipo 3^{8,94,95}. Sin embargo, los resultados referentes a la capacidad de estas nuevas cepas de infectar humanos o suinos son contradictorios. Un detallado estudio llevado a cabo por Jirintai et al.⁹⁶ sugiere que cepas de HEV aisladas de ratas salvajes son capaces de replicar eficientemente en líneas celulares derivadas de hepatomas humanos. Por su parte, un estudio previo sugiere que cepas del Genotipo 3 de HEV son incapaces de infectar de forma natural ratas en condiciones de laboratorio⁹⁷. Sin embargo, es posible generar una infección productiva en estos animales si se inocula un clon de cDNA infectivo del Genotipo 4 por vía intrahepática⁹⁸.

En resumen, el riesgo zoonótico de transmisión de HEV es un problema de salud que genera gran preocupación. Este mecanismo de transmisión está muy bien documentado y estudiado en términos generales, con una gama de huéspedes en constante expansión y con la reciente identificación de nuevas especies animales reservorios.

iii. Trasmisión vertical

En las zonas de alto endemismo, HEV es la causa más común de hepatitis aguda, también durante el embarazo, si bien las razones por las cuales la infección se puede manifestar de forma más grave en esta condición se desconocen¹⁰. Curiosamente hasta la fecha, la alta mortalidad en la mujer embarazada ha sido sólo asociada casi exclusivamente a infecciones con cepas del Genotipo 1, mientras que no han habido reportes de casos que involucren los Genotipos 3 y 4^{94,95}. Por el contrario, sin embargo, un caso de insuficiencia hepática aguda en una mujer embarazada durante un brote en Namibia por infección con Genotipo 2 ha sido descrito⁷⁷.

La infección por HEV se transmite comúnmente de madre a hijo a través de rutas intrauterinas y perinatales, provocando en el feto y neonatos, una enfermedad hepática grave con altas tasas de mortalidad^{58,72,99-101}. Asimismo, el curso clínico de la infección por HEV de transmisión vertical en los recién nacidos sobrevivientes es autolimitada con una viremia de corta duración⁷².

En los países en desarrollo, la infección por HEV es responsable de ~2400-3000 mortinatos cada año, con muertes fetales adicionales relacionadas con la mortalidad materna prenatal. Sin embargo, no está claro si el aumento de mortinatos es atribuible al virus transmitido en forma vertical o si es el resultado de complicaciones derivadas de la infección en la madre⁹⁹. Diversos estudios sugieren que la gravedad del cuadro clínico en la madre y el bebé pueden estar relacionado entre sí y la infección en el feto influir en el curso de la infección por HEV en la madre^{102,103}.

Por otra parte, no existen datos concluyentes acerca de la posibilidad de que el HEV se puede transmitir a través de la leche materna, así como tampoco hay información referida a la influencia de la infección asintomática en el embarazo¹⁰⁴. En este sentido, la vigilancia serológica y seguimiento durante el período de gestación junto con resultados de estudios perinatales y neonatales son necesarios para entender estas cuestiones.

iv. Trasmisión persona-persona

El impacto del papel de la transmisión de persona a persona en la dinámica de la infección por HEV es todavía controversial y se cree que no contribuye significativamente al aumento de la morbilidad en las epidemias^{73,105}. Sin embargo, en los países en desarrollo, la falta de higiene, tanto personal como de utensilios usados en la cocina, puede ofrecer oportunidades constantes de contaminación con el virus, provocando un aumento de la tasa de transferencia de humano a humano durante un brote¹⁰⁶.

Muchas líneas de evidencias son las que indican que la transmisión de persona a persona es poco común, especialmente en los casos esporádicos de hepatitis E^{105,107}. Sin embargo, en las zonas endémicas, a pesar de que la mayoría de los brotes de infección por HEV han mostrado tener una corta duración y estar vinculados a un fuente de agua potable común, también se han reportado algunos brotes multimodales y prolongados que podrían ser el resultado de una transmisión persona a persona continua¹⁰⁸.

De hecho, algunos estudios han sugerido este tipo de trasmisión es factible durante las epidemias^{105,109} Recientemente, la primera evidencia directa de este

tipo fue reportada de un brote de HEV en el norte de Uganda⁷³. La inexistencia de una fuente común de infección continua necesaria para sostener la epidemia durante varios meses, la alta tasa de ataque secundario estimada y la ausencia de HEV en animales reservorios proporcionaron datos e información que apoyaron esta hipótesis. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para comprender mejor los mecanismos probables y los vehículos de transmisión. Similarmente en regiones no endémicas, aunque es poco común, la propagación de la infección intrafamiliar esporádica de HEV ha sido sugerida como un modo de transmisión probable^{71,107}.

v. Trasmisión parenteral

En los países industrializados, a pesar de que sólo en unos pocos casos esporádicos la fuente de la infección por HEV pudo ser ciertamente identificada, la mayoría de ellos tienen un origen probablemente zoonótico, a través del consumo de carne cruda de reservorios animales¹¹⁰. Este modo de transmisión, en el que la mayor parte de las infecciones suele ser asintomática, puede llevar a la rápida propagación de la infección por HEV por personas con infección subclínica. De hecho, varias investigaciones han reportado tasas de seroprevalencia sorprendentemente altas (hasta 50%) en individuos sanos, lo que sugiere una amplia circulación de cepas del HEV^{111,112}.

Est situación es de particular importancia para la transmisibilidad del HEV durante eventos de transfusiones sanguíneas, dado que los donantes potencialmente infectados tal vez nunca hayan tenido signos clínicos. Por tanto, y considerando que el HEV no se puede inactivar totalmente en productos derivados de la sangre¹¹³, este virus ha surgido recientemente como un patógeno de transmisión transfusional de gran preocupación, lo que ha llevado a un resurgimiento del interés de la comunidad científica en este campo. A pesar de que la ruta parenteral no parece ser una vía frecuente de contagio, el riesgo potencial de transmisión de HEV por transfusión ha sido sugerido por varios estudios^{1,112-114}. De hecho, distintos análisis moleculares comparativos de cepas de HEV obtenidas de donantes de sangre y sus receptores han aportado evidencia directa de la transmisión parenteral de los Genotipos 1 y 3^{115,116}.

Ciertamente, en los últimos años, el conocimiento sobre la epidemiología de HEV, su biología y los modos de transmisión, especialmente en regiones no endémicas se ha incrementado notablemente. Por lo tanto, en un futuro próximo será necesario establecer guías estandarizadas y políticas para, cuando sea posible, investigar de forma rutinaria la presencia de HEV en bancos de sangre y órganos. De hecho, recientemente, se ha desarrollado un nuevo método para la detección rutinaria de la infección por HEV en donantes de sangre¹¹⁷. Sin embargo, especialmente en los países en desarrollo, el costo de implementar de manera eficiente programas de cribado o screening basados en técnicas moleculares encaminadas a prevenir la transmisión del HEV por transfusión de sangre, es muy elevado.

VI. DIAGNÓSTICO

Generalmente, la infección aguda por HEV se diagnostica mediante la detección de anticuerpos específicos anti-HEV (IgM e IgG). Sin embargo, tanto la especificidad como la sensibilidad de los ensayos disponibles en diferentes configuraciones no es óptima y resultados altamente variables se observan dependiendo del ensayo comercial empleado^{118,119}. A su vez, el análisis de ARN viral en muestras biológicas tales como heces, suero y biopsia de hígado mediante el uso de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT; por *Nucleic Acid Techniques*) también se utiliza para el diagnóstico. Aunque a la luz de los recientes avances en la comprensión de la epidemiología y la patogenia de HEV, varios algoritmos de diagnóstico se han propuesto¹²⁰, sigue siendo fundamental la estandarización de criterios diagnósticos. Particularmente, el diagnóstico de la infección por HEV en pacientes inmunocomprometidos y los receptores de trasplante de órgano sólido en el que la seroconversión para los anticuerpos anti-HEV se retrasa o no se produce en absoluto, es de especial preocupación. A continuación se resumen las principales herramientas de diagnóstico disponibles empleados en la actualidad para la identificación de la infección aguda por el HEV, discutiendo su performance en diferentes ámbitos sobre la base de los hallazgos recientes.

i. Test serológicos

Muy poco se sabía acerca de los aspectos inmunológicos de la infección por HEV hasta hace pocos años, cuando el patrón y la dinámica de la respuesta de anticuerpos contra el virus fue identificado y entendido. Los anticuerpos anti-HEV de la clase IgM aparecen durante la fase aguda de la infección siendo detectables generalmente 4 días después de la aparición de la ictericia, y persiste por hasta 5 meses¹²¹. Sin embargo, las reacciones fuertemente positivas en los ensayos serológicos son raras después de 3 meses⁶². En general, el 90% de los pacientes que cursa una hepatitis E aguda tiene anti-HEV IgM detectable dentro de las 2 semanas del inicio de la enfermedad¹²¹, mientras que los anticuerpos anti-HEV IgG son detectables poco después de la aparición de los IgM. Así, el hecho de que ambas clases de anticuerpos probablemente se desarrollan simultáneamente en la infección aguda hace difícil un diagnóstico serológico preciso de la hepatitis E. Por otro lado, mientras que los anticuerpos anti-HEV IgM disminuyen rápidamente en un período que dura unos pocos meses, IgG persiste durante más tiempo, en un período variable de entre 1 y 14 años luego de resuelta la infección¹²².

Los inmunoensayos comerciales disponibles actualmente para la detección de anticuerpos específicos contra el HEV durante la infección aguda difieren dramáticamente en su sensibilidad y especificidad, lo que explica parcialmente las diferencias en los datos de seroprevalencia de HEV observados en diferentes estudios¹²³.

Comúnmente, los inmunoensayos clásicos disponibles para IgM tienen una sensibilidad de entre 90 y 97% con resultados falsos positivos de hasta un 2.5%^{124,125}. A su vez, varios de ellos generan resultados falsos negativos en pacientes infectados, particularmente con el cepas del Genotipo 1¹²⁶. De hecho, muchas metodologías de diagnóstico serológico se basan en antígenos virales genotipo-específicos, limitando de este modo la detección de todos los genotipos del HEV en forma simultánea.

Paralelamente, la variabilidad genética intrínseca del HEV conduce a modificaciones significativas de los sitios antigénicos que deriva en importantes implicancias en el desarrollo de inmunoensayos fiables y de buena calidad. Sin

embargo, a pesar de esta variabilidad, los cuatro genotipos comparten dominios de reacción cruzada dentro de Cap, codificada por el ORF2, incluyendo el dominio neutralizante mínimo que comprende los aa 458 a 607^{53, 127}. Antígenos o péptidos inmunodominantes de Cap y la proteína codificada por el ORF3 son ampliamente utilizados en el desarrollo de pruebas serológicas comerciales para la detección de anticuerpos IgM, IgG, IgA contra el HEV^{128,129}.

Los esfuerzos de investigación recientes se han centrado fundamentalmente en la construcción y optimización de antígenos recombinantes derivados de Cap expresados ya sea en Baculovirus o *Escherichia coli*¹⁷. En particular, los enfoques que utilizan tecnologías de partículas similares a virus (VLP ; por *Virus-Like Particles*) en sistemas de expresión eucariotas, como el caso de Baculovirus, parece ser los métodos más apropiados para la construcción de antígenos de HEV para dispositivos de diagnóstico^{121,125}.

A pesar de que todos los inmunoensayos basados en Cap efectivamente han mejorado la sensibilidad de los métodos más antiguos, la especificidad aún necesita ser aumentada, especialmente en regiones de baja endemicidad, donde la ocurrencia de falsos positivos en la detección de IgM se ve incrementada¹³⁰.

En un estudio reciente, implementado con el objetivo evaluar el desempeño de los dispositivos comerciales disponibles en la actualidad para la detección de anticuerpos anti- HEV IgG/M, se probaron 300 muestras de suero de pacientes procedentes de zonas no endémicas almacenados en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Taiwán¹²¹. Seis inmunoensayos, basados en diferentes determinantes inmunodominantes se incluyeron en la evaluación: ElAgen HEV IgG/M (Adaltis, Bolonia, Italia) incluye Cap (aa 619-660) y ORF3 (aa 101-123), derivada de la cepa Birmania (Genotipo 1) y la cepa Mexicana prototipo del Genotipo 2; recomWell HEV IgG/M (Mikrogen, Neuried, Alemania) utiliza antígenos del virus recombinantes purificadas HEV-ORF2 derivados de cepas de los Genotipos 1 y 3; MP HEV IgM ELISA 3.0 (MP Biomedicals, Singapur) , detecta anticuerpos dirigidos a péptidos recombinantes codificadas por el ORF2 y una proteína recombinante completa codificada por ORF3 de los Genotipo 1 y 3; los restantes fueron ensayos *in-house* diseñados para detectar IgG/M que utilizan VLP de HEV (HEVLP) altamente purificada como antígeno, expresada por un

Baculovirus recombinante y auto-ensamblado con una proteína recombinante codificada por el ORF2 consistente en los aa 112 a 660 de la cepa de Birmania.

Este estudio mostró que recomWell IgM tuvo la mayor sensibilidad (93,3%), y presentó el mejor rendimiento global para el diagnóstico y la detección de la infección aguda por HEV en Taiwán. Asimismo, las HEVLPs para la detección de IgM tuvo la mayor especificidad (95,6%) y valor predictivo positivo (40%), a pesar de su tasa de sensibilidad relativamente baja (66%). Más allá de evidentes diferencias en la sensibilidad y especificidad de los ensayos, todos los sistemas de detección de anti-HEV IgM en este estudio fueron mejores que los ensayos de identificación de anti-HEV IgG. Además, fue posible aumentar la sensibilidad a un máximo de 100% y mejorar la especificidad significativamente, mediante la combinación de ensayos anti IgM e IgG del mismo proveedor o dos sistemas de detección de IgM diferentes. Así, al menos en las zonas no endémicas, estos enfoques parecen tener robustez razonable para su uso como herramientas de detección para la infección por HEV aguda en pacientes inmunocompetentes.

Además de los profusos reportes que evidencian inconsistencias de sensibilidad y especificidad entre los diferentes inmunoensayos disponibles^{131,132}, se ha informado a su vez reactividad cruzada con otros virus hepatótrofos tales como Epstein-Barr virus (EBV) y Citomegalovirus (CMV) en la detección de anti-HEV IgM. Esto evidentemente es clínicamente problemático y relevante, ya que estos virus forman parte del diagnóstico diferencial de hepatitis aguda, una vez que la infección por HAV fue excluida¹³³.

ii. Tests basados en la detección de ARN. NAT's.

La abundante información relativa a la performance dispares de las pruebas serológicas disponibles en la actualidad en las regiones endémicas y no endémicas, sumado a la baja sensibilidad y la ocurrencia de reactividad cruzada con otros virus hepatótrofos reportado en diferentes situaciones clínicas, plantea la interrogante de si la prueba de detección de ARN de HEV debe llevarse a cabo en todos los pacientes con sospecha de hepatitis E.

Sin embargo, la sensibilidad de las metodologías moleculares para la detección de ARN viral es altamente dependiente de la presentación temprana del paciente

en el centro médico y la rápida obtención de las muestras de suero o de heces, así como del transporte y procesamiento apropiado. Por lo tanto, el ARN viral indetectable no descarta la infección por HEV¹¹⁵. Si bien el ARN de HEV puede ser detectado en el inicio de la enfermedad y hasta 6 y 4 semanas después en las heces y suero, respectivamente, los niveles de ARN virales suelen ser bajos, reduciendo así el tiempo ventana de detección de HEV¹³⁴.

A pesar de estas consideraciones, la detección del ARN viral en muestras biológicas es el estándar de oro para la confirmación de la hepatitis aguda por HEV¹³⁵. Desafortunadamente, la detección basada en NAT implica la implementación de métodos muy costosos que eventualmente pueden no estar disponibles para laboratorios de diagnóstico y además exige técnicas muy especializadas y personal capacitado.

En los últimos años han sido reportados varios ensayos NAT para la detección e identificación de HEV RNA en muestras de suero y de heces, incluyendo la transcripción inversa seguida por PCR (RT-PCR), PCR a tiempo real, y la transcripción inversa seguida de amplificación loop-isotérmica. Estas NAT incluyen ensayos diseñados para detectar simultáneamente los cuatro genotipos de HEV que infectan humanos^{134,136,137}.

Sin embargo, las NATs para HEV aún no han sido bien estandarizadas y se ha observado una variabilidad muy alta en la performance de cada una de ellas en estudios multicéntricos. En 2009, el Paul-Ehrlich-Institut inició el desarrollo, con la aprobación del Comité de Expertos en Patrones Biológicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de un Estándar Internacional (IS) de ARN de HEV para su uso en ensayos NAT. El estudio inicial que investigó el rendimiento de varios ensayos NAT utilizados en la detección de la infección por HEV fue completado recientemente¹³⁸. En este trabajo, Baylis et al., incluyó cuatro virus pertenecientes a los Genotipos 3 (subtipos 3a, 3b y 3f), y 4 (subtipo 4c) que se sometieron a pruebas independientes en varios laboratorios de diferentes países. A pesar de que se concluyó que cualquiera de estas cepas se podrían utilizar para el desarrollo de un IS, las cepas del Genotipo 3 aparentemente parecían ser las mejores candidatas por dos razones principales: por un lado,

porque que tienen la distribución más amplia en todo el mundo y, por otro otro, los aislados de este genotipo son los responsables de las infecciones crónicas.

VII. HISTORIA Y SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE HEV EN SUDAMÉRICA

En América del Sur, donde no existen zonas endémicas para HEV, los datos relativos a su prevalencia y epidemiología molecular en humanos y reservorios animales es todavía escasa. Sin embargo, en los últimos años han surgido varios reportes en esta materia y convirtiéndose el HEV en un foco principal de interés para los investigadores.

i. Seroprevalencia en humanos y suinos

Los primeros relevamientos serológicas en relación a la circulación de HEV en seres humanos en América del Sur fueron implementados hace tan solo 20 años. En Venezuela, Puyol et al.¹³⁹ reportaron tasas de seroprevalencia que oscilaban entre un 1,6 y hasta 5,4% en tres poblaciones diferentes (mujeres embarazadas de zonas urbanas, población rural y amerindios).

Mientras tanto, en Chile se estudió la presencia de anticuerpos anti-HEV en 1773 muestras. Se observó una seroprevalencia de 8,0%, 12,5%, 7,5% y 17% en donantes de sangre, trabajadores de salud, población reclusa e indios araucanos, respectivamente. Asimismo, la prevalencia de anticuerpos específicos no estaba relacionada con la edad y/o sexo¹⁴⁰. Paralelamente, se detectaron anticuerpos específicos anti-HEV en el 1,2% de los niños de una población bajo nivel económico-social¹⁴¹.

Por otra parte, los estudios realizados con poblaciones de donantes de sangre de Uruguay y Argentina, realizados hace más de 10 años atrás revelaron una prevalencia específica de anticuerpos anti-HEV de 1,2 y 1,8%, respectivamente^{142,143}. Sin embargo en la ciudad de Córdoba, Argentina, recientes estudios arrojaron una seroprevalencia de anti-HEV IgG de 4.4%¹⁴⁴.

Un estudio llevado a cabo por Bartoloni et al.¹⁴⁵ con poblaciones rurales de Bolivia mostraron tasas de entre 4,4 y 10,4%, sin diferencias significativas entre sexos. En Perú, si bien no existen datos relativos a la seroprevalencia en la

población general, anti-HEV IgG se detectó en el 10,5% de los sujetos que comprendidos dentro de un grupo considerado de riesgo¹⁴⁶.

En Brasil por su parte, la prevalencia de anti-HEV IgG en un grupo de mujeres embarazadas y de usuarios de drogas por vía intravenosa fue de 1,0 y 4,3%, respectivamente¹⁴⁷. En los donantes de sangre la seroprevalencia varía entre el 2,3 y el 11,8%, según diversos estudios^{147,148}. Da Silva et al.¹⁴⁹ ha reportado recientemente una seroprevalencia del 8,4% en los individuos expuestos a cerdos en Matto Grosso, a pesar de que en este trabajo no se define este tipo de exposición como un factor de riesgo para la infección por HEV en esta región.

Cabe destacar, sin embargo que los kits de detección de anticuerpos, particularmente los primeros en ser desarrollados en las décadas de 1980 y 1990, así como los actuales, exhibían una muy alta variabilidad generando resultados inconsistentes, particularmente en países no endémicos y con cepas no epidémicas¹⁵⁰. Así, la baja especificidad de los kits empleados probablemente sobreestimen las tasas calculadas en los estudios aquí presentados

Años más recientes, una vez que se sugirió por primera vez el papel potencial de cerdo como reservorio de la infección por HEV y su riesgo zoonótico, varios estudios se han llevado a cabo con el fin de determinar la prevalencia de anticuerpos anti-HEV en piaras de cerdos en América del Sur.

Como observación general cabe destacar que la seroprevalencia media entre los diferentes relevamientos es muy variable: 23% en Argentina, 81% en Brasil y 5% en Chile¹⁵¹⁻¹⁵³. Asimismo existe una alta variabilidad entre los diferentes rebaños incluidos en estos estudios (4 a 58% para el estudio de Argentina y 15 a 100% para el estudio brasileño). Del mismo modo en Chile, la seroprevalencia de HEV en cerdos varía significativamente entre las regiones geográficas, con tasas que van desde 0,6 hasta 9,5%¹⁵¹.

En Uruguay, así como la mayoría de los países de América del Sur, no se han reportado estudios acerca de la seroprevalencia de HEV en cerdos domésticos y salvajes.

ii. Epidemiología molecular

La epidemiología molecular del HEV en América del Sur es mucho más compleja de lo sugerido por los estudios pioneros, y en general los modos de transmisión y las fuentes de infección no son bien entendidos. A pesar de que varios intentos de arrojar luz sobre la situación epidemiológica de esta infección se ha llevado a cabo en América del Sur, la información sobre la caracterización molecular y circulación de cepas de HEV es todavía escasa y son necesarios estudios adicionales.

En Sudamérica, las primeras cepas de HEV fueron aisladas de dos pacientes argentinos con hepatitis aguda que habían reportado antecedentes de viajes al sur de Asia, zona considerada endémica para HEV¹⁵⁴. En ese estudio, las cepas mostraron no estar filogenéticamente relacionadas con otros aislados de HEV descritos anteriormente y preliminarmente fueron clasificados como un nuevo genotipo viral. Más tarde, Munné et al.¹⁵³ reportó por primera vez en la región, la detección y caracterización molecular de las primeras cepas porcinas de HEV aisladas de muestras de heces en un criadero ubicado en Buenos Aires. Basándose en el análisis de un fragmento de 287 nt dentro del ORF1, estas secuencias agruparon dentro del Genotipo 3 y exhibieron una estrecha relación con las variantes identificadas anteriormente en Argentina de casos esporádicos de hepatitis E aguda en humanos. Sobre la base de la reconstrucción filogenética reportada en el trabajo Munné et al., las variantes descritas por Schlauder et al. fueron reasignados dentro del Genotipo 3¹⁵⁴.

Posteriormente, en un estudio realizado con el objetivo de comprender mejor la epidemiología molecular de la infección por HEV en Argentina, se demostró claramente, mediante detallados análisis filogenéticos realizados en base a una región del ORF1 y una pequeña secuencia del ORF2, la co-circulación de variantes polifiléticas¹⁵⁵. En catorce de los quince casos diagnosticados de infección aguda por HEV incluidos en este estudio, fueron detectados cepas del Genotipo 3 y se identificaron aislados de los subtipos 3a, 3b y 3i. A pesar del hecho de que el Genotipo 3 fue el predominante, y probablemente responsable de la mayoría de los casos autóctonos de la infección por HEV en Argentina, también se detectó una cepa perteneciente al Genotipo 1. Esta cepa demostró estar asociada a un

caso importado por un paciente con antecedentes de viaje a India. Así, la amplia circulación de variantes polifiléticas de Genotipo 3 junto a la detección de cepas del Genotipo 1, sugiere la existencia de múltiples fuentes de infección del HEV en Argentina.

La circulación de múltiples variantes polifiléticas en Argentina fue confirmada recientemente en un completo estudio realizado con muestras de origen ambiental, derivadas de cursos de agua y plantas de tratamiento de aguas residuales e la ciudad de Córdoba¹⁴⁴.

En Brasil, la historia evolutiva de HEV parece ser diferente a la observada en Argentina. De hecho, la primer cepa descrita, clasificada dentro del Genotipo 3 mediante análisis del genoma completo, fue aislada de un cerdo en el año 2007, cuando aún no se habían registrado ningún caso de infección por HEV en seres humanos en ese país¹⁵⁶. Dos años más tarde, Lopes dos Santos et al.¹⁵⁷ reportó la detección y caracterización molecular de cuatro nuevas cepas del Genotipo 3. A pesar de que las secuencias no fueron en su momento comparadas con la cepa descrita anteriormente por Paiva et al.¹⁵⁶, ellas demostraron luego estar estrechamente relacionados entre sí. Sin embargo, el análisis filogenético reveló que las cepas Brasileñas eran muy distintas a todas las Argentinas descritas hasta aquel momento.

Más tarde, en un estudio retrospectivo, se reportó el primer caso humano de una infección por HEV autóctona en Brasil ocurrido en el 2006¹⁵⁸. La cepa aislada de la muestra de suero del paciente fue clasificada dentro de Genotipo 3 (subtipo 3b) y estaba estrechamente relacionado con dos de las cepas porcinas previamente caracterizadas en Brasil¹⁵⁷. Así, los datos presentados en ese trabajo sugieren claramente un origen zoonótico de la infección.

En Bolivia existen algunos estudios interesantes acerca de la epidemiología molecular de HEV. El primero de ellos reportó la caracterización molecular de las primeras cepas humanas y porcinas de HEV detectadas en Bolivia¹⁵⁹. En un análisis preliminar, basado en una reconstrucción filogenética utilizando un fragmento de 348 nt correspondiente a la ORF2, las secuencias obtenidas de cerdos y humanos mostraron estar muy estrechamente relacionados, agrupadas dentro del Genotipo 3. Un análisis posterior más detallado permitió demostrar

las cepas de cerdos y humanos pertenecían al subtipo 3i y 3e, respectivamente¹⁶⁰. Sin embargo, su relación filogenética con otras cepas de HEV aisladas en otros países de Sudamérica aún necesita ser dilucidada.

Los primeros casos de infección por HEV en Venezuela fueron reportados recientemente por García et al.¹⁶¹. En este trabajo dos cepas fueron clasificadas dentro del Genotipo 1 y una dentro del Genotipo 3, estrechamente relacionadas con la cepa Yam 67 (norte de India) y el aislado de referencia US1 de Estados Unidos., respectivamente. A pesar de que la cepa del Genotipo 1 mostró ser idéntica (100% de identidad de nucleótidos dentro de la región codificante de ARN polimerasa dependiente de ARN de la ORF1) con la cepa Yam 67, la infección se consideró autóctona ya que los pacientes no reportaron viajes fuera del país en los dos meses anteriores previos al inicio de los síntomas. A su vez, los resultados de este trabajo implican que el HEV es una causa importante de hepatitis aguda en Venezuela, con una alta morbilidad en niños y adultos jóvenes, lo que sugiere que esta infección es probablemente endémica en el país.

En nuestro país, en noviembre de 2009 se detectó el primer caso esporádico autóctono de infección por HEV. A partir de entonces, nuevos casos fueron identificados e investigados^{34,162}. Ver **Capítulo 3**.

Los estudios previos sobre HEV en Uruguay, como se mencionó anteriormente, fueron enfocados a evaluar la seroprevalencia de anticuerpos específicos anti-HEV. No existen reportes previos a 2009 de identificación de casos de hepatitis aguda asociados a HEV, a pesar de que han existido esfuerzos en este sentido. De hecho, durante 2001 fueron investigadas una serie de muestras de pacientes con hepatitis aguda, no HAV-no virus hepatitis B(HBV)-no virus hepatitis C (HVC) obtenidas en centros hospitalarios de nuestro país. Sin embargo en ninguna muestra se detectó HEV (Colina,R.; comunicación personal).

Esta introducción está escrita sobre la base de dos revisiones de la temática elaboradas y publicadas durante el transcurso de esta Tesis. Se adjuntan al final del capítulo

REVIEW. Mirazo, S., Ramos, N., Arbiza, J., 2012. Molecular Epidemiology of Hepatitis E virus in South America: current status. 2012. *Virus Review & Research*. September, 10; 50-59.

REVIEW. Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S., Arbiza, J., 2014. Transmission, Diagnosis and Management of Hepatitis E. an update. *Hepat Med*. 6; 45-59.

Referencias

1. Purcell, R.H. and Emerson, S.U. 2001. Animal Models of Hepatitis A and E. *ILAR Journal* 42(2): 1-22.
2. Khuroo, M.S. 1980. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A non-B type. *Am. J. Med.* 68 ; 818–823.
3. Hino, K., Kondo, T., Niwa, H., Uchida, T., Shikata, T., Rikahisa, T., Mizuno, K. 1991. A small epidemic of enterically transmitted non-A, non-B acute hepatitis. *Gastroenterol. Jpn.* 26;139–141.
4. Dawson, G.J., Mushahwar, I.K., Chau, K.H., Gitnick, G.L. 1992. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveller to Pakistan. *Lancet.* 340(8816); 426-427.
5. Donati, M.C., Fagan, E.A., Harrison, T.J. 1997. Sequence analysis of full length HEV clones derived directly from human liver in fulminant hepatitis E. In: Rizzetto, M., Purcell, R.H., Gerin, J.L., Verme, G. (Eds.), *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Edizioni Minerva Medica; pp. 313–316
6. Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U., Yoshikawa, A. 2001. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289; 929–936.
7. Smith, J.L. 2001. A review of hepatitis E virus. *J. Prot. Food.* 64(4); 572-586.
8. Meng, X.J. 2013. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin. Liver.* 33;41–49.
9. Meng, X..J. 2011. From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* 161;23–30.
10. Kumar, S., Subhadra, S., Singh, B., Panda, B. 2013. Hepatitis E virus: The current scenario. *Int. J. Infect. Dis.* 17; 228–233..
11. Holla, R.P., Ahmad, I., Ahmad, Z., Jamee, I S. 2013. Molecular virology of hepatitis E virus. *Sem. Liver. Dis.* 33(1); 3-14.
12. Pischke, S., Heim, A., Bremer, B., et al. 2011. Hepatitis E: an emerging infectious disease in Germany? *Z. Gastroenterol.* 49; 1255–1257.

13. Aggarwal, R. 2011. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res.* 161(1); 15-22.
14. Emerson, S.U., Anderson, D., Arankalle, A. et al.. *Virus Taxonomy: VIIIth report of the ICTV* 2004. Elsevier/Academic Press, London.
15. Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N. et al. 2009.. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106; 12986–12991.
16. Tam, A-W., Smith, M.M., Guerra, M.E. et al. 1991.. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185(1);120-131.
17. Ahmad, I., Holla, R.P., Jameel, S. 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* 161;47–58.
18. Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R., Bradley, D.W., 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(17); 8259-8263.
19. Agrawal, S., Gupta, D., Panda, S.K. 2001. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology* 282(1);87-101.
20. Pudupakam, R.S., Kenney, S.P., Córdoba, L., et al. 2011.. Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J. Virol.* 85(19); 10031-10040.
21. Huang, F.F., Sun, Z.F., Emerson, S.U., et al. 2004.. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J. Gen. Virol.* 85(6); 1609-1618.
22. Reyes, G.R. 1993. Hepatitis E virus (HEV): molecular biology and emerging epidemiology. *Prog. Liver Dis.* 11; 203-213.
23. Mushahwar, I.K., Dawson, G.J., Reyes, G.R. 1996. Hepatitis E virus: molecular biology and diagnosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8(4);312-318.
24. Okamoto, H. 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 127(2);216-28.
25. Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, S. et al. 2011. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J. Gen. Virol.* 92(12);2838-2848.
26. Korkaya, H., Jameel, S., Gupta, D. et al. 2001.. The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J. Biol. Chem.* 276; 42389–42400.
27. Purcell, R.H. 1994.. Hepatitis viruses: changing patterns of human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(7); 2401-2406.
28. Schlauder, G.G., Mushahwar, I.K. 2001.. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 65;282–292.

29. Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H. 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16(1);5–36.
30. Zanetti, A.R., Schlauder, G.G., Romanò, L. et al. 1999. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J. Med. Virol.* 57(4); 356-360.
31. Takahashi, M., Nishizawa, T., Sato, H. et al. 2011. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* 92(4); 902-908.
32. Oliveira-Filho, E., Konig, M., Thiel, H.J. 2013. Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet. Microbiol.* 165;148-154.
33. Echevarría, J.M., González, J.E., Lewis-Ximenez, L.L. et al. 2013. Hepatitis E virus infection in Latin America: A review. *J. Med. Virol.* 85; 1037-1045.
34. Mirazo, S., Mainardi, V., Ramos, N. et al. 2014.. Indigenous Hepatitis E Virus (HEV) Genotype 1 Infection, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* 20(1); 171-173.
35. Hakze-van der Honing, R.W., van Coillie, E., Antonis, A.F., van der Poel, W.H. 2011. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One* 6(8):e22673.
36. Smith, D.B., Simmonds, P., members of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group et al. 2014. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 95;2223-2232.
37. Huang, C.C., Nguyen, D., Fernandez, J. et al., 1992. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* .191; 550-558.
38. Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S., Arbiza, J., 2014. Transmission, Diagnosis and Management of Hepatitis E. an update. *Hepat Med.* 6; 45-59.
39. Wedemeyer, H., Pischke, S., Manns, M.P., 2012. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* 142(6); 1388-1397.
40. Teo, C.G. 2010. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin. Microbiol. Infect.* 16(1); 24-32.
41. Caron, M., Enouf, V., Than, S.C., Dellamonica, L., Buisson, Y., Nicand, E. 2006. Identification of Genotype 1 Hepatitis E Virus in Samples from Swine in Cambodia. *J. Clin. Microbiol.* 3440-3442.
42. Bader, T.F., Krawczynski, K., Polish, L.B., Favorov, M.O. 1991. Hepatitis E in a U.S. traveler to Mexico. *N. Engl. J. Med.* 325; 1659-1670.
43. Harrison, T.J., Hill, S.F., Macfarlane, L., Meigh, R.E. et al. 2005. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J. Infect. Dis.* 192(7); 1166-1172.
44. Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T. 2003. Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern. Med.* 42(11);1065-1071.

45. Amon, J.J., Drobeniuc, J., Bower, W.A. et al. 2006. Locally acquired hepatitis E virus infection, El Paso, Texas. *J. Med. Virol.* 78(6);741-746.
46. Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(18);9860–9865.
47. Meng, X.J. 2000. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J. Hepatol.* 33(5);842-845.
48. Lack, J.B., Volk, K., Van Den Bussche, R.A. 2012.. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 18;1268–1273.
49. Izopet, J., Dubois, M., Bertagnoli, S. et al. 2012. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 18;1274–1281.
50. Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B. et al. 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* 202(6); 825-834
51. Berto, A., Grierson, S., Hakze-van der Honing, R. et al. 2013.. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.* 19(2); 264-266.
52. Teo, C.G. Hepatitis E. 2009. In *CDC Health Information for International Travel*; Brunette, G.W., Kozarsky, P., Magill, A.J., Shliml, D.R., Whatley, A.D., Eds; Mosby: St. Louis, MO, USA; 335–337.
53. Mushahwar, I.K. 2008. HEV: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology and prevention. *J. Med. Virol.* 80;646–658.
54. Kumar, S., Ratho, R.K., Chawla, Y.K., Chakraborti, A. 2007. The incidence of sporadic viral hepatitis in North India: a preliminary study. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 6(6); 596-599.
55. Rein, D.B., Stevens, G.A., Theaker, J., Whittenborn, J.S., Wiersma, S.T. 2012. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology* 55; 988–997.
56. Zhu, F.C., Zhang, J., Zhang, X.F. et al. 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large scale, randomised, double-blind placebo-controlled phase-3 trial. *Lancet* 376; 895–902.
57. Taniguchi, M., Kim, S.R., Mishiro, S., et al. 2009. Epidemiology of hepatitis E in Northeastern China, South Korea and Japan. *J. Infect.* 58; 232–237.
58. Patra, S., Kumar, A., Trivedi, S.S., Puri, M., Sarin, S.K. 2007. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann. Intern. Med.* 147(1);28-33.
59. Kar, P., Jilani, N., Husain, S.A. et al. 2008. Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy?. *Am J Gastroenterol* 103(10); 2495-2501.
60. Navaneethan, U., Al Mohajer, M., Shata, M.T. 2008. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 28(9);1190-1199.
61. Pavio, N., Mansuy, J.M. 2010. Hepatitis E in high-income countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23(5);521-527.

62. Dalton, H.R., Stableforth, W., Thurairajah, P. et al. 2008. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20(8);784-790.
63. Schlosser, B., Stein, A., Neuhaus, R., et al. 2012. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J. Hepatol.*56; 500–502.
64. le Coutre, P., Meisel, H., Hofmann, J., et al. 2009. Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut* 58; 699–702.
65. Koenecke, C., Pischke, S., Heim, A., et al. 2012. Chronic hepatitis E in hematopoietic stem cell transplant patients in a low-endemic country? *Transpl. Infect. Dis.*14; 103–106.
66. Gerolami, R., Moal, V., Colson, P. 2008. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* 358; 859–860.
67. Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J.M., et al. 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 358; 811–817.
68. Pischke, S., Suneetha, P.V., Baechlein, C., et al. 2010. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver. Transpl.*16; 74–82.
69. Gonzalez, A.I., Moreira, V., Mateos, M.L., et al. 2011. Chronic hepatitis E in an immunocompetent patient. *Gastroenterol. Hepatol.* 34; 398–400.
70. Colson, P., Coze, C., Gallian, P., Henry, M., De, M.P., Tamalet, C. 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg. Infect. Dis.*13; 648–649.
71. Mansuy, J.M., Huynh, A., Abravanel, F., Recher, C., Peron, J.M., Izopet, J. 2009. Molecular evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis E virus in a hematology ward. *Clin. Infect. Dis.* 48;373–374.
72. Khuroo, M.S., Kamili, S., Khuroo, M.S. 2009. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J. Viral. Hepat.* 16 (7); 519-523.
73. Vishwanathan, R. 1957. Infectious hepatitis in Delhi (1955-1956): A critical study: epidemiology. *Indian. J. Med. Res.* 45; 1-29.
74. Zhang, H., Cao, X.Y., Liu, C.B., et al. 1991. Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol. Jpn.* 26; 135–138.
75. Bi, S.L., Purdy, M.A., McCaustland, K.A., Margolis, H.S., Bradley, D.W. 1993. The sequence of hepatitis E virus isolated directly from a single source during an outbreak in China. *Virus Res.* 28; 233–247.
76. Guthmann, J.P., Klovstad, H., Boccia, D., et al. 2006. A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin. Infect. Dis.* 42; 1685–1691.

77. Maila, H., Bowyer, M., Swanepoel, R. 2004. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J. Gen. Virol.* 85; 89–95.
78. Ippagunta, S.K., Naik, S., Sharma, B., Aggarwal, R. 2007. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: Frequency and seasonal pattern. *Med. Virol.* 79; 1827–1831.
79. Vaidya, S., Tilekar, B., Walimbe, A., Arankalle, V. 2003. Increased risk of hepatitis E in sewage workers from India. *J. Occup. Environ. Med.* 45; 1167–1170.
80. Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M. et al. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9; 448–454.
81. Ishida, S., Yoshizumi, S., Ikeda, T. et al. 2012. Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Arch. Virol.* 157(12); 2363–2368.
82. Masclaux, F.G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., Oppliger, A. 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res.* 47(14); 5101-5109.
83. Yugo, D.M., Meng, X.J. 2013. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J. Environ. Res. Public Health* 10(10); 4507-4533.
84. Pavio, N., Meng, X.J., Renou, C. 2010. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res.* 41(6); 46-60.
85. Erker, J.C., Desai, S.M., Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Mushahwar, I.K. 1999. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J. Gen. Virol.* 86; 681-690.
86. Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362; 371-373.
87. Lhomme, S., Dubois, M., Abravanel, F., et al. 2013. Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. *J. Clin. Virol.* 58(2); 357-362.
88. Christensen, P.B., Engle, R.E., Hjort, C., et al. 2008. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: A potential zoonosis in Denmark. *Clin. Infect. Dis.* 47; 1026–1031.
89. Meng, X.J., Wiseman B, Elvinger F, et al.. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.* 40; 117–122.
90. Renou, C., Cadranet, J.F., Bourlière, M., et al. 2007. Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerg. Infect. Dis.* 13(7); 1094-1096.
91. Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., et al. 2009. the Hepatitis E Incident Investigation Team. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* 15; 1738–1744.
92. Diez-Valcarce, M., Kokkinos, P., Söderberg, K., et al. 2012. Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environ. Virol.* 4; 73–80.

93. Crossan, C., Baker, P., Craft, J. et al. 2012. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 18; 2085–2087.
94. Li, T.C., Ami, Y., Suzaki, Y., Yasuda, S.P., et al., 2013. Characterization of full genome of **rat** hepatitis E virus strain from Vietnam.. *Emerg. Infect. Dis.* 19(1);115-118.
95. Mulyanto, Suparyatmo, J.B., Andayani, I.G. et al., 2014. Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis. *Virus Res.* 22; 102-112.
96. Jirintai, S., Tanggis, Mulyanto et al., 2014. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.*24; 92-102.
97. Li, T.C., Ami, Y., Suzaki, Y., Takeda, N., Takaji, W. 2013. No evidence for hepatitis E virus genotype 3 susceptibility in rats.*Emerg. Infect. Dis.* 19(8):1343-1345.
98. Zhu, Y., Yu, X., Zhang, Y. et al., 2013. Infectivity of a genotype 4 hepatitis E virus cDNA clone by intrahepatic inoculation of laboratory rats. *Vet. Microbiol.* 166(3-4):405-411.
99. Menendez, C, Sanchez-Tapias, J.M., Kahigwa, E., et al. 1999.. Prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis viruses B, C, and Ein Southern Tanzania. *J. Med. Virol.* 58; 215–220.
100. Kumar, R.M., Uduman, S., Rana, S., Kochiyil, J.K., Usmani, A., Thomas, L. 2001. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol.* 100; 9–15.
101. Rayis, D.A., Jumaa, A.M., Gasim, G.I., Karsany, M.S., Adam, I. 2013. An outbreak of hepatitis E and high maternal mortality at Port Sudan, Eastern Sudan. *Pathog. Glob. Health.* 107; 66–68.
102. Cardenas, I., Means, R.E., Aldo, P., et al. 2010. Viral infection of the placenta leads to fetal inflammation and sensitization to bacterial products predisposing to preterm labor. *J. Immunol.* 185; 1248–1257.
103. Cardenas, I., Mor, G., Aldo, P., et al. 2011. Placental viral infection sensitizes to endotoxin-induced preterm labor: a double hit hypothesis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65; 110–117.
104. Krain, L.J, Atwell, J.E., Nelson, K.E., Labrique, A.B. 2014. Fetal and neonatal health consequences of vertically transmitted hepatitis e virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90(2); 365-370.
105. Aggarwal, R., Naik, S.R. 1992. Hepatitis E: does person-to-person spread occur? *Indian J. Gastroenterol.* 11; 109–112.
106. Rodrigues, A., Brun, H., Sandstrom, A. 1997. Risk factors for cholera infections in the initial phase of an epidemic in Guinea-Bissau: protection by lime juice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57; 601–604.
107. Somani, S.K., Aggarwal, R., Naik, S.R, et al. 2003. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* 10; 446–449.
108. Krawczynski, K., Aggarwal, R., Kamili, S. 2000. Hepatitis E. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 14; 669–687.

109. Velazquez, O., Stetler, H., Avila C, et al. 1990. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986–1987. *JAMA* 263; 3281–3285.
110. Emerson, S.U., Purcell, R.H. 2003. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.*13; 145-154.
111. Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F. et al. 2012. Hepatitis E. *Lancet* 379(9835); 2477–2488.
112. Khuroo, M.S., Kamili, S., Yattoo, G.N. 2004. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol. Hepatol.* 19; 778–784.
113. Takeda, H., Matsubayashi, K., Sakata, H., et al. 2010. A nationwide survey for prevalence of hepatitis E virus antibody in qualified blood donors in Japan. *Vox Sang* 99(4); 307-313.
114. Gotanda, Y., Iwata, A., Ohnuma, H., et al. 2007. Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J. Med. Virol.* 79(6); 734-742.
115. Colson, P., Coze, C., Gallian, P., Henry, M., De Micco, P., Tamalet, C. 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg. Infect. Dis.* 13; 648–649.
116. Boxall, E., Herborn, A., Kochethu, G., et al. 2006. Transfusion-transmitted hepatitis E in a ‘nonhyperendemic’ country. *Transfus. Med.* 16; 79–83.
117. Vollmer, T., Diekmann, J., Johne, R. et al. 2012. Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *J. Clin. Microbiol.* 50(8); 2708-13.
118. Bendall, R., Ellis, V., Ijaz, S., Ali, R., Dalton, H. 2010. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J. Med. Virol.* 82; 799-805.
119. Rossi-Tamisier, M., Moal, V., Gerolami, R., Colson, P. 2013. Discrepancy between anti-hepatitis E virus immunoglobulin G prevalence assessed by two assays in kidney and liver transplant recipients. *J Clin Virol.* 56; 62-64.
120. Wu, W.C., Su, C.W., Yang, J.Y., Lin, S.F., Chen, J.Y., Wu, J.C. 2014. Application of serologic assays for diagnosing acute hepatitis E in national surveillance of a nonendemic area. *J. Med. Virol.* 86(4); 720-728.
121. Favorov, M.O., Fields, H.A., Purdy, M.A. et al. 1992. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 36(4); 246-250.
122. Dawson, G.J., Mushahwar, I.K., Chau, K.H., Gitnick, G.L. 1992. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveller to Pakistan. *Lancet.* 340(8816); 426-427.
123. Slot, E., Hogema, B.M., Riezebos-Brilman, A., Kok, T.M., Molier, M., Zaaijer, H.L. 2013. Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Euro. Surveill.* 18; 20550.
124. Legrand-Abravanel, F., Thevenet, I., Mansuy, J.M. et al. 2009. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype3 hepatitis E virus infections. *Clin. Vaccine. Immunol.*16; 772–774.

125. Drobeniuc, J., Meng, J., Reuter, G. et al. 2010. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis.* 51; 24–27.
126. Herremans, M., Bakker, J., Duizer, E., Vennema, H., Koopmans, M.P. 2007. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:562–568.
127. Zhou, Y.H., Purcell, R.H., Emerson, S.U. 2004. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine* 22(20); 2578-2585.
128. Takahashi, M., Kusakai, S., Mizuo, H. et al. 2005. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J. Clin. Microbiol.* 43(1); 49–56.
129. Zhang, S., Tian, D., Zhang, Z. et al. 2009. Clinical significance of anti-HEV IgA in diagnosis of acute genotype 4 hepatitis E virus infection negative for anti-HEV IgM. *Dig. Dis. Sci.* 54(11); 2512–2518.
130. Li, S., Tang, X., Seetharaman, J. et al. 2009. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus–host interaction. *PLoS Pathog.* 5:e1000537.
131. Herremans, M., Bakker, J., Duizer, E., et al. 2007. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin. Vaccine Immunol.* 14 ;562–568.
132. Drobeniuc, J., Meng, J., Reuter, G. et al. 2010. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis.* 51;24–27.
133. Fogeda, M., de Ory, F., Avellón, A., Echevarría, J.M. 2009. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J. Clin. Virol.* 45(3):259-261.
134. Lan, X., Yang, B., Li, B.Y., Yin, X.P., Li, X.R., Liu, J.X. 2009. Reverse transcription-loop mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.* 47; 2304–2306.
135. Huang, S., Zhang, X., Jiang, H. et al. 2010. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS ONE* 5:e13560.
136. Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R. 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods.* 131; 65–71.
137. Gyarmati, P., Mohammed, N., Norder, H., Blomberg, J., Belák, S., Widén, F. 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J. Virol. Methods* 146; 226–235.

138. Baylis, S.A., Hanschmann, K.M., Blumel, J., et al. 2011. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J. Clin. Microbiol.* 49; 1234–1239.
139. Puyol, F.H., Favorov, M.O., Marcano, T., et al. 1994. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *J. Med. Virol.* 42(3); 234-236.
140. Ibarra, H., Riedemann, S., Reinhardt, G., et al. 1997. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile. *Rev Med Chil.* 125(3):275-278.
141. Ibarra, H., Riedemann, S., Toledo, C.. 2006. Hepatitis A and E virus antibodies in Chilean children of low socioeconomic status: a one year follow-up study. *Rev. Med. Chil.* 134(2); 139-144.
142. Cruells, M.R., Mescia, G., Gaibisso, R., Ramírez, M., Gutiérrez, M., Kohen, S. 1997. Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay. *Gastroenterol. Hepatol.* 20(6); 295–298.
143. Rey, J.A., Findor, J.A., Daruich, J.R., Canero Velazco, C., Bruch Igartúa, E., Schemee, E. 1997. Prevalence of IgG anti-HEV in Buenos Aires, a non-endemic area for hepatitis. *J. Travel. Med.* 4; 100–101.
144. Martínez Wassaf, M.G., Pisano, M.B., Barril, P.A., et al., 2014. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *J. Clin. Virol.* 27. pii: S1386-6532(14)00316-3. doi: 10.1016.
145. Bartoloni, A., Bartalesi, F., Roselli, M., Mantella, A., Arce, C.C., Paradisi, F., Hall, A.J. 1999. Prevalence of antibodies against hepatitis A and E viruses among rural populations of the Chaco region, south-eastern Bolivia. *Trop. Med. Int. Health.* 4(9):596-601.
146. Vildosola, H., Colichón, A., Barreda, M., Piscocoya, J., Palacios, O. 2000. Hepatitis E IgG antibodies seroprevalence in a peruvian risk group. *Rev. Gastroenterol. Peru.* 20(2); 111-116.
147. Trinta, K.S., Liberto, M.I., de Paula, V.S., Yoshida, C.F., Gaspar, A.M. 2001. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96(1); 25–29.
148. Bortolierio, A.L., Bonametti, A.M., Morimoto, H.K., Matsuo, T., Reiche, E.M. 2006. Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Paraná, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 48(2); 87-92.
149. Da Silva, S., de Oliveira, J., Vitral, C., Vieira, K., Pinto, M., Souto, F. 2012. Prevalence of hepatitis e virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 107(3); 338-341.
150. Bendall, R., Ellis, V., Ijaz, S., Ali, R., Dalton, H. 2010. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J. Med. Virol.* 82(5);799-805.

151. Reinhardt, G., Ibarra, H., Riedemann, S., Vega, I. 2003. Swine hepatitis E preliminary serological study in Chile. *Arch. Med. Vet.* 35(2); 233-236.
152. Guimarães, F., Saddi, T., Vitral, C., Pinto, M., Gaspar, A., Souto, F. 2005. Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso state, Central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 36; 223-226.
153. Munné, M.S., Vladimírsky, S., Otegui, L. et al. 2006. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J. Med. Virol.* 78(12); 1579-1583.
154. Schlauder, G.G., Frider, B., Sookoian, S., Castano, G.C., Mushahwar, I.K. 2000. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J. Infect. Dis.* 182(1); 294–297.
155. Munné, M.S., Altabert, N.R., Vladimírsky, S.N. et al. 2011. Identifications of polyphyletic variants in acute hepatitis suggest an underdiagnosed circulation of hepatitis E virus in Argentina. *J. Clin. Virol.* 52(2); 138-141.
156. Paiva, H., Tzaneva, V., Haddad, R., Yokosawa, J. 2007. Molecular characterization of swine hepatitis E virus from southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 38; 693-698.
157. Lopes dos Santos, D.R., Vitral, C.L., de Paula, V.S. et al. 2009. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet. J.* 182(3); 474-480.
158. Lopes Dos Santos, D.R., Lewis-Ximenez, L.L., da Silva, M.F. et al. 2010. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J. Clin. Virol.* 47(3); 276–279.
159. Dell'Amico, M.C., Cavallo, A., Gonzales, J.L. et al. 2011. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and Swine, Bolivia. *Emerg. Infect. Dis.* 17(8); 1488-1490.
160. Purdy, M.A., Dell'Amico, M.C., Gonzales, J.L. et al. 2012. Human and porcine hepatitis E viruses, southeastern Bolivia. *Emerg. Infect. Dis.* 18(2); 339-340.
161. García, C.G., Sánchez, D., Villalba, M.C. 2012. Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *J. Med. Virol.* 84(7); 1025-1029.
162. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Gagliano, G., Arblza, J., 2011. Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human Hepatitis E infection in Uruguay. *Arch. Virol.* 156; 1451-1454.

CAPÍTULO 2

I. IMPORTANCIA DE LA PROBLEMÁTICA A ABORDAR. FUNDAMENTACIÓN.

Las enfermedades infecciosas, y particularmente las de etiología viral continúan siendo un gran problema de salud pública a nivel mundial. Entre ellas, las emergentes presentan una importancia preponderante dado que la información disponible en términos de epidemiología, modos de trasmisión y prevención es en general limitada y dificulta la implementación de políticas sanitarias adecuadas.

La infección por el HEV es considerada una zoonosis de gran impacto en salud pública emergente en países desarrollados y en vías de desarrollo no endémicos. La situación epidemiológica de este virus en el país era, hasta el momento del inicio del desarrollo de esta Tesis, prácticamente desconocida, existiendo únicamente un reporte referido a la prevalencia de anticuerpos anti HEV en población donante¹. Más recientemente, a fines de 2009, fueron detectados los primeros casos esporádicos autóctonos de infección por HEV y desde entonces nuevos casos han sido identificados.

La escasa información disponible referente a aspectos virológicos, epidemiológicos y moleculares de HEV en nuestro país y la región, y el creciente número de casos clínicos reportados, hace necesario profundizar en el estudio de esta virosis emergente desde una perspectiva multidisciplinaria. Fundamentalmente, se debe priorizar la caracterización genética de las cepas virales detectadas, y comenzar a indagar acerca de la variabilidad genética y la biología del HEV, con especial énfasis en aspectos inherentes a la replicación y ciclo viral.

Paralelamente, resulta necesaria la detección e identificación de HEV en cerdos pertenecientes a criaderos comerciales y jabalíes. Este enfoque permite evaluar el potencial zoonótico de esta enfermedad y valorar el riesgo sanitario que implica el contacto con cerdos y/o el consumo de carne porcina y productos derivados.

Así, esta investigación es pionera en el estudio del HEV en Uruguay, implementándose desde múltiples enfoques metodológicos y abordando diversos aspectos virológicos, moleculares y epidemiológicos. Los resultados

derivados de esta Tesis aportarán información valiosa destinada al diseño de políticas sanitarias adecuadas para el manejo y control de esta infección.

II. OBJETIVO GENERAL

Esta tesis tiene como objetivo general investigar diversos aspectos vinculados con la emergencia de la infección por HEV en Uruguay, analizando en profundidad la variabilidad genética de las cepas circulantes y la distribución de genotipos y sub-genotipos. Asimismo pretende comenzar a indagar aspectos del ciclo replicativo viral, básicamente a través del estudio de expresión y localización de proteínas en dos sistemas eucariotas. A su vez, es de interés investigar la presencia del HEV circulante en reservorios animales (cerdos, jabalíes y ratas), de forma de evaluar el impacto zoonótico que esta infección puede presentar en la población.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumplir con el objetivo general nos proponemos alcanzar los siguientes objetivos específicos.

i. Relevamiento y estudio de HEV. identificación de cepas virales. Confirmar la presencia de ARN viral en muestras de suero y materia fecal de pacientes con sintomatología compatible con hepatitis aguda y serología positiva y/o indeterminada para HEV. Identificar a partir de la secuencia amplificada el genotipo viral.

ii. Aislamiento de HEV en cultivos celulares. Aislar *in vitro* en cultivos celulares de línea y primarios las cepas virales detectadas a partir de las muestras de suero y/o materia fecal, y generar un banco de trabajo para la implementación de los estudios de caracterización molecular.

iii. Análisis de la variabilidad genética de HEV. Caracterizar molecularmente las cepas circulantes mediante el análisis de múltiples regiones del genoma, y determinar la similitud de secuencia a nivel nucleotídico y aminoacídico.

Implementar un detallado análisis filogenético y comparativo de los aislados detectados con cepas regionales y extrarregionales.

iv. Análisis de coalescencia bayesiana y dinámica evolutiva de HEV. Estudiar la dinámica poblacional del Genotipo 3 de HEV e investigar el probable origen genético y temporal de las cepas detectadas en Uruguay.

v. Estudios de expresión y localización de proteínas. Implementar metodologías para la expresión y purificación de ORF2 y 3 de HEV en sistemas la expresión procariotas. Asimismo, investigar preliminarmente en dos sistemas *in vitro* de cultivos celulares de línea y hepatocitos primarios , la localización celular de ORF3.

vi. Evaluar un sistema de expresión de antígenos de HEV. Implementar y optimizar un sistema de expresión del ORF2 viral *in vitro* mediante la estrategia de *Virus-Like Particles* (VLP) tomando como base las características biológicas de la proteína Z del Virus Junin como herramienta para el desarrollo de estrategias inmunoprotectoras

vii. Identificación de reservorios animales de HEV. Analizar por PCR convencional y PCR en tiempo real la presencia de cepas de HEV circulantes en cerdos domésticos, jabalíes y roedores domésticos. Determinar los genotipos predominantes. Eventualmente comparar a nivel de secuencia nucleotídica y aminoacídica las cepas detectadas con las aisladas en humanos.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hepatitis E es considerada una zoonosis emergente en países industrializados y regiones en desarrollo no endémicas para HEV, lo cual ha sido constatado mediante el sustancial aumento de casos esporádicos y autóctonos en estas zonas, incluyendo Sudamérica. Por tanto la infección por HEV es actualmente una fuente de preocupación para la salud pública, con principal énfasis en la población más vulnerable (embarazadas e inmunosuprimidos). Considerables

esfuerzos se están llevando a cabo en la investigación de este patógeno, con el objetivo de desarrollar estrategias inmunopreventivas y optimizar los métodos de diagnóstico.

Las vías de transmisión más frecuentes del HEV incluyen la fecal-oral a través del consumo de fuentes de agua contaminada y la zoonótica, existiendo varias especies animales reservorios de la infección.

Proponemos como hipótesis general de trabajo que en Uruguay, al igual que en la región, circula el HEV del Genotipo 3 en humanos y es a su vez agente responsable de episodios de hepatitis aguda en la población. Asimismo, las variantes que son detectadas en los pacientes han de mantener, desde el punto de vista filogenético, una relación muy estrecha con cepas de origen regional, en virtud de las fluídas relaciones humanas (viajes, turismo, etc), y vínculos comerciales que incluyen transacciones de ganado porcino. Paralelamente, el virus ha de circular en las piaras de cerdos de nuestro país así como en las poblaciones de jabalíes distribuidos principalmente en la zona Este del país.

Es posible además desarrollar un sistema para aislar en cultivos celulares *in vitro* (A549 y Hep-G2) las cepas de HEV humanas y porcinas detectadas, que permitirán implementar metodologías con el objetivo de profundizar el estudio de HEV en Uruguay. Entre estos estudios, se incluyen la expresión de proteínas virales en sistemas porcariotas y estudios de localización y el desarrollo de un sistema de presentación de antígenos del Genotipo 3 en células eucariotas.

Referencias

1. Cruells, M.R., Mescia, G., Gaibisso, R., Ramírez, M., Gutiérrez, M., Kohen, S., 1997. Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay. *Gastroenterol Hepatol.* 20(6);295–298.

CAPÍTULO 3

I. RELEVAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HEV EN URUGUAY.

i. Estudio de casos de hepatitis aguda asociada a HEV

En esta sección se presentan los hallazgos derivados en dos publicaciones científicas, referentes al estudio, análisis e identificación de HEV en casos de hepatitis aguda de pacientes atendidos en instituciones médicas del sector privado y en el Hospital Central de las Fuerzas Armadas (HCFAA), en Montevideo, Uruguay.

A este **Capítulo 3** se adjuntan ambas publicaciones.

El primer artículo de reporte de investigación original refiere a la detección y caracterización molecular preliminar de los primeros nueve casos esporádicos autóctonos de infección por HEV en Uruguay, ocurridos entre fines de 2009 y 2010.

Todas las cepas virales detectadas en este trabajo pertenecieron al Genotipo 3 y formaban, con excepción de una cepa, un único cluster con un alto soporte estadístico. Por otro lado, el análisis filogenético mostró además que estaban emparentadas con aislados de HEV reportados en Alemania, detectados en cerdos domésticos.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Gagliano, G., Arblza, J., 2011. Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human Hepatitis E infection in Uruguay. Arch. Virol. 156; 1451-1454.

Más recientemente durante 2013 y 2014, hemos analizado 12 casos de hepatitis aguda provenientes del HCFFAA, investigando la presencia de HEV por métodos moleculares y serológicos. Así, lo cual fue publicado en el segundo artículo que aquí se resume, fue detectado un nuevo caso autóctono esporádico de infección por HEV. Luego de realizado el análisis filogenético, este caso fue asociado a una cepa del Genotipo 1. Esta cepa, la primera autóctona de este Genotipo reportada en el cono sur de América presentó una alta identidad nucleotídica con aislados reportados en Cuba y Venezuela, probablemente compartiendo un ancestro común con la cepa India YAM 67. Estos importantes hallazgos muestran que la epidemiología del HEV en Sudamérica es muy compleja, y sugieren además una amplia circulación del virus en la población.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL: Mirazo, S., Mainardi, V., Ramos, N., Gerona, S., Rocca, V., Arbiza, J., 2014. Indigenous Hepatitis E Genotype 1 Infection in Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* 20(1):171-173 .

ii. Serología y detección molecular de cepas de HEV en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)

Como se ha visto, la infección por HEV puede generar cronicidad en pacientes inmunosuprimidos, entre los que se incluyen transplantados e infectados con HIV¹. En este sentido resulta de importancia investigar la presencia de HEV, así como de otros virus que desarrollen cronicidad, en estos grupos de pacientes como manera de evaluar el riesgo de futuras complicaciones, en este caso hepáticas.

Aquí nos propusimos analizar un grupo pequeño de pacientes infectados con HIV con dos objetivos claros: 1) estudiar la frecuencia de anticuerpos IgG e IgM específicos anti HEV, como forma de indagar un poco más en la epidemiología de HEV en nuestro país, y 2) investigar la presencia de HEV en este grupo de pacientes a través de la detección molecular del genoma viral. Estas dos herramientas nos permitirán aclarar un poco más la situación de este virus emergente en el país, y generar evidencia experimental que oriente en el manejo clínico de los pacientes infectados con HIV en relación a la infección por HEV.

Materiales y Métodos

Muestras

Para esta instancia de la Tesis fueron incluidos 35 sueros de pacientes infectados con HIV, atendidos en el Servicio de Enfermedades Infecto-Contagiosas, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (SEIC) (Tabla 3.1.). Para estudiar la frecuencia de anticuerpos anti-HEV en esta población fueron seleccionados los casos cuyos valores de conteo de linfocitos TCD4+ fuesen $\geq 300/\text{mm}^3$. A su vez, se indagó la situación de los pacientes respecto a la infección con HBV y HVC. Esta información así como los datos de recuento linfocitario fueron proporcionados por el Laboratorio Central del SEIC.

Serología y detección molecular de HEV

La identificación de anticuerpos anti-HEV IgG y IgM en los pacientes seleccionados fue realizada con el kit comercial recomLine® HEV IgG/IgM (Mikrogen, Alemania). Como grupo control fueron incluidos 18 sueros de

pacientes inmunocompetentes atendidos en le HCFFAA y centros médicos privados.

En todos los sueros fue testeada la presencia de ARN viral, mediante la amplificación por retrotranscripción seguida por PCR anidada (RT-nPCR) de un fragmento de 287 pares de bases (pb) ubicado en el extremo 3' del genoma, como se describe en Mirazo et al.². Los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta (UV). La identidad del producto de PCR fue confirmada por secuenciación, llevada a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de Macrogen (Macrogen Inc. Corea).

El análisis filogenético se implentó utilizando el software MEGA 5.1, por el método de Neighbor-Joining empleando el modelo de dos parámetros de Kimura como modelo de sustitución nucleotídica. Los valores de *bootstrap* fueron determinados con 1000 re-muestrados de los datos y se generó un árbol consenso. Valores de *bootstrap* mayores a 60% fueron considerados significativos.

Resultados y Discusión

De los 35 sueros positivos para HIV, 18 presentaron valores de linfocitos T CD4+ $\geq 300/\text{mm}^3$ y fueron en los que se investigó la presencia de anticuerpos anti-HEV (Tabla 3.1.). Entre estos 18 sueros finalmente incluidos, 12 presentaron marcadores para HCV (prueba de detección de ARN viral), 2 estaban infectados con HBV, presencia de anticuerpos anti-Core viral, lo que indica infección activa³, y 4 presentaban ambos virus.

Respecto a HEV, se observó, sin embargo que un 17% (3/18) de los sueros de pacientes portadores de HIV se identificaron anticuerpos del tipo IgG específicos, uno de los cuales (5.5%) también presentó IgM. No se identificaron muestras de suero con anticuerpos únicamente de tipo IgM en ninguno de los dos grupos estudiados. En el grupo control, por su parte, tampoco se detectaron anticuerpos del tipo IgG.

La mayor frecuencia de anticuerpos específicos de cualquier tipo en población HIV positiva ya ha sido reportada previamente por otros autores^{4,5}. Sin embargo,

al analizar esos y otros estudios disponibles, resulta sorprendente en este trabajo la diferencia en los valores de la frecuencia observada en los pacientes infectados con HIV con el grupo control (17% vs 0%) para IgG⁵.

De los cuatro pacientes con sueros con anticuerpos del tipo IgG (un paciente a su vez con IgM), tres de ellos también estaban infectados con HVC y el restante con HVB. De hecho, se ha demostrado una mayor incidencia y gravedad clínica de la infección por HEV en pacientes con enfermedades o patologías hepáticas subyacentes¹.

El bajo porcentaje de sueros seropositivos en el grupo de pacientes HIV negativo no es sorprendente considerando el único antecedente de estudio de seroprevalencia realizado en Uruguay, en el que se reportó una tasa cercana al 1% en población sana donante de sangre⁶.

Es actualmente reconocido que la sensibilidad y especificidad de los kits de detección de anticuerpos anti-HEV disponibles comercialmente no es óptima. Muchos estudios han reportado performances y resultados altamente variables, que impiden la obtención de conclusiones fiables, particularmente en zonas no endémicas para HEV¹. Asimismo, la ocurrencia de resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con otros virus hepatotrópicos, fundamentalmente Epstein-Barr y Citomegalovirus ha sido reportada¹. El hecho de que los pacientes HIV positivos incluidos en este estudio no hayan sido testeados para estos virus hepatotrópicos puede sin duda sesgar los resultados observados y limitar el alcance de las conclusiones.

Tabla 3.1. Frecuencia de anticuerpos IgG/M anti HEV y ARN en grupos de pacientes portadores y no portadores de HIV.

Grupo	N	Edad(media)	% HEV IgG (n)	% HEV IgM (n)	% HEV IgG/M (n)	% HVC (n)	% HVB (n)	% HEV ARN (n)
HIV+*	18	50	17 (3)	0 (0)	5.5 (1)	89 (16)	33 (6)	22(4)
Control	18	44	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	36	-	8.5 (3)	0 (0)	2.25 (1)	44.5 (16)	16.5 (6)	11 (4)

* Sólo los pacientes con conteo linfocitario TCD4+≥300/mm³ fueron incluidos.

En todos los sueros incluidos en este estudio (18 HIV positivos y 18 HIV negativos) se investigó la presencia de ARN viral, mediante RT-nPCR. Se amplificó ARN viral en tres muestras de pacientes infectados con HIV; uno que presentó anticuerpos IgG y M específicos contra HEV (cepa HeUyS1), otros dos en los que se detectó anticuerpos del tipo IgG (cepas HeUyS3 y HeUyS4) y un paciente en el que no se detectó respuesta inmune específica de ningún tipo (HeUyS5) (Tabla 3.1.). No se detectó ARN viral en ninguno de los pacientes del grupo control.

Como se explicó previamente la variable performance en especificidad y sensibilidad de los kits serológicos disponibles puede explicar por qué se detectó ARN viral en pacientes que no presentaron una respuesta de tipo IgM específica, así como en el que tampoco se detectó IgG anti-HEV.

Por su parte, el análisis filogenético de las muestras detectadas mostró que las cuatro cepas pertenecieron al Genotipo 3, agrupando en un mismo cluster, con las cepas Uruguayas detectadas previamente² (Fig. 3.1). Lamentablemente, no fue posible amplificar otras regiones del genoma de HEV, a fin de realizar un análisis filogenético más exhaustivo.

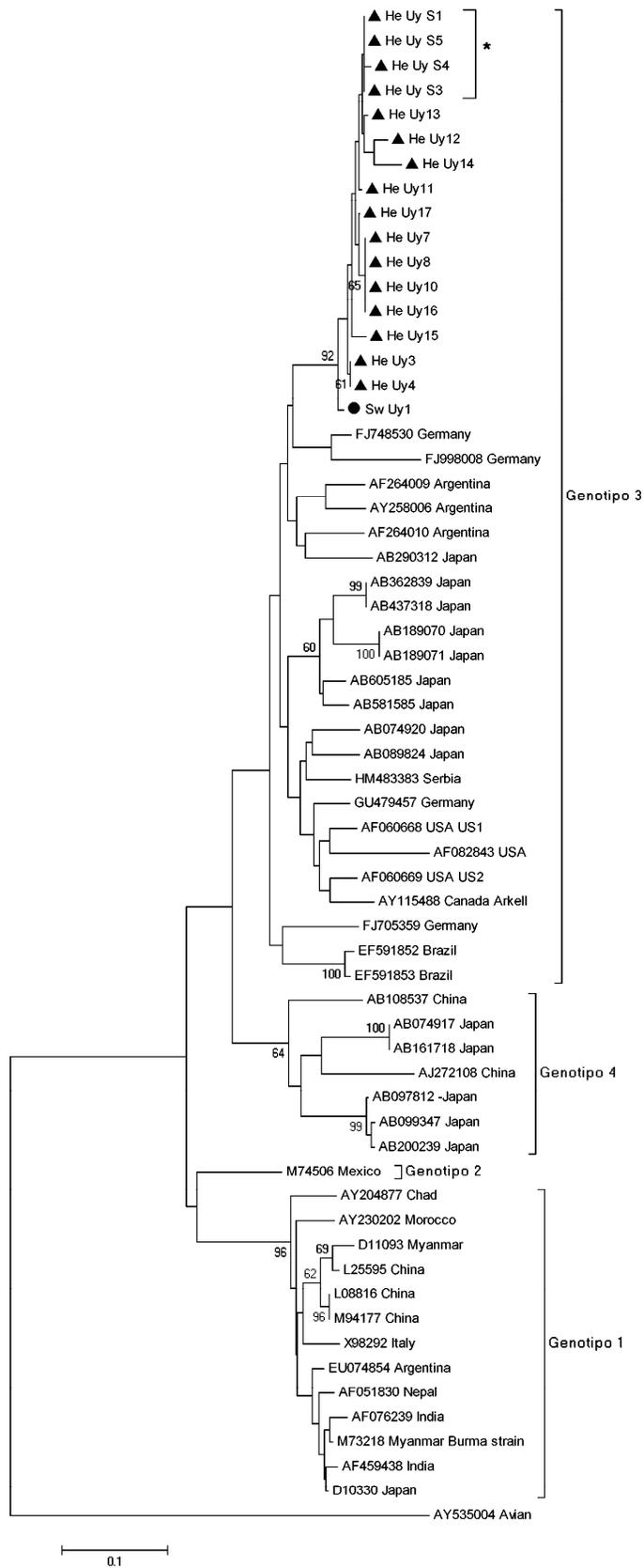


Figura 3.1. Reconstrucción filogenética de HEV en base a un fragmento de 287 pb del ORF1, por el método de Neighbor-Joining. Las cepas Uruguayas se resaltan (**triángulo relleno oscuro**). Las aislados de pacientes infectados con HIV se identifican con un asterisco (*). Se muestran únicamente valores de bootstrap $\geq 60\%$.

La alta frecuencia de pacientes seropositivos para HEV, así como alta tasa de detección de infecciones agudas por HEV, destacan la necesidad de instrumentar políticas destinadas a mejorar el seguimiento de personas incluidos en este grupo, considerando que son una población eventualmente vulnerable al desarrollo de infecciones crónicas de HEV. Más aún, cabe destacar que en este estudio no fueron incluidos los pacientes inmunosuprimidos (conteo linfocitario T CD4+ \leq 300/mm³), en los cuales este riesgo es mucho mayor.

Claro está que una de las mayores limitaciones de este estudio es el tamaño de la muestra; es decir el número de sueros evaluados. De todas maneras, este representa un estudio pionero en sus características en Uruguay y la región, ofreciendo resultados muy interesantes y sorprendentes.

Referencias

1. Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S. and Arbiza., 2014. Transmission, Diagnosis and management of hepatitis E: an update. *Hepat. Med.* 6; 45-59.
2. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Arbiza, J., 2013. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res.* 173; 364-70.
3. Gergely, A., Bechet, S., Gouchon, C., Benadbelmoumen, G. and Consigny, P.H., 2014. Hepatitis B screening in travelers: a retrospective analysis. *Travel. Med. Infect. Dis.* 14; doi: 10.1016/j.tmaid.2014.07.003.
4. Kaba, M., Richet, H., Ravaux, I., et al., 2011. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J. Med.Virol.* 83: 1704-1716.
5. Maylin, S., Stephan, R., Molina, J.M. et al., 2012. Prevalence of antibodies and RNA genome of hepatitis E virus in a cohort of French immunocompromised. *J. Clin.Virol.* 53; 346-349.
6. Cruells, M.R., Mescia, G., Gaibisso, R. et al., 1997. Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay. *Gastroenterol. Hepatol.* 20;295-298.

II. AISLAMIENTO DE HEV EN CULTIVOS CELULARES Y HEPATOCITOS PRIMARIOS DE RATA

Actualmente no existe un sistema de cultivo celular práctico y sencillo que permita la propagación de HEV *in vitro*. Esto ha impedido el estudio y la comprensión de muy diversos aspectos del ciclo replicativo del HEV. Numerosos modelos *in vitro* se han intentado en hepatocitos primarios de primates no humanos^{1,2} y en varias líneas celulares continuas, tales como líneas de hepatoma humano (PLC/ PRF/5, Hep-G2 y Huh -7), células de carcinoma de colon humano (Caco-2) y células de cáncer de pulmón humano (A549)^{3,4}. Los resultados obtenidos en estos ensayos fueron dispares, y ninguno de estos sistemas ha resultado fácil de implementar así como tampoco ha demostrado proporcionar altos títulos virales en el sobrenadante del cultivo.

En nuestro laboratorio hemos intentado llevar adelante varios de los protocolos publicados en la bibliografía^{3,4}, no pudiendo aislar cepas de HEV en ningún caso.

En este Capítulo describiré los procedimientos empleados con el objetivo de implementar y optimizar un sistema de aislamiento de HEV en cultivos celulares a partir de muestras de suero de pacientes con hepatitis E que resulte sencillo de realizar y reproducible. Para llevar adelante este propósito se emplearon dos líneas celulares continuas descritas como potenciales sistemas para propagar el HEV: A549 y Hep-G2.

Paralelamente, lo cual será presentado al final del capítulo, se desarrolló un sistema de cultivo de hepatocitos primarios de rata neonata. Como se ha dicho anteriormente en el **Capítulo 1**, es materia de discusión la capacidad de cepas de HEV detectadas en ratas de infectar cerdos y humanos, y viceversa. No es claro en absoluto si un salto de especie de este tipo puede ocurrir en la naturaleza, o al menos en condiciones de laboratorio. Así y para colaborar en la comprensión de este asunto, se desarrolló un procedimiento para aislar cepas de HEV humanas en un sistema de estas características.

i. Aislamiento de A549 y HepG2

Materiales y Métodos.

Células y aislamiento de HEV

Las cepas virales seleccionadas fueron aisladas de 3 muestras de suero (HeUy3, 4 y 7) en la línea celular A549 (ATCC CCL-185) y Hep-G2 (ATCC HB80-65) en base al procedimiento descrito por Zhang et al.⁵ con numerosas modificaciones. El protocolo se detalla a continuación. Las células A549 fueron propagadas en medio de Dulbecco-Eagle F12 (DMEM F12) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), 100 ug/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 3 ug/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (medio de mantenimiento), a 37 ° C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂. Previo a la inoculación del virus, las monocapas de células con una confluencia de 50-70% en placas de doce pocillos fueron lavadas tres veces con 1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las muestras de suero seleccionadas como inóculo viral se diluyeron con PBS conteniendo 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) y se filtraron a través de un microfiltro con un tamaño de poro de 0,22 uM (Millex-GV; Millipore Corp., Estados Unidos). Posteriormente las monocapas de A549 se infectaron con 0,2 mL de suero diluido y se incubaron a 37 ° C durante 3 horas. Luego de ese período se retiró el inóculo, se lavaron las células tres veces con PBS y se agregó 1 mL de medio de mantenimiento con 5% de FBS) a cada pocillo. La propagación de la infección se realizó a 37 ° C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. En el día después de la inoculación (día 1), las monocapas celulares se lavaron tres veces con 1 mL de PBS y se añadió 1 mL de medio de mantenimiento. Al día 2, 0,5 mL del medio de cultivo fue reemplazado con medio de mantenimiento fresco, y al día 3 las células fueron replicadas por primera vez. Para esto las monocapas se lavaron con PBS tres veces, y luego fueron tripsinizadas con una solución de 0.25% de tripsina (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos). Posteriormente se diluyeron 1: 4 en medio de crecimiento fresco, y las células se cultivaron durante otros tres días, hasta el momento de realizarse el siguiente pasaje. Las células infectadas fueron

replicadas en serie durante el período que se mantuvieran viables, controlando este proceso bajo visualización al microscopio óptico. Las microplacas con las células infectadas fueron examinadas diariamente en un microscopio invertido ante la generación de efecto citopático específico (CPE). Este procedimiento se llevó adelante con las 3 muestras de suero de pacientes con hepatitis E y en cada caso se incluyó dos pocillos de células sin infectar como control.

Detección de HEV en los cultivos inoculados

Luego de realizados 11 pasajes seriados se recuperó el sobrenadante y las células del cultivo infectado para proceder a la extracción del ARN para llevar adelante la detección del genoma viral. El ARN total del cultivo celular infectado fue extraído con el kit comercial QIAmp Viral RNA (Qiagen, Alemania) según especificaciones del fabricante. Este material fue empleado para realizar RT-nPCR⁶. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa 1.5% en buffer Tris Borato EDTA (TBE) y teñido con bromuro de etidio. La identidad del producto de PCR fue confirmada por secuenciación, llevada a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de MacroGen (MacroGen Inc. Corea).

Paralelamente, las células infectadas fueron sometidas a una inmunofluorescencia empleando un suero IgM/G positivo como anticuerpo anti-HEV, y un secundario anti-Ig G/M humano conjugado con isotiosanato de fluoresceína como anticuerpo secundario (Abcam, Estados Unidos). Las monocapas celulares infectada y sin infectar fueron fijadas en respectivas láminas de inmunofluorescencia y fijadas con 4% paraformaldehído (PFA) durante 10 minutos, luego de lo cual fueron lavadas con PBS y almacenadas hasta su uso.

El suero positivo empleado como anticuerpo anti-HEV fue diluído 1:10 en PBS-0.1% seroalbúmina bovina (BSA) (PBS-BSA) e incubado durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda con las células infectadas y no infectadas. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-BSA de 10 minutos cada uno y las láminas se incubaron con el anticuerpo secundario en una dilución 1:500 en PBS-BSA durante 1 hora. Finalmente las láminas fueron lavadas 3 veces con PBS, montadas y observadas en microscopio de epifluorescencia Nikon *Eclipse 80 i*.

El procedimiento y los reactivos para aislar HEV en la línea celular Hep-G2 fueron exactamente iguales al descrito anteriormente, excepto que el medio de cultivo empleado fue el de Dulbecco-Eagle (DMEM) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos).

A su vez, la detección del ARN viral en los cultivos infectados por RT-nPCR y la inmunofluorescencia fue llevada a cabo de igual manera que para las infecciones en la línea A549.

Además de la RT-nPCR, para la línea Hep-G2 se implementó una PCR en tiempo real (rt-PCR) descrita por Jothijumar et al.⁷, diseñada para detectar un fragmento de la región de solapamiento de las ORF2 y 3, empleando el kit SuperScript® III Platinum® SYBR® Green-One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos).

Resultados y Discusión

Luego de realizar 11 pasajes seriados fue posible observar en la monocapa de A549 infectada con el suero HeUy3 un claro CPE sin particularidades específicas, consistente en una destrucción de la monocapa celular (Fig. 3.2.). Las otras dos monocapas infectadas con los sueros HeUy4 y 7 no mostraron alteraciones morfológicas. Esto último se repitió en las células Hep-G2; es decir, no se observó ECP en ningún caso.

La inconsistencia en el desarrollo del CPE en algunas infecciones y no en otras, ya ha salido a la luz en varios artículos previos, y no hay explicaciones concluyentes. Se sugiere, sin embargo, que la mayor o menor carga viral del inóculo pueda afectar la morfología celular e incidir en el desarrollo del CPE^{4,5}.

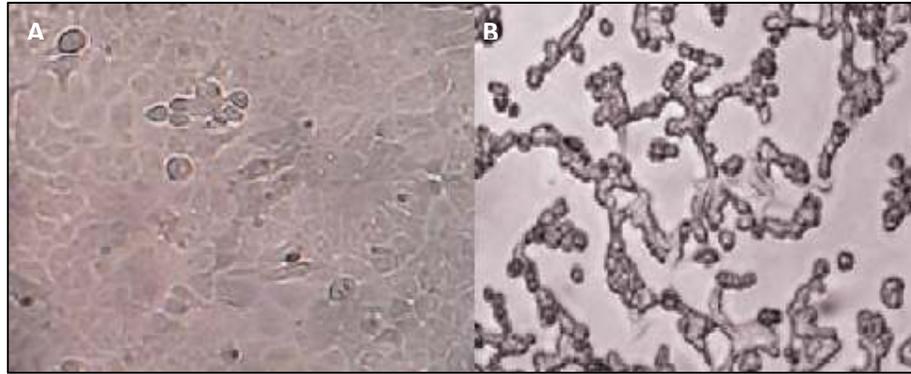


Figura 3.2. Efecto citopático (ECP) observado en la línea celular A549 luego de la inoculación y 11 pasajes seriados del suero HeUy3 infectado con HEV. **A.** células sin infectar; **B.** CPE en células infectadas.

Una vez concluido el procedimiento de aislamiento se implementaron las técnicas moleculares para la detección del genoma viral. Así, por RT-nPCR fue posible amplificar correctamente el fragmento correspondiente a una región del ORF1 en todos los casos en la línea A549 (Fig. 3.3.). Sin embargo, en la línea Hep-G2, sólo de dos de los sueros (HeUy3 y 4) fue posible aislar HEV. Claramente además, la intensidad de las bandas específicas del producto de la PCR observadas en las células Hep-G2 infectadas fue muy inferior a las visualizadas en la línea A549.

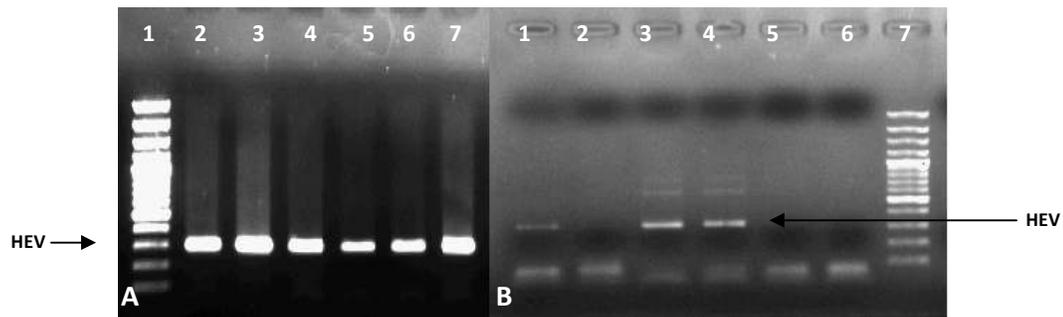


Figura 3.3. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de los productos de 287 pb de la RT-nPCR realizada en base al extremo 3` del ORF1. **A.** cultivos de células A549 infectadas con los tres sueros (HeUy3, carriles 2 y 3; HeUy4, carriles 4 y 5; HeUy7, carriles 6 y 7). **B.** cultivos de células Hep-G2 infectadas. Suero HeUy 3, carriles 1 y 2; HeUy4, carriles 3 y 4; HeUy7, carriles 5 y 6. Los marcadores de peso molecular de 100 pb GeneRuler (ThermoScientific, Estados Unidos) se observan en los carriles 1 y 7 de las figuras A y B, respectivamente.

Así como la identidad del fragmento amplificado fue corroborado por secuenciación en A549, esto no se pudo realizar en Hep-G2. Por tal motivo, se llevó adelante una rtPCR, como forma de confirmar este hallazgo en el último pasaje celular de la infección. Este ensayo evidenció la presencia de ARN viral en los cultivos de Hep-G2 infectados (Fig.3.4.). En la reacción fue incluido un control positivo (C+) y un control negativo (C-), que se realizaron por duplicado.

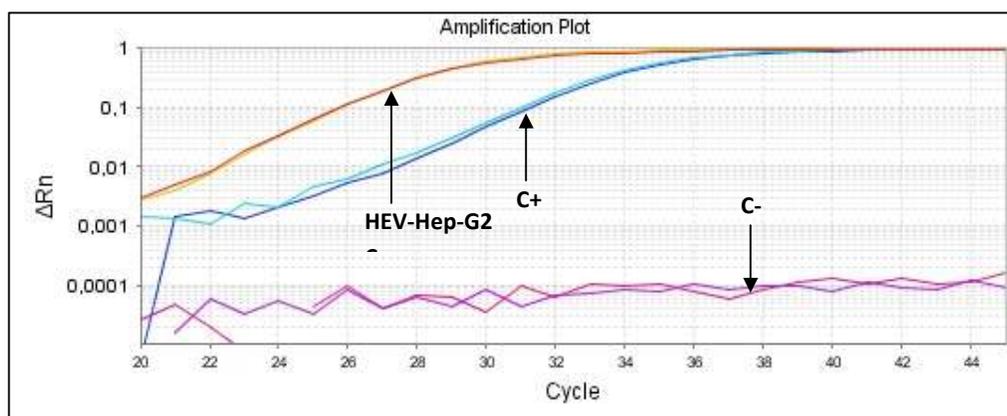


Figura 3.4. rtPCR para la detección de HEV en cultivos de Hep-G2 infectados. Este ensayo está diseñado para amplificar un pequeño fragmento de la región de solapamiento del ORF2 y 3. Se muestran las curvas de amplificación para el suero HeUy3 aislado, correspondiente al pasaje 11.

Los Ct observados en la reacción de rt-PCR fue de 26.9 para ambas réplicas, mientras que el del C+ fue 32.4 y 32.1, réplica 1 y 2, respectivamente. Este hallazgo tuvo concordancia con los valores límites establecidos para este protocolo⁷.

Claramente estos resultados permiten afirmar que fue detectado ARN viral en los cultivos celulares de ambas líneas luego de los 11 pasajes seriados llevados adelante.

La inmunofluorescencia realizada con un suero positivo con anticuerpos anti-HEV, por su parte, reveló la presencia de proteínas virales en las células A549 y Hep-G2 infectadas (Fig.3.5.). La señal se observó en todo el citoplasma celular en forma homogénea, no existiendo señal en el núcleo, lo cual es esperable para un

virus con genoma ARN de la familia *Hepeviridae*. En las células sin infectar no se observó fluorescencia.

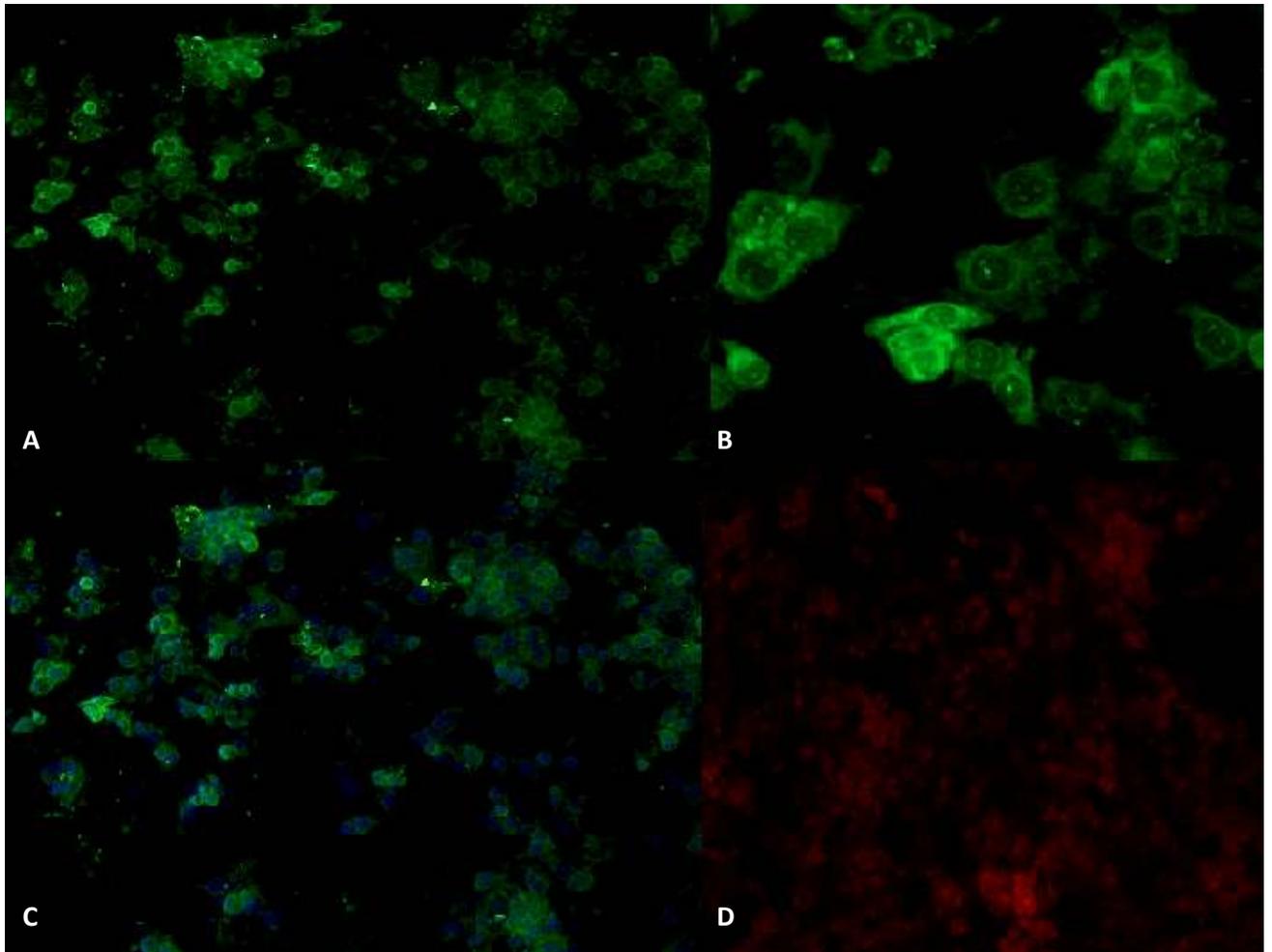


Figura 3.5. Inmunofluorescencia para la detección de HEV en cultivos celulares inoculados con un suero de una paciente infectado con HEV. Se muestra resultado sólo para A549. Como anticuerpo primario se empleó un suero humano anti-HEV y como secundario un anti-IgG/M conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El esanto fue realizado luego de 11 pasajes seriados. **A y B.** células A549 infectadas; **C.** Merge con DAPI; **D.** células sin infectar utilizadas como control. A, C y D: 10x; B: 20X.

Los resultados observados en esta sección de la Tesis demuestran que fue posible desarrollar un sistema de aislamiento de HEV práctico y sencillo empleando las líneas celulares A549 y Hep-G2. De las dos líneas, los mejores resultados se evidenciaron con A549, en la cual fue posible observar, al menos en un caso, la aparición de un claro ECP. Estas metodologías han facilitado el

correcto desarrollo de las investigaciones propuesta en este trabajo permitiendo así profundizar los estudios acerca de la biología y la virología molecular del HEV.

ii. Aislamiento de HEV en hepatocitos primarios de rata neonata

Como se ha comentado anteriormente en el **Capítulo 1** es materia de discusión la capacidad de las cepas de HEV detectadas en roedores, particularmente ratas domésticas y salvajes, de ser transmitidas por vía zoonótica al ser humano y otros reservorios, y viceversa⁸. Este asunto es sumamente importante ya que incide fuerte y directamente en aspectos epidemiológicos y sanitarios de la infección por HEV, particularmente en zonas no endémicas. Resultan importantes entonces las investigaciones enfocadas a estudiar la posibilidad de la transmisión zoonótica desde roedores, a través del desarrollo de sistemas de cultivos *in vitro* e infecciones *in vivo* bajo condiciones de laboratorio. En este sentido algunos reportes de trabajo realizados en líneas celulares humanas y de ratas (*Rattus rattus*) han arrojado resultados contradictorios y las evidencias no son concluyentes^{9,10}. No se han descrito, sin embargo, investigaciones implementadas con cultivos primarios de rata, evaluando su susceptibilidad a cepas de HEV humanas.

En esta sección se describen los experimentos realizados con el objetivo de investigar la capacidad de aislados de HEV detectados en casos humanos de hepatitis E, de infectar hepatocitos primarios de rata neonata.

Materiales y Métodos

Animales y obtención de hepatocitos

Los animales (hembras de rata neonata, *Rattus rattus*) sacrificados fueron proporcionados por el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UdelaR.

Una vez trasladados los cuerpos en cadena de frío a nuestro laboratorio, se procedió a la extracción del hígado a cada uno de los animales con material quirúrgico adecuado y en condiciones de esterilidad.

Los hígados extraídos fueron diseccionados mecánicamente con bisturí separando el tejido conectivo del parénquima y perfundidos en una solución de 0.25% de tripsina (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) en agitación (100 revoluciones por minuto, RPM) a 37°C durante 3 horas. Luego de ese período la suspensión fue centrifugada a 2000RPM en frío durante 10 minutos, y el sobrenadante fue distribuido en una placa de Petri de 90mm (Nunc, ThermoScientific, Estados Unidos) conteniendo medio de cultivo de crecimiento de hepatocitos (MCCH) e incubado a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. El MHCC se preparó en base a DMEM F12 (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), 15% SFB (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), 100 ug/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 3 ug/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 10 mg/mL insulina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). A las 72 horas se le sustituyó el MCCH, lo cual fue repetido durante todo el período en el que los cultivos estuviesen viables. El pellet obtenido de la primer centrifugación fue resuspendido en una solución de tripsina 0.25% e incubado en agitación durante otras 2 horas a 37°C. Posteriormente, el sobrenadante fue incubado con el medio de cultivo y en las condiciones que se describen arriba.

Luego de 72 horas de iniciado el cultivo se evaluó con una Kit comercial la producción de glucógeno por tinción con ácido peryódico (PAS) como evidencia de diferenciación de los hepatocitos, de acuerdo a especificaciones del fabricante (Leica Biosystems, Alemania) .

Aislamiento e identificación de HEV en los hepatocitos primarios

La inoculación de los cultivos primarios frescos (18-24 horas de subcultivo) se llevó adelante con los sueros humanos infectados con cepas del Genotipo 3 HeUy 3, 4 y 7 en idénticas condiciones que lo descrito para la línea celular A549 en formato de placas de 6 pocillos. La infección viral se permitió desarrollar por 30 días, con dos cambios de medio de cultivo iniciales, a los 2 y 4 días posteriores a la inoculación. Luego, cada 2 días se cosechó la mitad (1.5mL) del volumen de cada pocillo para testear la presencia de HEV. En cada caso se incluyó un control de células sin infectar.

El monitoreo de la replicación viral se realizó por rt-PCR e inmunofluorescencia con el mismo protocolo empleado con las líneas celulares (ver arriba).

Resultados y Discusión

El protocolo y los procedimientos desarrollados para obtener hepatocitos primarios de rata resultaron exitosos y reproducibles, logrando mantener cultivos de estas células por un período de hasta 50 días (Fig. 3.6.) . El ensayo de PAS implementado con el objetivo de verificar la diferenciación de los hepatocitos, confirmó la identidad de los cultivos celulares y permitió avanzar en el desarrollo de un método de aislamiento de HEV en estas células primarias.

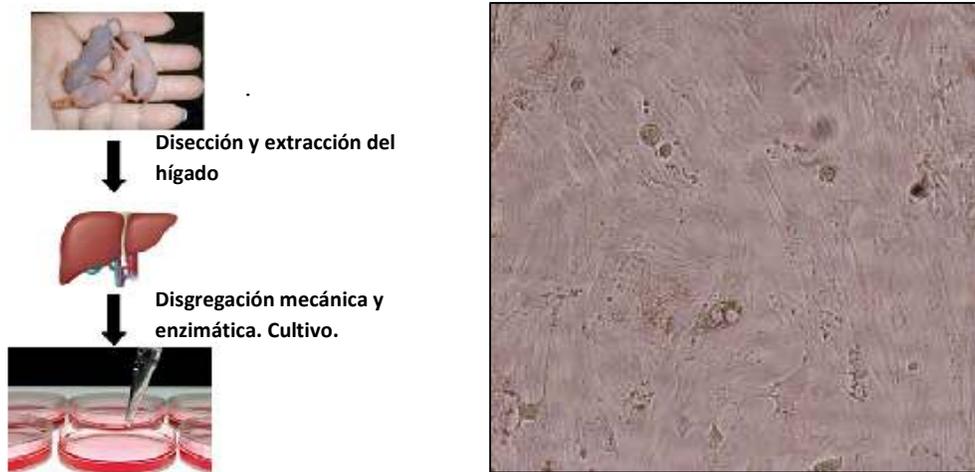


Figura 3.6. Esquema de obtención de cultivo primario de hepatocito de rata (*Rattus rattus*) neonata (izq). Ver texto por más detalles. Se muestra además una imagen tomada con microscopio óptico a los 7 días de iniciado el cultivo de los hepatocitos (10X) (der) .

Como forma de monitorear la infección viral, cada 2 días se cosechó la mitad del volumen de cada pocillo para realizar una extracción del ARN y posterior rt-PCR según se especifica en la sección *Materiales y Métodos*. En los primeros 4 días post inoculación los medios de cultivos fueron removidos y las monocapas fueron lavadas 3 veces, con el objetivo de evitar arrastrar ARN viral del inóculo a las cosechas posteriores a ser testeadas por rt-PCR. Se evaluaron 15 colectas de

cada una de las infecciones, además de los respectivos controles negativos y no se amplificó ARN viral en ningún caso, excepto en los C+ usados como control de la rt-PCR.

Similarmente, la inmunofluorescencia no evidenció presencia de antígenos virales en los cultivos inoculados.

Los resultados aquí expuestos sugieren, que si bien fue posible aislar de forma relativamente fácil hepatocitos de hígado de rata neonata, los cultivos derivados no son susceptibles a la infección por cepas humanas del Genotipo 3 de HEV. Esto es, obviamente, bajo las condiciones de laboratorio implementadas en esta investigación. De hecho no existió en este trabajo evidencia alguna que soporte la tesis contraria.

Se propone, como forma de profundizar el estudio del rol de *Rattus rattus* como reservorio de cepas zoonóticas de HEV, implementar nuevos estudios *in vivo*, y desarrollar un sistema de cultivos de hepatocitos primarios humano para así evaluar su susceptibilidad a las cepas detectadas en ratas.

Referencias

1. Tam, A.W., White, R., Reed, E., et al., 1996. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 215; 1-9.
2. Tam, A.W., White, R., Yarbough, P.O., et al., 1997. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 238; 94-102.
3. Emerson, S.U., Nguyen, H., Graff, J., Stephany, D.A., Brockington, A., Purcell, R.H. 2004. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* 78; 8438-8446.
4. Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., Okamoto, H., 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 88; 903-911.
5. Zhang, H.Y., Chen, D.S., Wu, Y.Q., He, Q.G., Chen, H.C. and Liu, Z.F. 2011. Both swine and human cells are capable to support the replication of swine hepatitis E virus type 4 in vitro. *Vir. Res.* 258; 289-293.
6. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Arbiza, J., 2013. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res.* 173; 364-70.
7. Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J. and Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 131; 65-71.

8. Meng XJ. 2013. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin. Liver. Dis.* 33: 41–49.
9. Li, T.C., Ami, Y., Suzaki, Y., Takeda, N., Takaji, W., 2013. No evidence for hepatitis E virus genotype 3 susceptibility in rats. *Emerg. Infect. Dis.* 19(8);1343-1345.
10. Jirintai, S., Tanggis, Mulyanto, et al., 2014. Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 185;92-102.

III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE HEV Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

En esta sección se presentan los hallazgos publicados en un artículo científico, enfocados en la caracterización molecular de los primeros casos autóctonos de hepatitis E identificados en nuestro país y reportados por nuestro grupo¹.

En este trabajo se llevó adelante un minucioso análisis filogenético, a través del desarrollo e implementación de técnicas moleculares que permitieron amplificar y estudiar distintos segmentos del genoma viral enmarcados dentro del ORF1 (región hipervariable y extremo 3') y ORF2.

Las reconstrucciones filogenéticas basadas en las tres regiones sugirieron una estrecha relación con un conjunto de cepas de origen Europeo, particularmente de Alemania y Francia, aisladas de cerdos y humanos. Esta relación había sido observada previamente¹. Sorpresivamente, las cepas caracterizadas en este trabajo no estaban emparentadas filogenéticamente con cepas regionales reportadas en Brasil, Argentina y Bolivia, lo cual sugiere que la historia evolutiva del HEV en Sudamérica es más compleja de lo que se pensaba.

Paralelamente, el estudio del extremo 3' permitió identificar, en el grupo de aislados detectado en nuestro país, la co-circulación de dos subtipos distintos del Genotipo 3: 3i y 3h.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL: Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Arbiza, J., 2013. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res.* 173(2):364-70.

Referencias

1. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Gagliano, G. and Arbiza, J., 2011. Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human hepatitis E virus infection in Uruguay. *Arch. Virol.* 156; 1451-1454

IV. ANÁLISIS DE COALESCENCIA BAYESIANA: HISTORIA EVOLUTIVA DE HEV.

Se describen en esta sección los hallazgos presentados y descritos en un manuscrito que se adjunta al final del capítulo, y que fuera enviado para su evaluación y publicación en el *Journal Infection, Genetics and Evolution*.

En este trabajo se avanza el estudio de las cepas de HEV detectadas en nuestro país y caracterizadas a nivel molecular. Puntualmente se diseñó una investigación con el claro objetivo profundizar el conocimiento de la dinámica poblacional del virus y desarrollar una hipótesis sobre el origen temporal y genético del HEV en Uruguay. En este sentido se analizó mediante una aproximación de coalescencia bayesiana, una región de 758 pb del ORF2 de todas los aislados identificados en nuestro país en los que fue posible amplificar el ORF2, junto con las secuencias del Genotipo 3 de HEV disponibles en el GenBank para las que se haya documentado su fecha de aislamiento. Así, se infirieron las relaciones filogenéticas, las tasas de evolución y el tiempo de los antepasados comunes más recientes (tMRCAs).

La reconstrucción filogenética y el análisis de coalescencia revelaron que los aislados del Genotipo 3 de HEV se agrupan en dos clados claramente distinguibles, con un tMRCA fechado en hace aproximadamente 340 años (95% HPD: 696-147 años). Por su parte, el análisis bayesiano sugirió que todas las cepas Uruguayas formaron hace unos 100 años un único clado con un linaje europeo, y compartieron, a su vez, un ancestro común muy reciente calculado entre 2004 y 2009.

De acuerdo con el Skyline plot, implementado con el objetivo de investigar la dinámica poblacional de HEV, el número efectivo de infecciones por el Genotipo 3 en todo el mundo experimentó un aumento dramático en los 1940`s, después de haberse mantenido estable durante aproximadamente 70 años. Desde los últimos 10 años, sin embargo, este número ha venido disminuyendo en forma progresiva y sostenida.

Por lo expuesto y observado, la infección por HEV en Uruguay parece tener un origen muy reciente, probablemente de una fuente europea. Por su parte, el

estudio de dinámica poblacional reveló variaciones temporales sustanciales en la tasa de transmisión del Genotipo 3 a partir de la segunda mitad del siglo XX.

INVESTIGACIÓN ORIGINAL: Mirazo, S., Mir, D., Ramos, N., Musto, H., Arbiza, J., 2014. Bayesian coalescent inference and evolutionary dynamics of Hepatitis E virus (HEV) populations suggest a recent history of the infection in humans in Uruguay. *Draft* enviado para su evaluación y publicación en Infect. Gen. & Evol.

CAPÍTULO 4

I. CLONADO, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ORF2 Y ORF3 EN *Escherichia. Coli*

En esta Sección nos enfocaremos en la descripción detallada de dos de las proteínas virales, codificadas por el ORF2 y ORF3, más investigadas por la comunidad científica dedicada al estudio de HEV, en función de su importancia para el desarrollo de vacunas y kits de diagnóstico.

En esta Tesis, estas dos proteínas fueron abordadas con el objetivo de desarrollar y optimizar técnicas de clonado, expresión y purificación de proteínas en sistemas procariotas, puntualmente en *Escherichia coli* (*E. coli*), de manera de luego profundizar en el estudio de biología viral.

Los métodos y resultados descritos más abajo fueron llevados adelante y generados a través de una pasantía en el Virology Lab, del International Centre for Engineering and Biotechnology (ICGEB), New Delhi, India, a cargo del Dr. Shahid Jameel, para luego ser implementados en nuestro laboratorio.

Previo a la exposición de metodología y la discusión de los resultados, es necesario profundizar en la descripción de ORF2 y ORF3.

ORF2

El ORF2 del HEV codifica la proteína de la cápside viral de 660 aa (desde nt 5145-nt 7125; aislado SAR-55), cuya función propuesta es encapsidar el genoma de ARN viral¹. Cuando este gen es expresado en células animales en cultivo, se obtienen dos proteínas de aproximadamente 74 y 88 Kilo Dalton (kDa), que luego de diversos estudios con tunicamicina y tratamiento con endoglisidasa, demostraron ser las formas no glicosiladas y glicosiladas, respectivamente².

Al ser expresada en células de insecto usando Baculovirus recombinante, se detecta una proteína ORF2 truncada en el N-terminal (aa 112-660) con un tamaño esperado de 58 kDa, pero también se observa una proteína de 50 kDa que es eficientemente secretada en el medio de cultivo en forma de partículas similares a virus (*Virus-like particles*, VLP) de 23-24nm de diámetro³. Métodos de criomicroscopía electrónica acoplados a técnicas de microscopía de reconstrucción de imagen han demostrado que las VLP de HEV tienen una estructura de T = 1 con dímeros que sobresalen en los ejes de la doble simetría

icosaédrica, de manera que los 60 monómeros se organizan como 30 unidades morfológicas⁴. Posteriormente se encontró que los aminoácidos 126 a 601 del ORF2 eran esenciales para la formación de VLP secretada en este sistema de expresión³. Las estructuras recientemente obtenidas por cristalografía de rayos X muestran que los monómeros de la proteína ORF2 contienen tres dominios distintos: *shell* (S), *middle* (M) y *protruding* (P)^{5,6} (Fig. 4.1.)

Similarmente, las proteínas ORF2 recombinantes expresadas en *E. coli* también ha demostrado ensamblarse en estructuras de orden superior. Las estructuras p239 (aa 368-606), E2 (aa 394-606) y E2a (aa 459-660) (Fig. 4.2.) se observan predominantemente como homodímeros, bajo condiciones ligeramente disociantes, que modela los determinantes antígenicos dominantes y los sitios de neutralización de HEV⁷⁻⁹.

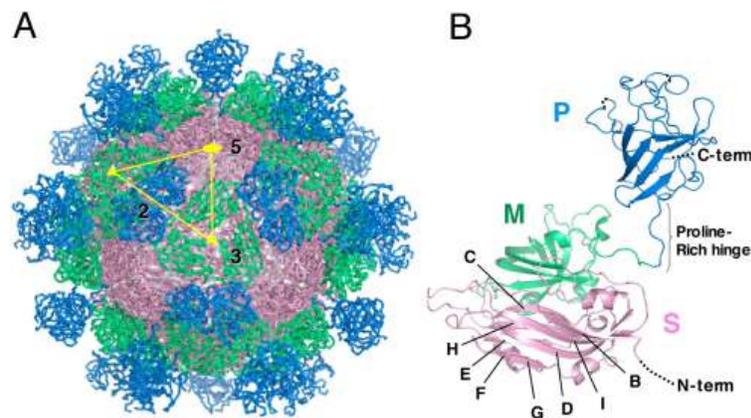


Figura 4.1. Estructura cristalográfica de VLP de HEV (HEV-VLP). Los dominios S, M, P de la proteína de cápside de HEV se indican en rosado, verde y azul, respectivamente. **A.** HEV-VLP se compone de sesenta subunidades de cápside icosaédrica que forman los ejes 2, 3, y 5-fold, generando una simetría T = 1. **B.** El diagrama de cintas de una subunidad de la cápside de HEV-VLP muestra los dominios P, M y S en la parte superior, media e inferior, respectivamente. El dominio S muestra una estructura barril β tipo jerry-roll. Los hojas β antiparalelas se indican (B a I). Extraído de¹⁰

En condiciones nativas, las proteínas E2s y E2a forman hexámeros, y la proteína p239 se ensambla en una partícula de 23 nm⁹. La estructura cristalográfica de la proteína E2s (aa 455-602) muestra que forma un homodímero compacto,

esencial para la interacción HEV con la célula huésped, y a su vez contiene el sitio de reconocimiento de anticuerpos neutralizantes de HEV ¹¹.

Varios estudios han investigado los dominios de neutralización de la proteína de cápside. Empleando el método de *phage display*, Schofield et al.¹² identificaron dos anticuerpos monoclonales neutralizantes de chimpancés obtenidos de una infección experimental con HEV, que mapearon en epítopos solapantes en la región comprendida entre los aa 578-607. Luego, Meng et al.¹³ generaron anticuerpos contra múltiples péptidos superpuestos y proteínas truncadas del ORF2, que fueron evaluados en un ensayo de infectividad en cultivos de células *in vitro* y de esta forma fue localizado el dominio mínimo de neutralización (DMN), entre los aa 452 Y 617.

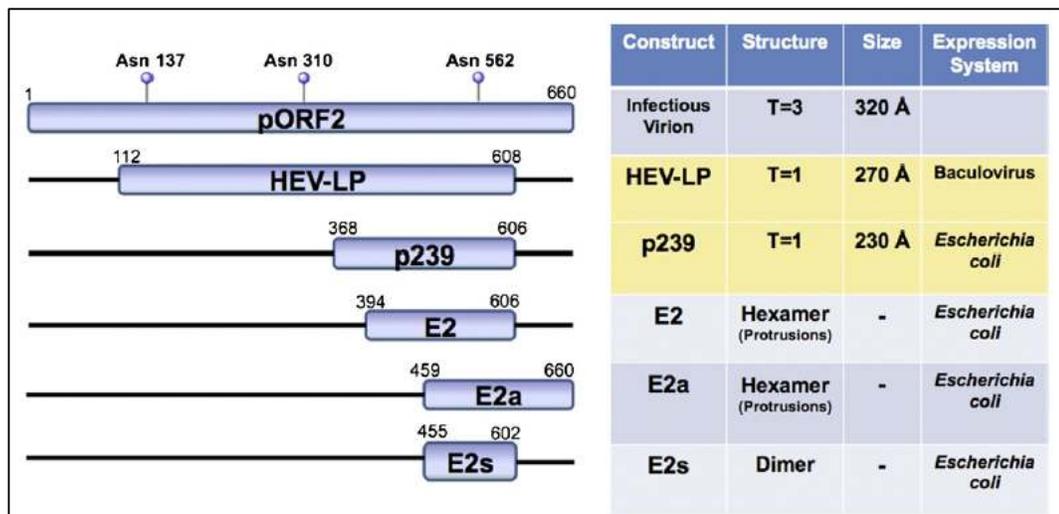


Figura 4.2. La proteína de cápside (pORF2) de HEV, codificada por el ORF2 tiene una longitud completa de 660aa. En las células animales, pORF2 está glicosilada y tres sitios de glicosilación *N-linked* se han asignado a los residuos de asparagina indicados (ASN). Una proteína truncada de 56 kDa (aa 112-607) se auto-ensambla en células de insectos para formar partículas similares a virus (VLP), que poseen los mismos epítopos antigénicos dominantes que el virión. A su vez, diversas construcciones más cortas se han expresado en *E. coli*. Entre ellas, p239 forma partículas a través de interacciones dimericas, mientras que E2s y E2a forman protuberancias hexaméricas en la superficie. E2s se ha propuesto como el dominio de dimerización. Extraído de ¹⁰.

Posteriormente fue confirmado que El DMN mapea en los residuos 458-607¹⁴. Al ser combinados con evidencias y datos estructurales, todos estos estudios de mapeo sitúan el (los) el epítipo (s) de neutralización en el dominio P de la proteína ORF2^{5,6,15}.

ORF3

Inicialmente se sostenía que el ORF3 de HEV codificaba una proteína que se expresaba con un tamaño de 123 aa. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que esta proteína es traducida desde un ARN subgenómico bicistrónico a partir de un codón de inicio AUG ubicado en la posición 5131 (en referencia al aislado SAR55), lo que daría como resultado una proteína de 114aa (nueve aa más corto en su N-terminal que lo que se pensaba inicialmente)¹⁶. Utilizando un sistema de replicación basado en ARN genómico producido *in vitro*, se evidenció que el ORF3 era prescindible para la replicación *in vitro* en las células Huh7 y otras líneas celulares¹⁷. Sin embargo, es necesaria para la infección en monos que recibieron inoculación intrahepática de ARN genómico de HEV¹⁸. Estas observaciones sugieren que ORF3 es una proteína accesoria viral, y es probable que afecte la respuesta inmune del huésped a la infección.

La proteína ORF3 se ha expresado usando diversos sistemas que incluyen *E. coli*, *Pichia pastoris* y líneas celulares mamíferas^{2,19,20}. En células de mamíferos, ORF3 expresa una proteína de ~13 KDa, fosforilada en un solo residuo de serina por una kinasa celular activada por mitosis (MAPK)²¹. Las células transfectadas con ARN genómico de HEV preparado *in vitro* también asimismo expresan una proteína del mismo tamaño, que puede ser inmunoprecipitada con anticuerpos anti-ORF3^{17,18,22}.

Materiales y Métodos

Clonado de ORF2 y ORF3

Las muestras positivas para HEV empleada para realizar los ensayos de clonado y expresión de ORF2 y ORF3 fueron obtenidas de los pacientes con hepatitis E descritos en el **Capítulo 3**, infectados con cepas del Genotipo 3.

Para este estudio se implementó una estrategia basada en retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR) para amplificar ORF2 y ORF3. Los cebadores o primers fueron diseñados en base a la secuencia de la cepa de Birmania del Genotipo 1 SAR55 y se muestran en la Tabla 4.1. .

El ARN viral obtenido de los sueros infectados con HEV Genotipo 3 se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) a 42°C durante 60 min mediante Superscript II (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos), que luego fue amplificado por PCR (*Taq Platinum*® Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos) con los primers 5051 y 7155. El producto derivado de esta RT-PCR fue reamplificado a través de una PCR seminested en el que un cebador era el mismo que en la primera PCR, mientras que el otro (5136) era un cebador interno que a su vez incluía un sitio de restricción *NcoI* (Tabla 4.1.).

La ORF2 completa fue reconstruida en el vector pSP65 (Promega, Estados Unidos) como un fragmento *NcoI-BamHI*. Posteriormente, para la expresión de proteínas en *E. coli*, el fragmento *NcoI-BamHI* de 2 kb del ORF2 completo fue subclonado en el vector de expresión procariota pRSET-B (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos). Para confirmar el correcto clonado del gen, múltiples clones fueron secuenciados en ambas direcciones con cebadores externos e internos respecto al inserto a través del servicio de secuenciación y análisis bioinformáticos del ICGEB, New Delhi.

En el caso del ORF3, se implementó una PCR seminested con los cebadores 5094, 5550, y 5454 (Tabla 4.1.), precedida de una retrotranscripción, para amplificar directamente el gen completo. Posteriormente fue clonado en el vector pSP65 (Promega, Estados Unidos) como un fragmento *NcoI-BamHI* y subclonado en el vector pRSET-B (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos). La confirmación del clonado se realizó de la misma manera que para ORF2.

Todos los primers fueron y protocolos de PCR fueron diseñados por miembros del laboratorio del Dr. Shahid Jameel.

Tabla 4.1. Primers y ciclados para la amplificación de ORF2 y ORF3

Primer (polaridad) ^a	Secuencia ^b	Ciclado ^c	
		°C (min)	Nº ciclos
ORF2			
5051 (+)	CTGAGTCAGTAAAACCAAGTGC	95 (1) 60 (2) 72 (3)	35
5136 (+)	GGTTCTAGACCATGgGCCCTCGGCCTA		
7155(-)	AGGGAGCGCGGAtCcCAGAAATGAGAAATAAGCAACAGA		
ORF3			
5094 (+)	GTGTCGGGTGccATGgATAACATGTCTTTTGTCTGCGCC	95(1) 55 (2) 72 (2)	35
5600 (-)	CCACGGAAGAGGTAAGGGGAGATGTTGATAGGTTATACT		
5554 (-)	GCGGAGGAtccCCGGTTAGCGGCGCGGCCCCAGCTGTGG		

a. +: primer forward; -: primer reverse

b. las bases modificadas para generar un sitio de restricción (subrayado) se muestran en minúscula. Los codones *START* de ORF2 y ORF3 se muestrna en *cursiva*.

Expresión y purificación de las proteínas codificadas por ORF2 y ORF3 de HEV

Para la expresión de los antígenos de HEV en *E. coli*, se utilizó la serie de vectores pRSET. Estos producen una proteína de fusión con una extensión N-terminal de 32 a 47 aa, dependiendo en el sitio de clonación. Para los antígenos de HEV, las extensiones fueron 43 y 35 aa para las proteínas ORF2 y ORF3 , respectivamente,. La proteína de fusión incluye un dominio de hexa histidina (*His-tag*) para facilitar la purificación por afinidad de la proteína recombinante y de un sitio de escisión de enteroquinasa para la eliminación de la proteína N-terminal fusionada. Células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector de expresión apropiado se utilizaron para la expresión del polipéptido. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación durante 14-18 hs en medio de cultivo de Luria conteniendo 100 ug/mL de ampicilina. Luego los cultivos se diluyeron cinco veces en medio M9-ZB (10 g de NZ-amina/L, 5 g de NaCl/L, 1X M9 sales, 1 mM de MgSO₄, 0,4% de glucosa) (Sigma Aldrich, Estados Unidos) conteniendo 25 ug/mL ampicilina(Sigma Aldrich, Estados Unidos) y se cultivaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6-0.8. A continuación, se indujeron con IPTG 1 mM (isopropil-bD-tiogalactopiranosido) (Sigma Aldrich, Estados

Unidos) durante 3 horas a 37°C con agitación constante. Posteriormente, las células se recogieron por centrifugación a 6000 RPM durante 10 minutos a 4°C en un rotor GS3 (Sorvall) y se mantuvieron congeladas a -70°C.

El pellet de *E. coli* se resuspendió en un volumen 1/50 en buffer de unión o *binding* (20 mM Tris-HCl [pH 7,9], NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y se sometió a tres ciclos de congelado-descongelado en nitrógeno líquido y agua (4-10°C). La suspensión de células se sometió a sonicación por cinco pulsos de 30 segundos cada uno a 60% de la potencia máxima en un aparato de ultrasonidos Branson y se centrifugó a 13.000 RPM durante 15 min a 4°C en un rotor SS34 (Sorvall). El pellet post sonicación se lavó una vez con un volumen igual de buffer de *binding*, se resuspendió en el mismo volumen de buffer conteniendo 4 M (para la proteína ORF3) o 6 M (para la proteína ORF2) de urea, y se incubó en hielo durante 1 hora. En el caso de ORF2 se incluyó un lavado previo con buffer de *binding* conteniendo urea 2M. La proteína solubilizado en urea se purificó por cromatografía de afinidad en resina de níquel *Su Bind Z* (Novagen Pharma, Sudáfrica) de acuerdo al protocolo del fabricante. Los procedimientos de purificación de los lotes se llevaron a cabo con 5 mL de resina, establecida para el equivalente de proteína de 250 mL de cultivo inducido. Optimamente, las proteínas ORF2 y ORF3 se eluyeron de esta resina a 400 mM de imidazol, según el análisis del procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS) y Western Blot.

La cuantificación de los lotes de proteína se realizó por HPLC, mediante una curva de estandarización, y por absorbancia a 280 nm en Nanodrop (ThermoScientific, Estados Unidos)

Electroforesis en gel de poliactrilamida con SDS (SDS- PAGE) y Western Blot

Los antígenos purificados (350 ug cada uno) fueron separados en un PAGE al 12% (12 x 15 cm y un grosor de 1,5 mm) con SDS. El gel *stacking* estaba compuesto por 0.5mL acrilamida-bisacrilamida 30%, 0.06M Tris pH6.8, 0.1% SDS, 0.1% persulfato de amonio (APS) y 0.001% TEMED. Por su parte el gel *running* contenía 4 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%, 0.37M Tris pH8.8, 0.1% SDS,

0.01% APS y 0.001% TEMED. Los reactivos para la realización de ambos geles eran de Applichem, Estados Unidos.

Una vez finalizada la electroforesis de 3 horas de duración, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante procedimientos estándar. La membrana fue bloqueada con 5% de leche sin grasa en PBS (pH 7.2) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Después de un enjuague con buffer de lavado (PBS, 0.05% Tween 20), se incubó con con sueros positivos para HEV a una dilución 1:20 en 1% de leche descremada en PBS o con los anticuerpos monoclonales anti-ORF2 (AbCam, Estados Unidos) y anti-His-Tag (AbCam, Estados Unidos), y anti-His-tag en el caso de ORF2 y 3, respectivamente. Después de 2 horas de incubación con agitación a temperatura ambiente, las membranas se lavaron tres veces durante 5 min cada uno de los lavados con buffer de lavado. Posteriormente se prosiguió a la incubación con una dilución 1:2000 (en buffer de lavado) de anti-inmunoglobulina humana G (IgG) /M de rábano conjugada con peroxidasa (Sigma Aldrich, Estados Unidos) durante 1 hora a temperatura ambiente y con un anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa en una dilución 1/1000 en el caso del revelado de anti-ORF2 y del anticuerpo anti-His-tag. Después de un lavado con buffer de lavado, se realizó el revelado con 3,3'-diaminobencidina como sustrato (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Resultados y Discusión

El objetivo de esta parte de la Tesis fue desarrollar y optimizar técnicas de clonado, expresión y purificación de proteínas de HEV en sistemas procariontes, puntualmente en *E. coli*, de manera de luego profundizar en el estudio de biología viral. Para esto se realizó una estadía en el ICGEB de New Delhi, y cuyos resultados se describen a continuación. Los procedimientos de amplificación por RT-PCR de los dos genes seleccionados fueron exitosos (Fig. 4.4.) y se logró construir un plásmido de expresión procarionte conteniendo la secuencia codificante completa de los genes.

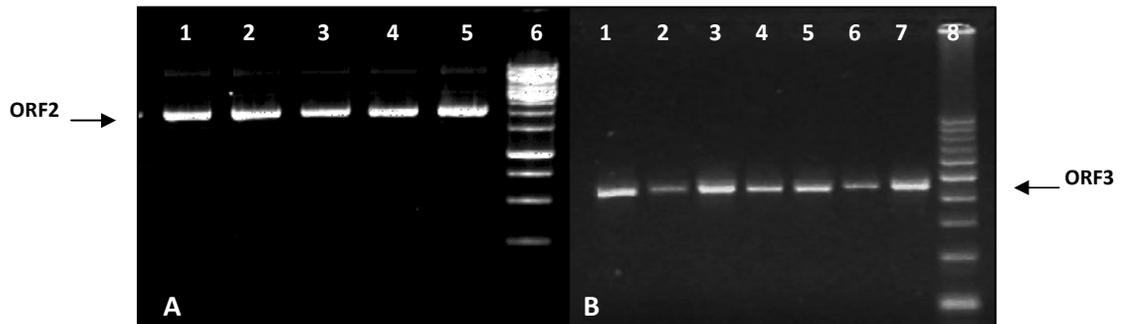


Figura 4.4. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de amplicones de 2200 pb y 450 pb de la RT-PCR de los genes ORF2 y 3 de HEV Genotipo 3, respectivamente. **A.** Se muestran resultados de los cinco sueros en los que se amplificó ORF2. **B.** ORF3 fue amplificada en siete muestras.

Los productos de PCR luego fueron purificados y secuenciados para ser clonados. Los marcadores de peso molecular de 1000 y 100 pb GeneRuler (ThermoScientific, Estados Unidos), para ORF2 y 3 se observan respectivamente en los carriles 6 y 8 de las figuras A y B.

Los fragmentos de PCR conteniendo los ORF2 y ORF3 completos fueron clonados por separado en el vector de expresión procariota pRSET-B como se describe anteriormente. Después de la inducción con IPTG, abundantes cantidades de los polipéptidos ORF2 y ORF3 se expresaron (Fig.4.5.), como lo demuestra su ausencia en las células BL21 (DE3) transformadas con el plásmido parental, pRSET-B.

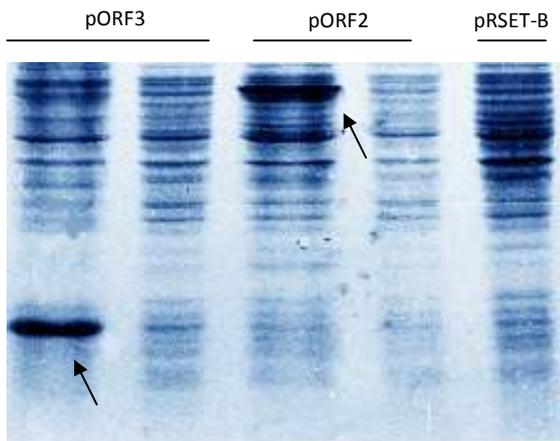


Figura 4.5. Expresión de los polipéptidos en el ORF2 y ORF3 en *E. coli*. Células BL21 (DE3) transformadas con el vector de expresión pRSET-B parental o el vector que contiene el gen completo ORF2 u ORF3 (pORF2 y pORF3) fueron cultivadas, inducidas, y se analizaron como se describe en Materiales y Métodos. Para cada plásmido se muestran células sin inducir e inducidas. Cada carril contenía lisados celulares totales procedentes del equivalente a 50 ul de cultivo. El gel se tiñó con Azul de Coomassie. Peso ORF2 y ORF3, ~78 y ~17 KDa respectivamente.

Debido al sistema y el procedimiento de expresión escogido, ambas proteínas se acumularon en forma de cuerpo de inclusión; una característica que fue explotada para la posterior purificación. Las proteínas en los cuerpos de inclusión lavados y solubilizados con urea, se purificaron por cromatografía de afinidad en una resina de níquel-agarosa. Como se observa en las figuras 4.6. y 4.7., este procedimiento generó preparaciones de las proteínas ORF2 y ORF3 de alta pureza y homogeneidad.

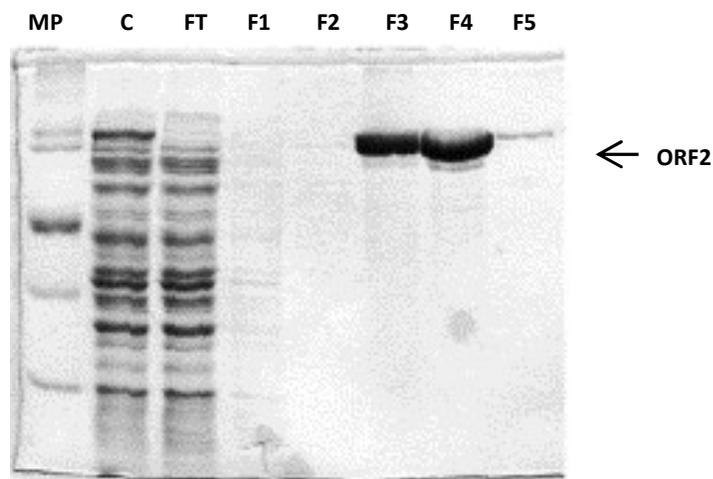


Figura 4.6. Purificación de ORF2 expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión. Las proteínas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una matriz de níquel-agarosa y las distintas fracciones se colectaron y analizaron en un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. C; lisado cargado en la columna; FT; *flow-through*; F1-F5, fracciones de purificación; MP, marcador de peso molecular. Peso molecular ORF2 ~ 78 KDa .

Esto es particularmente importante si consideramos la posibilidad de continuar evaluando estos antígenos del Genotipo 3 de HEV como herramienta para el desarrollo de sistemas o kits de detección para ser empleado en zonas no endémicas.

Llamativamente, ambas proteínas se expresaron únicamente en forma monomérica, con tamaños esperados de ~78 y ~17 Kda para ORF2 y 3, respectivamente.

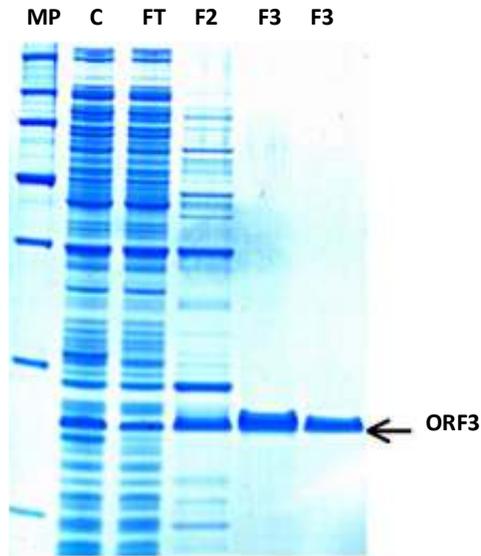


Figura 4.7. Purificación de ORF3 expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión. Las proteínas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una matriz de níquel-agarosa y las distintas fracciones se colectaron y analizaron en un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. C, lisado cargado en la columna; FT; *flow-through*; F2 y F3, fracciones de purificación; MP, marcador de peso molecular. Peso molecular de ORF3 ~ 17 kDa.

La cuantificación de los lotes de proteínas purificadas se realizó por HPLC en el equipo AKTA Purifier (GE Pharmacia, Alemania), a través de una curva de estandarización disponible en el laboratorio del ICGEB y por absorbancia a 280 nm. En todos los casos se observaron resultados consistentes y reproducibles, obteniendo en un rango de 0,5-1mg/mL de proteína (5-10mg totales) para ambos antígenos.

Por otra parte, claramente ORF2 presentó todos los epítomos inmunoreactivos, lo que fue comprobado por Western blot con (i) un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cola de Histidina (*His-tag*) empleada para la purificación, (ii) antisuero de conejo contra un polipéptido ORF2A recombinante expresada en *E. coli*, y (iii) suero del paciente infectado con HEV a partir del cual se amplificó ORF2 y 3 para clonar. En el caso de ORF3, la presencia de los epítomos se confirmó con un anticuerpo anti *His-tag* y el suero del paciente infectado con HEV (Fig. 4.8.).

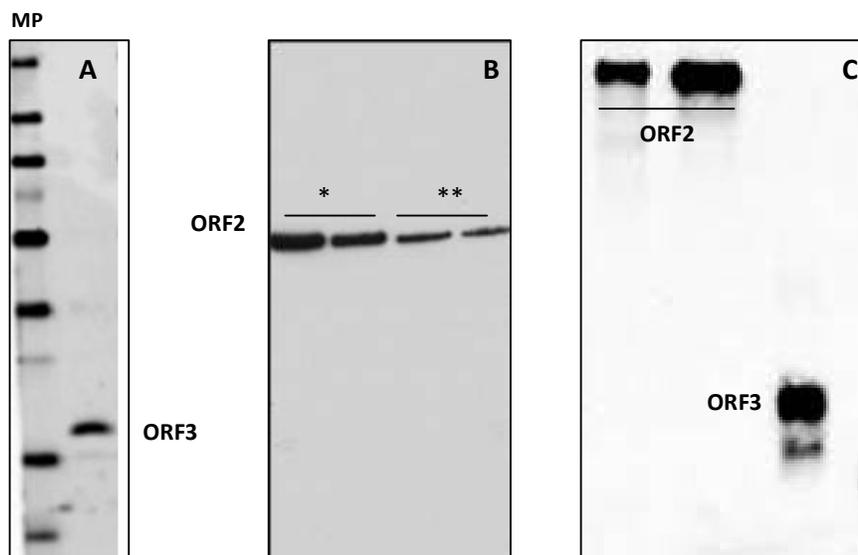


Figura 4.8. Western blot de las proteínas ORF2 y 3 purificadas por cromatografía de afinidad en una matriz de níquel-agarosa. Se cargaron ~ 5ug de proteína por carril. **A.** ORF3 se incubó con un suero de paciente con hepatitis aguda detectado en Uruguay con serología positiva para HEV. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-IgG humano conjugado con peroxidasa. **B.** ORF2 incubado con anticuerpo monoclonal anti-ORF2 conjugado con peroxidasa (*) y el mismo suero utilizado para ORF3 (**). **C.** ORF2 y 3 incubados con un anticuerpo anti-His-tag. MP, marcador de peso molecular. Peso molecular: ORF2~ 78KDa, ORF3 ~ 17 KDa.

Los resultados aquí mostrados, así como las metodologías implementadas, tienen múltiples ramificaciones prácticas en el desarrollo de técnicas *in house* de detección serológica para la identificación de HEV, sobre todo en países donde la gran variabilidad de los kits comerciales disponibles tiene mayor impacto.

Claramente, de aquí en más es necesario comenzar a evaluar la sensibilidad de estos antígenos del Genotipo 3 para su uso como herramienta de detección, así como su especificidad y su performance con anticuerpos específicos de los otros genotipos de HEV, y de otros virus hepatotrópicos. Paralelamente, deberá evaluarse cuál de las dos proteínas es más adecuada para el desarrollo de estos sistemas de detección en función, entre otras cosas, de la duración o vida media

de los anticuerpos específicos para cada una y la región (endémica o no), donde la metodología vaya a aplicarse.

Referencias

1. Purdy, M., Tam, A., Huang, C., Yarbough, P., Reyes, G., 1993. Hepatitis E virus: a nonenveloped member of the 'alpha-like' RNA virus supergroup. *Semin. Virol.* 4; 319–326.
2. Jameel, S., Zafrullah, M., Ozdener, M.H., Panda, S.K., 1996. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J. Virol.* 70; 207–216.
3. Li, T.C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., Wang, J.C., Engvall, H., Hammar, L., Xing, L., Cheng, R.H., 2005. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 79; 12999–13006.
4. Xing, L., Kato, K., Li, T., Takeda, N., Miyamura, T., Hammar, L., Cheng, R.H., 1999. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* 265; 35–45.
5. Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N., Cheng, R.H., Yoshimura, M., Unno, H., Shima, R., Moriishi, K., Tsukihara, T., Li, T.C., et al., 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106; 12986–12991.
6. Guu, T.S., Liu, Z., Ye, Q., Mata, D.A., Li, K., Yin, C., Zhang, J., Tao, Y.J., 2009. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106; 12992–12997.
7. Zhang, J.Z., Ng, M.H., Xia, N.S., Lau, S.H., Che, X.Y., Chau, T.N., Lai, S.T., Im, S.W., 2001a. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein. *J. Med. Virol.* 64; 125–132.
8. Zhang, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2001b. Identification of the 5' terminal sequence of the SAR-55 and MEX-14 strains of hepatitis E virus and confirmation that the genome is capped. *J. Med. Virol.* 65; 293–295.
9. Li, S.W., Zhang, J., Li, Y.M., Ou, S.H., Huang, G.Y., He, Z.Q., Ge, S.X., Xian, Y.L., Pang, S.Q., Ng, M.H., et al., 2005a. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine* 23, 2893–2901.
10. Ahmad, I., Holla, R.P., Jameel, S. 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* 161;47–58.
11. Li, S., Tang, X., Seetharaman, J., Yang, C., Gu, Y., Zhang, J., Du, H., Shih, J.W., Hew, C.L., Sivaraman, J., et al., 2009. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus–host interaction. *PLoS Pathog.* 5, e1000537.

12. Schofield, D.J., Glamann, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2000. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J. Virol.* 74; 5548–5555.
13. Meng, J., Dai, X., Chang, J.C., Lopareva, E., Pillot, J., Fields, H.A., Khudyakov, Y.E., 2001. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 288; 203–211.
14. Zhou, Y.H., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2004. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine* 22; 2578–2585.
15. Xing, L., Wang, J.C., Li, T.C., Yasutomi, Y., Lara, J., Khudyakov, Y., Schofield, D., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Takeda, N., Miyamura, T., Cheng, R.H., 2011. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* 85; 1117–1124.
16. Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., Emerson, S.U., 2006. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 80; 5919–5926.
17. Emerson, S.U., Nguyen, H., Torian, U., Purcell, R.H., 2006. ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J. Virol.* 80, 10457–10464.
18. Graff, J., Nguyen, H., Yu, C., Elkins, W.R., St. Claire, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2005. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J. Virol.* 79; 6680–6689.
19. Panda, S.K., Nanda, S.K., Zafrullah, M., Ansari, I.H., Ozdener, M.H., Jameel, S., 1995. An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in sera from individuals from an area of high-level HEV endemicity. *J. Clin. Microbiol.* 33; 2653–2659.
20. Lal, S.K., Tulasiram, P., Jameel, S., 1997. Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Gene* 190; 63–67.
21. Zafrullah, M., Ozdener, M.H., Panda, S.K., Jameel, S., 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J. Virol.* 71; 9045–9053.
22. Panda, S.K., Ansari, I.H., Durgapal, H., Agrawal, S., Jameel, S., 2000. The in vitro synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J. Virol.* 74; 2430–2437.

II. ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN DE ORF3 EN LÍNEA CELULAR A549 Y HEPATOCITOS PRIMARIOS DE RATA

El ciclo viral de HEV no está muy bien comprendido, y la información acerca de la interacción virus-célula, incluyendo receptores, modo de ingreso y cascadas involucradas en la facilitación de la replicación viral, es muy escasa. Una de las proteínas menos estudiadas de este virus es la fosfoproteína codificada por el ORF3. Anteriormente, hemos revisado algunas características biológicas y fisicoquímicas de ORF3, junto con algunas de sus funciones propuestas más importantes.

Algunos estudios más recientes sugieren un papel fundamental de la proteína ORF3 en el egreso del virus de la célula y su asociación con los viriones. De hecho, un mutante del clon de ADNc infeccioso pJE03-1760F con una ORF3 deficiente se demostró que replica eficientemente en las células PLC/PRF/5 y A549, pero en comparación con la cepa *wild type* produjo menos del 1% de virus detectable en el sobrenadante del cultivo¹. A su vez, en ese mismo trabajo se evidenció que la proteína ORF3 es detectada en la superficie de las células infectadas por HEV, y que en el caso de la población mutante la densidad de esta proteína era mucho mayor a nivel de la membrana. Estas observaciones indican que la proteína ORF3 es importante para la salida de HEV y que está presente en la superficie del virión, posiblemente en asociación con los lípidos.

Se sabe que el HEV se localiza en el citoplasma y particularmente en retículo endoplasmático, siendo a través del aparato trans-Golgi donde obtiene la membrana lipídica a partir del cual egresa de la célula en la forma de cuerpo multivesiculares^{2,3}. Sin embargo, el papel de ORF3 en el direccionamiento de esta localización y la cascada de efectos posteriores aún no se han explorado de manera amplia. En general, los estudios referidos a la función de ORF3 han estado enfocados en dilucidar los mecanismos de interacción con factores y proteínas celulares, y su rol en la patogenia viral⁴. Entre ellos, la asociación de ORF3 con NF- κ B, un mediador esencial de la mayoría de las enfermedades infecciosas, ha sido la línea de investigación más profusamente estudiada, pero aún no se dispone de evidencia suficientemente clara sobre la participación de

ORF3 en la vía de señalización de este factor, fundamentalmente debido a la falta de un modelo *in vitro* establecido^{5,6}.

Resulta necesario implementar estudios tendientes a ampliar y mejorar el conocimiento de la función y localización de ORF3 en los sistemas de replicación disponibles actualmente, junto con la búsqueda de nuevos sustratos susceptibles a la infección viral.

En este sentido, en este trabajo nos propusimos implementar una metodología para estudiar la localización de ORF3 de HEV Genotipo 3 mediante la utilización de una proteína reportera (*Green Fluorescent Protein*, GFP) en dos sistemas de cultivos celulares; la línea celular A549, empleada en esta Tesis para propagar el HEV, y un cultivo de hepatocitos primarios de rata neonata (*Rattus rattus*). Estudios previos han sido llevados a cabo con este mismo objetivo pero en otros sistemas y con cepas del Genotipo 1 que, como hemos descrito en el **Capítulo 1** presentan características biológicas distintivas.

Materiales y Métodos

ORF3 y Plásmidos

El gen correspondiente al ORF3 completo fue escindido del plásmido pRSETB descrito más arriba en este **Capítulo** que había sido construido amplificando el gen de una cepa de HEV Genotipo 3 aislado de un paciente con hepatitis E aguda detectado en Uruguay. El plásmido fue tratado con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* (Fermentas Thermo Scientific, Estados Unidos). El gen escindido fue clonado en el vector de expresión eucariota pEGFP-C3 (Clontech, Estados Unidos) utilizando los mismos sitios de restricción y con la ligasa T4 (Fermentas Thermo Scientific, Estados Unidos). Siguiendo las especificaciones del fabricante. De esta manera se generó una proteína de fusión GFP-ORF3. Los clones fueron confirmados por secuenciación y digestión con las enzimas de restricción empleadas en el clonado.

Células y transfección de plásmidos

Para implementar este estudio se utilizaron células A549 que fueron propagadas en medio de Dulbecco-Eagle F12 (DMEM F12) (Invitrogen, Life Technologies,

Estados Unidos), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), 100 ug/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 3 ug/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (medio de mantenimiento), a 37 ° C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂.

Además, se utilizaron hepatocitos primarios de rata neonata obtenidas como se describe en el **Capítulo 3**, que fueron propagados en un medio de cultivo de crecimiento de hepatocitos (MCCH) e incubados a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. El MHCC se preparó en base a DMEM F12 (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), 15% SFB (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), 100 ug/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 3 ug/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 10 mg/mL insulina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

El protocolo de transfección fue similar para ambos tipos de células. El día previo a la transfección, fueron sembradas placas de 6 wells y se dejaron crecer a 37° C, 5% de CO₂ con el medio de crecimiento habitual, pero libre de antibióticos. Para transfectar las células se utilizó el reactivo Lipofectamine® LTX with PLUS™ (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En cada caso fueron transfectados 5ug de ADN, utilizando una relación 1:3 y 1:5 con el reactivo transfectante para A549 y los hepatocitos primarios, respectivamente. A las 48 horas, las células A549 fueron fijadas con metanol frío durante 5 min y posteriormente lavadas 3 veces con PBS. Por su parte, los hepatocitos primarios fueron fijados en paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 min y lavados luego con PBS en tres oportunidades. Las células fijadas fueron incubadas con 0.2ug/mL de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcador de núcleos. Posteriormente, los cultivos fueron examinados bajo microscopia de fluorescencia Nikon *Eclipse 80 i*.

Resultados y Discusión

El fragmento escindido del plásmido pRSETB conteniendo el gen completo que codifica para el ORF3 fue satisfactoriamente clonado en el plásmido pEGFP-C3, obteniéndose el vector de expresión pEGFP03-C3. Esto fue confirmado por

secuenciación con primers específicos del plásmido (Clontech, Estados Unidos) y por tratamiento con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* (Fig. 4.9).

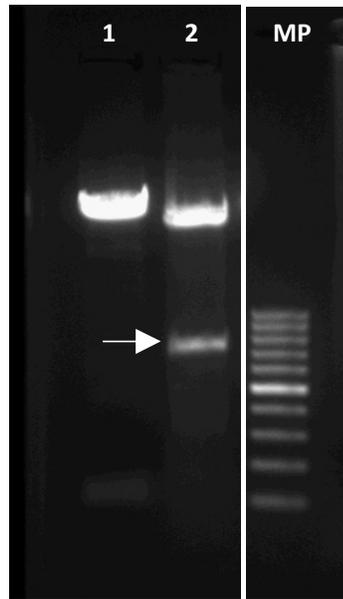


Figura 4.9. Clonado de ORF3 en el plásmido pEGFP-C3 para generar el vector pEGFPO3-C3 (1). Se muestra la electroforesis en gel de agarosa de la digestión enzimática del vector de expresión con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* con el fragmento de 800 pb que incluye el gen completo ORF3 (flecha) (2). MP: marcador de peso molecular 100 pb GeneRuler (ThermoScientific, Estados Unidos).

La transfección de los plásmidos pEGFPO3-C3 y el control pEGFP-C3 tanto en A549 como en los hepatocitos primarios mostró dos patrones de localización muy distintos de la proteína de fusión y GFP, respectivamente (Fig. 4.10 y 4.11). En el primer caso, la proteína se acumuló en estructuras tipo vesiculares ubicadas fundamentalmente en zonas perinucleares, mientras que en el caso de GFP la distribución fue homogénea por toda la célula, no encontrándose acúmulos. Este tipo de patrón que presentó localización de la proteína de fusión debido a la expresión de ORF3 ha sido descrito previamente con otras construcciones en otras líneas celulares y con cepas del Genotipo 1⁷. Sin embargo, hasta el momento no había sido reportado en cultivos de hepatocitos primarios, en este caso, de rata neonata, así como tampoco se había descrito con cepas del Genotipo 3. En hepatocitos primarios de rata además, es donde el patrón de localización de ORF3 es más evidente, con grandes acúmulos

claramente visibles (Fig. 4.11 A). La razón y las implicancias de esta observación son desconocidas y nuevos estudios son necesarios en sistemas in vitro con hepatocitos de otras especies , incluyendo humanos.

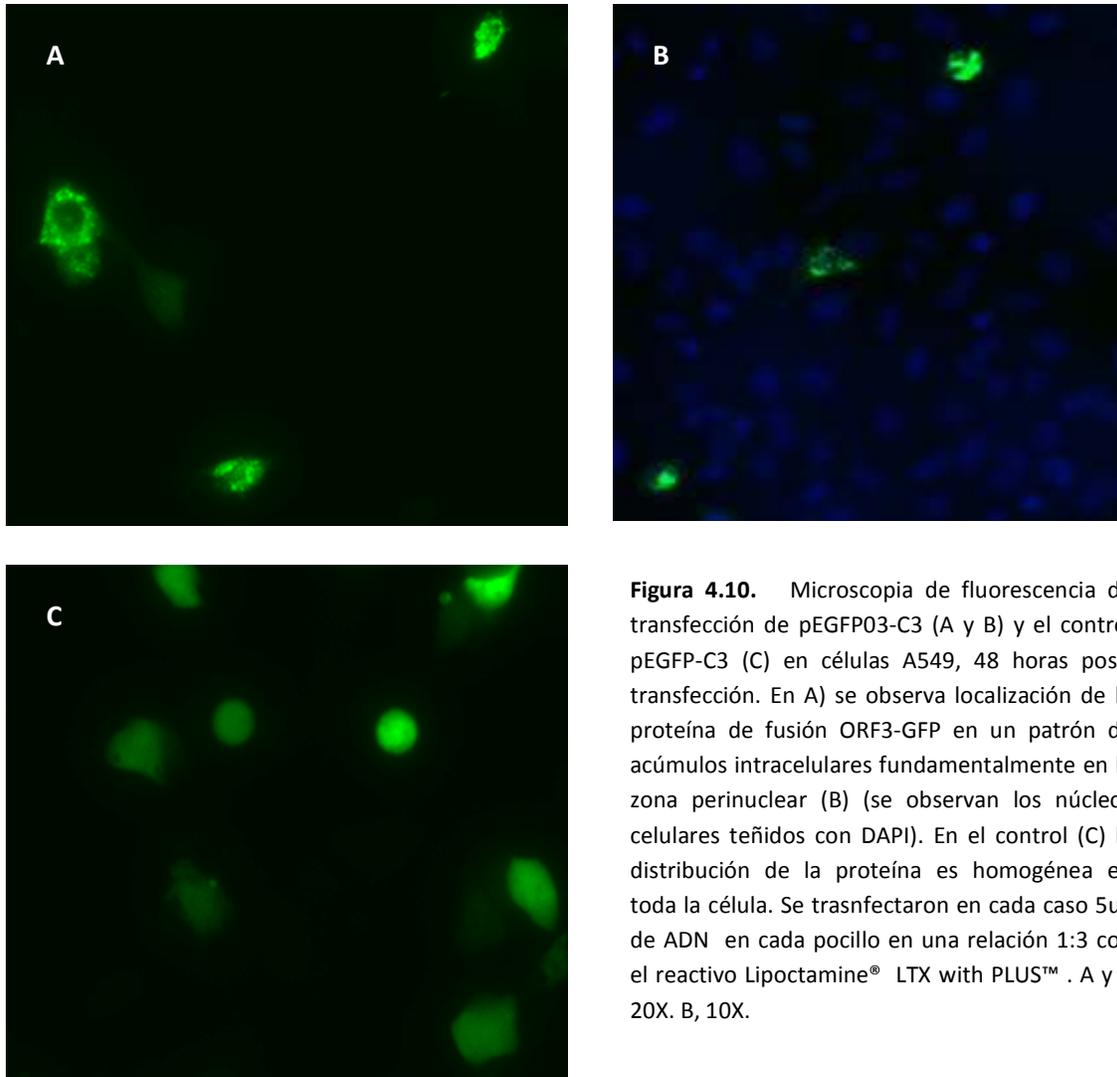


Figura 4.10. Microscopia de fluorescencia de transfección de pEGFP03-C3 (A y B) y el control pEGFP-C3 (C) en células A549, 48 horas post-transfección. En A) se observa localización de la proteína de fusión ORF3-GFP en un patrón de acúmulos intracelulares fundamentalmente en la zona perinuclear (B) (se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI). En el control (C) la distribución de la proteína es homogénea en toda la célula. Se transfectaron en cada caso 5ug de ADN en cada pocillo en una relación 1:3 con el reactivo Lipoctamine® LTX with PLUS™ . A y C 20X. B, 10X.

La identificación de potenciales proteínas celulares implicadas en la cascada de NF- κ B que puedan asociarse con ORF3 durante el ciclo viral e inhibir esta vía de señalización inducida por TNF α^8 , permiten inferir que esta proteína viral debería tener una localización nuclear o perinuclear, como se observa en este estudio, de manera de facilitar las interacciones.

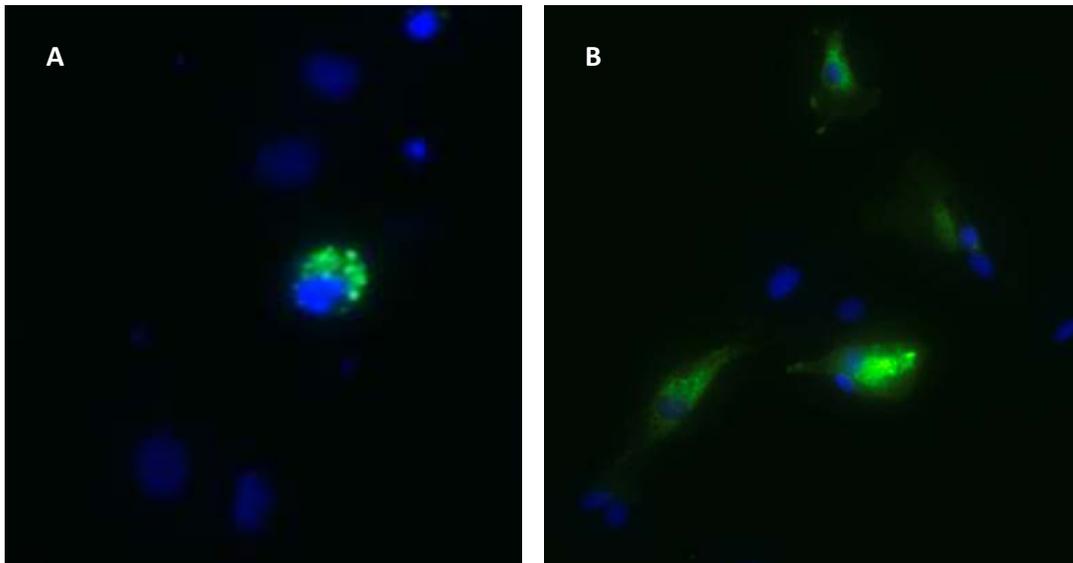


Figura 4.11. Microscopia de fluorescencia de transfección de pEGFP03-C3 (A) y el control pEGFP-C3 (B) en hepatocitos primarios de rata, 48 horas post-transfección. En A) se observa localización de la proteína de fusión ORF3-GFP en un patrón de acúmulos intracelulares exclusivamente en la zona perinuclear (se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI). En el control (B) la distribución de la proteína es homogénea en toda la célula. Se transfectaron en cada caso 5ug de ADN en cada pocillo en una relación 1:5 con el reactivo Lipoctamine® LTX with PLUS™ . A, 20X. B, 10X.

Asimismo, los recientes avances en la comprensión de la estructura y función de la proteína codificada por el ORF3 viral, y su probable rol en rol en la patogenia viral y egreso de la partículas virales influyendo en la dispersión de la infección en el tejido infectado^{8,9}, hacen que el tipo de estudios aquí implementados resulten fundamentales con el objetivo de avanzar en la identificación de los factores y proteínas específicas celulares con las cuales ORF3 interactúa.

Sin embargo, esta primera aproximación al estudio de la ORF3 del Genotipo 3 de HEV aquí expuesta es preliminar y deberá ser profundizada con nuevas investigaciones tendientes a identificar por métodos de co-localización y co-precipitación las proteínas y vías de señalización celulares involucradas en la función de esta proteína viral.

Referencias

1. Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y. Et al., 2009. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol.* 90(Pt 8);1880-1891.
2. Rehman, S., Kapur, N., Durgapal, H., Panda, S.K. Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* 370; 77–92.
3. Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, S., et al., 2014. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch. Virol.* 159(5);979-91.
4. Holla, R.P., Ahmad, I., Ahmad, Z., Jameel, S. 2013. Molecular virology of hepatitis E virus. *Sem. Liver. Dis.* 33(1); 3-14.
5. Aggarwal, B.B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat .Rev. Immunol* 3: 745–756.
6. Xu, J., Wu, F., Tian, D., Wang, J., Zheng, Z., Xia, N. 2014. Open reading frame 3 of genotype 1 hepatitis E virus inhibits nuclear factor-kappa B signaling induced by tumor necrosis factor- α in human A549 lung epithelial cells. *PLoS One* 9(6):e100787.
7. Jameel, S., Zafrullah, M., Ozdener, M.H., Panda, S.K. 1996. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol.* 70(1); 207-16.
8. Nan, Y., Ma, Z., Wang, R., Yu, Y., Kannan, H., Fredericksen, B., Zhang, Y.J. 2014. Enhancement of interferon induction by ORF3 product of hepatitis E virus. *J. Virol.* 88(15); 8696-8705
9. Nagashima, S., Jirintai, S., Takahashi, M., et al., 2014. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *Arch. Virol.* 159(5); 979-91

III. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE UN SISTEMA DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS DE HEV BASADO EN LA PROTEÍNA Z DEL VIRUS JUNÍN

Los estudios inmunológicos y estructurales en la proteína ORF2 anteriormente descritos han proporcionado una base para el desarrollo de vacunas contra HEV. Recientemente, dos vacunas recombinantes contra el virus se han sometido a pruebas clínicas con éxito en los seres humanos^{1,2}. Ambas se basan en proteínas ORF2 recombinantes del Genotipo 1 ya sea expresada como partículas p239 en *E. coli* o como VLP T=1 en células de insecto con el sistema de expresión de *Baculovirus*.

Este último desarrollo ha sido sometido a estudios de seguridad y eficacia en seres humanos. En la fase I de los ensayos clínicos, esta proteína recombinante fue administrada en una formulación con adyuvante de aluminio e indujo la producción de anticuerpos anti-HEV en voluntarios sanos de una manera dosis-dependiente³. En las fases posteriores II y III, cerca de 2000 voluntarios del Ejército nepalí que carecían de anticuerpos anti-HEV detectables recibieron 20 mg de proteína recombinante con adyuvante de aluminio o un placebo en el caso del grupo control. Cada tratamiento se administró en tres dosis (0, 1 y 6 meses) y los voluntarios fueron seguidos durante más de 2 años¹. La manifestación clínica de hepatitis aguda E ocurrió con menos frecuencia entre los receptores de la vacuna que completaron el programa de tres dosis que entre los que recibieron placebo, con una tasa de eficacia de la vacuna de 95%. Se observó una tasa de eficacia inferior de 86% después de la administración de dos dosis de la vacuna. Sin embargo, es claro que se necesitan más estudios sobre la seguridad de esta vacuna en mujeres embarazadas, niños y algunos otros grupos, como las personas con enfermedad hepática crónica.

Asimismo, el estudio se centró fundamentalmente en las tasas de incidencia de enfermedad clínica y no en las tasa de infección de HEV. Por tanto, no queda claro si el uso de la vacuna efectivamente reducirá las tasas de transmisión del virus en la población. Por otro lado, se constató además que al final del seguimiento de los voluntarios, los títulos de anti-HEV habían disminuido

significativamente y prácticamente la mitad de ellos presentaban títulos de anticuerpos por debajo del nivel considerado protector.

Por lo tanto, es clara la necesidad de nuevos estudios para determinar la duración y el nivel de protección que ofrece esta vacuna que, desafortunadamente, aún no ha sido liberada al mercado farmacéutico. Además, cuando así ocurra, en las regiones endémicas, donde la vacuna es probable que sea más útil, los altos costos de producción probablemente impedirán la distribución generalizada.

En forma paralela, un grupo chino ha desarrollado recientemente otra vacuna contra la infección por HEV, denominada HEV 239, conteniendo una proteína truncada de la cápside viral que comprende los aa 376-606 expresada en *E. coli*⁴. En un estudio implementado en humanos, todos los voluntarios incluidos que a su vez carecían de anticuerpos anti-HEV seroconvirtieron 1 mes después de recibir tres dosis (20 mg cada uno a los 0, 1 y 6 meses, respectivamente)⁵. Luego de la segunda dosis, las nuevas infecciones por HEV fueron menos frecuentes en el grupo que recibió la vacuna que en los sujetos del grupo control, lo que sugiere que la vacuna tiene un efecto protector. Un ensayo de fase III está actualmente en curso.

El rol exacto de las vacunas en la disminución de la incidencia de HEV sigue siendo poco clara. Claramente en regiones no endémicas, una vacuna sería de enorme utilidad para los habitantes que planifican y realizan viajes a una zona endémica para HEV, mientras que en las zonas endémicas su utilidad radica en la aplicación en las mujeres embarazadas y las personas con enfermedad hepática crónica preexistente donde la probabilidad de desarrollar una enfermedad grave después de la infección por HEV aumenta.

Estudios más profundos se requieren para dilucidar la real utilidad de las vacunas contra HEV y muchos factores, tales como el costo, la duración de la protección conferida, y su capacidad para interrumpir la transmisión de la infección, deben ser tenidos en cuenta al momento de decidir su aplicación en la población general.

Asimismo, y en vista de los resultados descritos para ambas vacunas en fase de estudios clínicos se debe comenzar el desarrollo de nuevas estrategias que

permitan, por un lado, alcanzar mejores niveles de protección y sostenidos a lo largo del tiempo y, por otro, que incluyan los Genotipos 3 y 4, responsables de los casos autóctonos esporádicos en todo el mundo, y con el mayor potencial zoonótico.

Esta sección de la Tesis está enfocada en la descripción y análisis de la implementación de un sistema descrito por Borio et al⁶. para la expresión de antígenos, en este caso de HEV, utilizando como base la proteína Z del virus Junín (familia *Arenaviridae*). La proteína Z de los miembros del género *Arenavirus* es considerada la proteína de la matriz de estos virus⁷. Está compuesta de tres principales regiones que contienen diferentes dominios: el extremo amino (dominio de Miristoilación), el Core y el carboxilo terminal (dominio tardío)⁸. Entre las diversas funciones descritas para esta pequeña proteína de 11 kDa se destacan su efecto inhibitorio sobre la replicación del ARN viral y la transcripción a través de su interacción con la proteína L (polimerasa)^{9,10}.

Una de las funciones más interesantes de Z es su rol al final del ciclo de infección, donde se la reconoce como la fuerza impulsora de brotación de los *Arenavirus*¹¹. Previamente se ha reportado, de hecho, que la expresión de la proteína Z por sí sola es suficiente para inducir la liberación de partículas conteniendo Z con envoltura de origen celular en el virus de la fiebre de Lassa^{11,12}, Tacaribe y Junín^{13,14}.

Así, esta capacidad de inducir la brotación y formación de vesículas puede ser explotada para generar VLP envueltas. Estas estructuras VLP eventualmente podrían ser diseñados para portar consigo epítopos de células T o B reconocidos linfocitos T y B maduros de la respuesta inmune adaptativa¹⁵.

Este trabajo pretende utilizar este sistema para expresar el ORF2 de HEV en células eucariotas y analizar la formación de VLP que eventualmente podrá ser utilizado para futuros desarrollos de vacunas para la prevención de la infección por HEV.

Materiales y Métodos

Virus y plásmidos

El gen completo ORF2 que codifica para la cápside de HEV fue amplificado por RT-PCR a partir de una muestra de suero de un paciente infectado con HEV Genotipo 3 utilizando los primers 5051(+), 5136(+) y 7155(-) descritos al principio de este mismo **Capítulo** (Tabla 4.1.) pero modificados esto dos últimos para incluir un sitio de restricción *BamHI* y *NotI*, respectivamente. El fragmento obtenido fue clonado en un vector pJET™ (Fermentas, ThermoScientific, Estados Unidos) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La correcta inserción del fragmento fue verificada por escisión utilizando las correspondientes enzimas de restricción y por secuenciación (Macrogen Inc, Corea del Sur).

El vector de expresión eucariota conteniendo el gen completo Z generado utilizando el plásmido pEGFP-N3 (Clontech, Estados Unidos) como base, que expresa la proteína GFP (*Green fluorescent protein*, en inglés), fue cedido por la Dra. Cristina Borio, del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes (Buenos Aires Argentina). Este plásmido, pEGFPZ-N3 (Fig. 4.12.), genera una proteína de fusión compuesta por Z y GFP dado que ambos genes están en marco continuo de lectura, permitiendo evaluar el proceso de brotación Z a través de la detección de GFP en un microscopio de fluorescencia. Como control se nos fue cedido un plásmido diseñado sobre pEGFP-N3 pero conteniendo únicamente el gen Z con su correspondiente codón *stop* y sin GFP (pZ-N3).

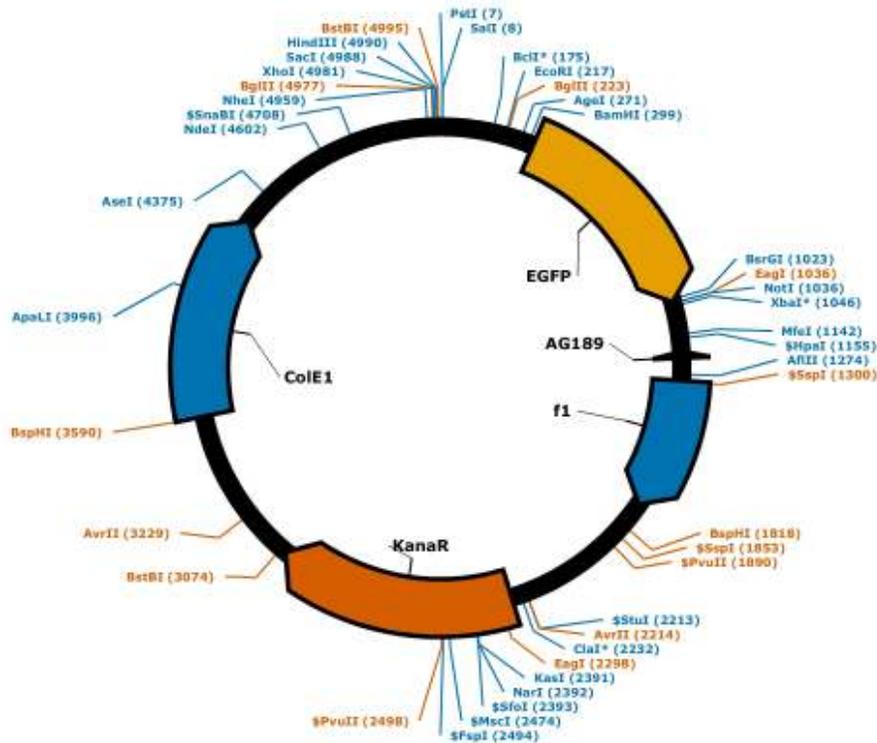


Figura 4.12. Mapa del plásmido que codifica la proteína Z del virus Junín en marco de lectura con la proteína verde fluorescente (EGFP, *green fluorescent protein*). La construcción fue realizada en base al plásmido pEGFP-N3 (Clontech, Estados Unidos). El gen completo que codifica para la proteína Z se ubica entre las bases 16 y 293. Para clonar el gen ORF2 de HEV en lugar de GFP, ésta región codificante fue escindida con las enzimas *BamHI* y *NotI*.

Para realizar la construcción del vector con el antígeno codificado por el ORF2 de HEV, GFP fue escindido de pEGFPZ-N3 utilizando las enzimas *BamHI* y *NotI* (Fermentas, ThermoScientific, Estados Unidos). En el caso de ORF2, fue escindido de pJET™ con las mismas enzimas. Luego ORF2 fue clonado en el vector pEGFPZ-N3 sin GFP utilizando la ligasa T4 de acuerdo a especificaciones del fabricante (Fermentas, ThermoScientific, Estados Unidos). La correcta inserción del inserto fue verificada por restricción con *BamHI* y *NotI* y PCR y secuenciación.

El nuevo vector pZORF2-N3 fue transformado en células *E.coli* DH5α y colonias resistentes a kanamicina fueron seleccionadas. Cada colonia resistente fue sometida a una PCR para amplificar el gen ORF2, como se describe a

continuación. Una porción de la colonia fue resuspendida en 25 uL de agua deionizada estéril y hervida a 95°C durante 10 min y luego de una breve centrifugación, 2 uL del sobrenadante fue utilizado para la PCR. Las condiciones de este ensayo para amplificar la ORF2 completa utilizando los primers 5136 y 7155 se describen en la tabla 4.1. Luego, los clones con resultado de PCR positivo fueron digeridos con las enzimas *BamHI* y *NotI* para verificar la presencia del inserto. Los plásmidos para ser transfectados en las células eucariotas fueron extraídos a partir de 250 mL de cultivo utilizando el Kit NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, Germany) y cuantificados por espectrofotometría a 260 nm.

Transfección en células 293T y CHOK1

Las células 293T (ATCC CRL-1573) y CHOK1 (ATCC CCL-61) fueron propagadas en medio de Dulbecco-Eagle F12 (DMEM F12) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), 100 ug/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 3 ug/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (medio de mantenimiento), a 37 ° C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂.

El día previo a la transfección, las células fueron sembradas en frascos de 75cm². La transfección de los plásmidos fue realizada utilizando el reactivo Lipoctamine® LTX with PLUS™ (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En cada caso fueron transfectados 18ug de ADN, utilizando una relación 1:2 y 1:3 con el reactivo transfectante.

A las 48 post-transfección el sobrenadante conteniendo las VLP de las células transfectadas con pZORF2-N3 y pZ-N3 fue cosechado y las células transfectadas con pZEGFP-N3 fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia con el objetivo de evaluar la eficiencia de la transfección. Como control de la formación de VLP fue transfectado el vector pEGFP-N3 sin el gen Z.

Purificación de VLP

La purificación de las VLP a partir del sobrenadante de las células transfectadas se realizó exactamente como describe Borio et al⁶. Brevemente, en primer lugar se sedimentaron los restos celulares por centrifugación a baja velocidad (5000RPM) a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente a la clarificación, las VLPs presentes en el sobrenadante fueron sedimentadas en un colchón de sacarosa al 30% (w/v) a 96.000 RPM durante 2 horas a 4 ° C. Los pellet se resuspendieron en PBS y se almacenaron a 4 °C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS- PAGE), Western Blot y Dot Blot.

Las VLP fueron separados en un PAGE al 12% (12 x 15 cm y un grosor de 1,5 mm) con SDS. El gel *stacking* estaba compuesto por 0.5mL acrilamida-bisacrilamida 30%, 0.06M Tris pH6.8, 0.1% SDS, 0.1% persulfato de amonio (APS) y 0.001% TEMED. Por su parte el gel *running* contenía 4 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%, 0.37M Tris pH8.8, 0.1% SDS, 0.01% APS y 0.001% TEMED. Los reactivos para la realización de ambos geles eran de Applichem, Estados Unidos.

Una vez finalizada la electroforesis de 3 horas de duración, las VLP se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante procedimientos estándar. La membrana fue bloqueada con 5% de leche sin grasa en PBS (pH 7.2) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Después de un lavado con buffer de lavado (PBS, 0.05% Tween 20), se incubó con un anticuerpo anti-Z (cedido por Dra. Crisitina Borio, Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires, Argentina). Después de 2 horas de incubación con agitación a temperatura ambiente, las membranas se lavaron tres veces durante 5 min cada uno de los lavados con buffer de lavado. Posteriormente se prosiguió a la incubación de las VLP on una dilución 1: 2000 (en buffer de lavado) de anti-IgG de conejo. En el caso de las VLP formadas por ZORF2 se realizó un Dot Blot transfiriendo 5uL a una membrana de nitrocelulosa que luego fue incubada con un anti-ORF2 (AbCam, Estados Unidos) que reconoce epítopes conformacionales. El anticuerpo secundario empleado fue un anti-IgG de ratón conjugado con

fosfatasa alcalina. (AbCam, Estados Unidos). Como control se les realizó un Dot Blot a las VLP generadas con el vector pZ-N3.

Para el revelado se utilizó una solución 1:9 (vol:vol) de nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (NBT/BCIP) (Invitrogen, Life technologies, Estados Unidos).

Visualización de las VLP microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una gota de la suspensión de las VLP purificadas se depositó sobre una rejilla de níquel recubierta de Formvar-carbono durante 1 min. Luego las muestras se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico 2% y se examinaron con la asistencia del personal del servicio de microscopía de la Facultad de Ciencias, UdelaR.

Resultados y Discusión

El gen ORF2 que codifica para la proteína Cap de HEV pudo ser correctamente amplificado y clonado en el vector pJET en primera instancia y luego en el plásmido conteniendo el gen Z, generando así el vector de expresión pZORF2-N3 (Fig.4.13.)

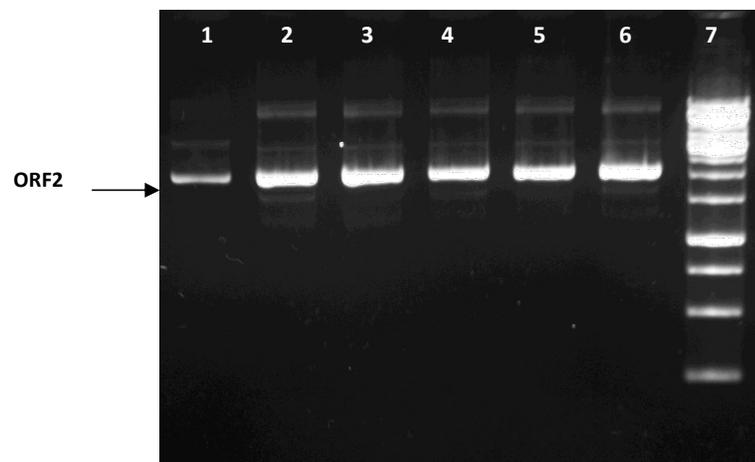


Figura 4.13. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de amplicones de 2200 pb correspondientes al ORF2 de HEV, de la PCR realizada a 6 clones (carriles 1-6) del vector pZORF2-N3. 7: marcador de peso molecular de 1000pb GeneRuler (ThermoScientific, Estados Unidos).

Por su parte, la transfección en células 293T y CHOK1 fue exitosa en ambas condiciones (1:2 y 1:3, ug de ADN:uL de Lipoctamine® LTX with PLUS™), según se desprende del análisis bajo microscopía de fluorescencia de las células transfectadas con el vector control pZEGFP-N3 en la cual se observa abundante expresión de la proteína GFP en un patrón fundamentalmente observado a nivel de membrana y acúmulos intracelulares (Fig. 4.14.) Este tipo de expresión fue la esperada para el vector empleado, debido a la brotación de Z una vez expresada en la células⁶.

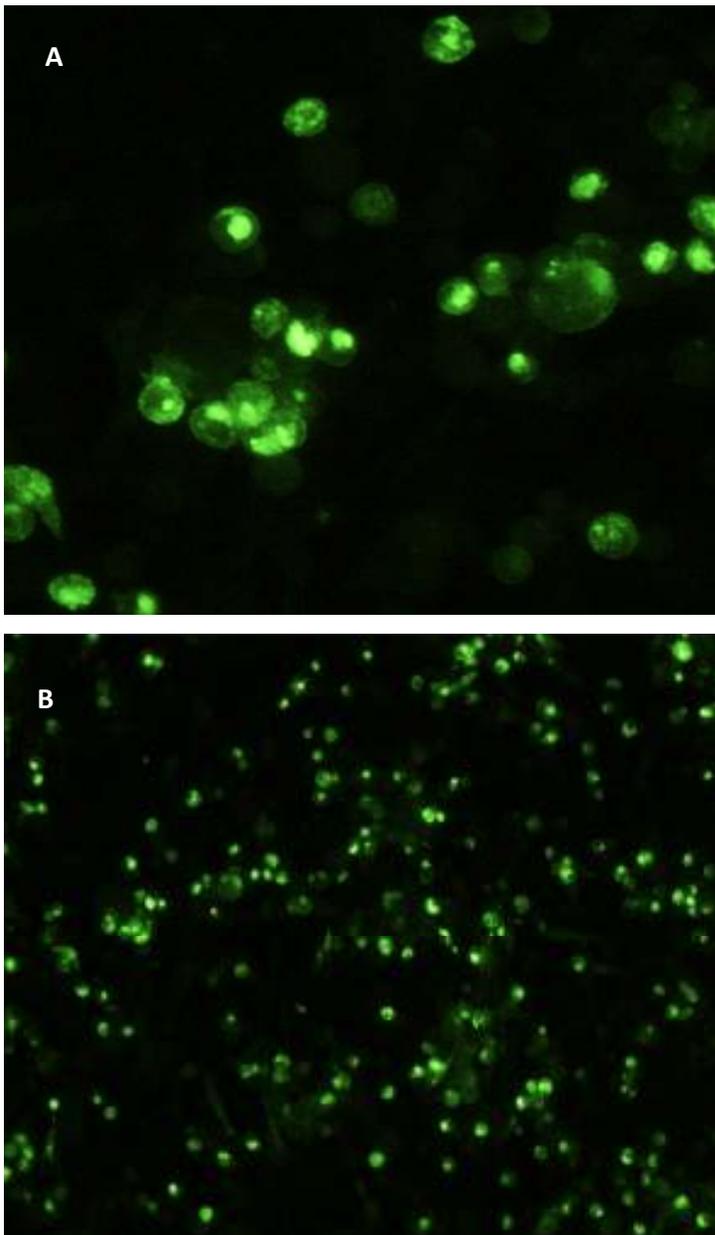


Figura 4.14. Microscopía de fluorescencia de transfección de pZEGFP-N3 en células 293T (A) y CHOK1 (B), 48 horas post-transfección. Se observa presencia de GFP fundamentalmente a nivel de membrana celular y acúmulos intracelulares. Se transfectaron en cada caso 18ug de ADN en frascos de cultivo de 75cm² en una relación 1:3 con el reactivo Lipoctamine® LTX with PLUS™ A: 40X; B:10X.

Una vez confirmada la expresión en el vector control de la proteína fusionada, se procedió a la purificación de las VLP del sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido pZORF2-N3, pZ-N3 y el control pEGFP-N3. El proceso de purificación de las VLP fue llevado a cabo correctamente pudiéndose observar en la microscopía de transmisión de electrones partículas con un diámetro variable de entre 70 y 150 nm (Fig. 4.15.). Este tipo de partículas no fueron observadas en el control de transfección (pEGFP-N3). Tanto la forma como el tamaño de las VLP observadas en los sobrenadantes de los cultivos transfectados con pZORF2-N3 y pZ-N3 estuvieron acordes a lo reportado en este sistema⁶

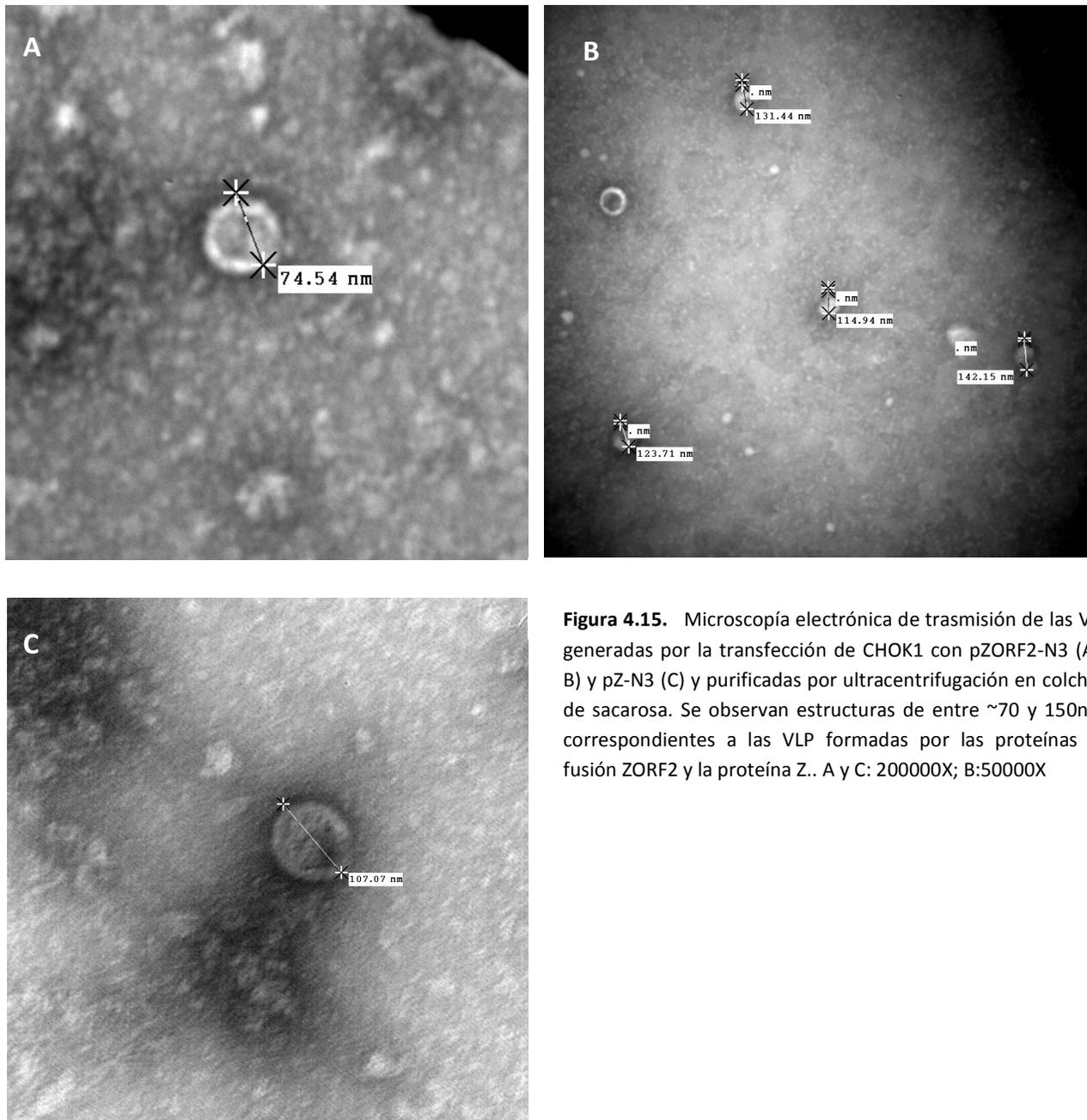


Figura 4.15. Microscopía electrónica de transmisión de las VLP generadas por la transfección de CHOK1 con pZORF2-N3 (A y B) y pZ-N3 (C) y purificadas por ultracentrifugación en colchón de sacarosa. Se observan estructuras de entre ~70 y 150nm, correspondientes a las VLP formadas por las proteínas de fusión ZORF2 y la proteína Z. A y C: 200000X; B:50000X

La identidad de las proteínas expresadas en el sistema de células CHOK1 fue corroborada por Western Blot, empleando un anticuerpo dirigido contra la proteína Z del virus Junín. El anticuerpo secundario estaba conjugado con fosfatasa alcalina. En las VLP expresadas en células transfectadas con pZORF2-N3 y pZ-N3 se identificó la presencia de Z, lo cual no ocurrió en el sobrenadante de las células transfectadas con pEGFP-N3 (Fig. 4.16.). Se observó una banda de un tamaño de de ~85 KDa y ~10KDa, para la proteína de fusión ZORF2 y Z, respectivamente, lo cual está acorde a lo esperado, considerando el peso individual de cada una de las proteínas (~78 y ~ 8 KDa.).

Por su parte el Dot Blot realizado con el anticuerpo anti-ORF2 reveló una reacción positiva, mientras que no se observó reacción en el sobrenadante de las células transfectadas con pZ-N3 y pEGFP-N3 (Datos no mostrados).

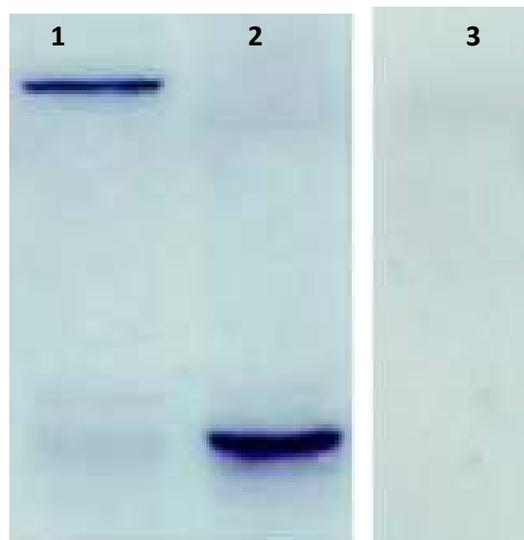


Figura 4.16. Western blot de las VLP purificadas de los sobrenadantes de CHOK1 transfectadas con pZORF2-N3 (1) , pZ-N3 (2) , y del sobrenadante de las células transfectadas con pEGFP-N3 (3), incubadas con un anticuerpo anti Z revelado con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina. La proteína de fusión Z-ORF2 y Z presentaron un tamaño de ~85 KDa y ~8KDa., respectivamente.

El sistema aquí puesto a punto, diseñado sobre la base de las características biológicas de la proteína Z demostró ser un enfoque promisorio para el desarrollo de estrategias destinadas a prevenir la infección por HEV. Se probarán a su vez nuevas construcciones empleando fragmentos antigénicos de la proteína Cap codificado por el ORF2, como lo es la secuencia que da lugar a la partícula p239 o el fragmento E2s que incluye el dominio antigénico mínimo del HEV.

Claro está, es necesario en el futuro cercano implementar todos los estudios de inmunogenicidad en animales de experimentación, a fin de evaluar esta posibilidad. Este objetivo será llevado a cabo en breve en nuestro laboratorio y está enmarcado en un proyecto trinacional financiado por el Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología (CABBIO), en conjunto con el grupo del Dr. Mario Lozano de la Universidad Nacional de Quilmes, Argentina y el Dr. Oscrá Bruna-Romero, del Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil.

Referencias

1. Shrestha, M.P., Scott, R.M., Joshi, D.M., et al. 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.* 356; 895–903.
2. Zhu, F.C., Zhang, J., Zhang, X.F. et al. 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large scale, randomised, double-blind placebo-controlled phase-3 trial. *Lancet* 376;895–902.
3. Purcell, R.H., Nguyen, H., Shapiro, M. et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine* 21:2607–2615.
4. Li, S.W., Zhang, J., Li, Y.M. et al. 2005. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine* 23; 2893–2901.
5. Zhang, J., Liu, C.B., Li, R.C. et al. 2009. Randomized controlled phase II clinical trial of a bacterially expressed recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine* 27; 1869–1874.
6. Borio, C.S., Bilen, M.F., Argüelles, M.H. et al. 2012. Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnol.* Nov 2;12; 80.
7. Perez, M., Craven, R.C., de la Torre J.C. 2003. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(22); 12978–12983.
8. Goni, S.E., Borio, C.S., Romano, F.B., et al 2010. Expression and purification of Z protein from Junin virus. *J. Biomed. Biotechnol.* ; 970491.

9. Wilda, M., Lopez, N., Casabona, J.C., Franze-Fernandez, M.T. 2008. Mapping of the tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N terminus of L that are critically involved in binding. *J Virol.* 82(22); 11454–11460.
10. Lopez, N., Jacamo, R., Franze-Fernandez, M.T. 2001. Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J. Virol.* 75(24); 12241–12251.
11. Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J. et al. 2003. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J. Virol.* 77(19); 10700–10705.
12. Eichler, R., Strecker, T., Kolesnikova, L. et al. 2004. Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res.* 100(2); 249–255.
13. Casabona, J.C., Levingston, Macleod, J.M., Loureiro, M.E., Gomez, G.A., Lopez, N. 2009. The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. *J. Virol.* 83(14); 7029–7039.
14. Urata, S., Yasuda, J., de la Torre, J.C. 2009. The z protein of the new world arenavirus tacaribe virus has bona fide budding activity that does not depend on known late domain motifs. *J. Virol.* 83(23); 12651–12655.
15. Chackerian, B. 2007. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 6(3); 381–390.

CAPÍTULO 5

I. RELEVAMIENTO DE RESERVORIOS ANIMALES DE HEV Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS.

Como hemos descrito en el **Capítulo 1**, la transmisión zoonótica de HEV cumple un rol preponderante en la dispersión viral, fundamentalmente en zonas subdesarrolladas no endémicas, donde casos autóctonos esporádicos sin fuente aparente de infección se han reportado.

En esta Sección, que será dividida en tres partes, nos abocaremos a describir las estrategias y metodologías implementadas para investigar la presencia de HEV en reservorios animales en diferentes regiones de nuestro país.

i) Relevamiento de HEV en cerdos y jabalíes de Uruguay por RT-nPCR

Este enfoque fue realizado como una primera aproximación metodológica a la detección e identificación de HEV en piaras de cerdos domésticos y jabalíes de nuestro país. En Uruguay, como se ha mencionado, no existen datos referidos a la circulación de HEV en estos reservorios, así como tampoco se ha reportado información serológica de ningún tipo.

Los resultados de esta primera experiencia en el país en el relevamiento por PCR convencional de HEV en los dos principales reservorios del virus fueron publicados en el 2014 como un capítulo del libro Temas de Zoonosis VI, editado por la Sociedad Argentina de Zoonosis, que se adjunta la final de este capítulo. A su vez, en esa publicación se realiza una actualización sobre la situación de la infección por HEV en Uruguay, resumiendo los últimos y más recientes hallazgos. Para el trabajo original mencionado, fueron seleccionados 6 de los criaderos comerciales más grandes de nuestro país, ubicados en la zona de mayor producción porcina (sur del país, Departamentos de Canelones, Montevideo y San José) de los cuales se extrajeron 90 muestras de sangre. Paralelamente, fueron obtenidas 40 muestras de sangre de jabalíes de las poblaciones del litoral Este del Uruguay. La colecta se realizó entre los años 2011 y 2013.

Luego de completado el análisis, no fue posible detectar por ninguna de las dos RT-nPCR diseñadas, animales infectados con HEV. Este resultado fue sorprendente dado que en la región, particularmente Brasil y Argentina, de

donde provienen la mayor cantidad de reportes referentes a HEV porcino, el virus circula ampliamente en las piaras, al menos de cerdos domésticos^{1,2}.

Sin embargo, con posterioridad a la publicación del capítulo en el libro, se decidió modificar la estrategia con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la detección e implementamos técnicas moleculares de RT-nPCR en muestras de hígados obtenidas de frigoríficos comerciales y de materia fecal, proporcionada por criaderos comerciales del centro del país, a través de la Asociación de Productores Porcinos del Uruguay. De aquí en adelante se describe la metodología y resultados obtenidos en este estudio.

Materiales y métodos

Para llevar adelante este trabajo fueron obtenidas 115 muestras de hígados entre los años 2013 y 2014, colectadas durante el procedimiento de faena y conservadas en frío hasta su procesamiento en el laboratorio. Secciones de 2cm x 2cm fueron disgregadas mecánicamente con un bisturí e incubadas con una solución de lisis conteniendo 0.5M Tris pH 8, 0.5% Tween20 y 500ug/mL proteinasa K (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos). La digestión enzimática de los trozos de hígados se permitió que ocurriera durante al menos 3 horas a 56°C. Pasado ese período, se procedió a la extracción del ARN empleando TRizol® (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ARN obtenido fue almacenado a -70°C hasta su uso.

Paralelamente fueron incluidas 45 muestras de materia fecal provenientes de criaderos comerciales y obtenidas durante 2014. Similarmente a los hígados, las muestras fueron colectadas en bolsas estériles que se cerraron en forma hermética y transportadas en frío al Laboratorio. En este caso, para proceder a la extracción del material genético viral se realizó una suspensión al 10% (masa/volumen) en PBS 10% SDS, y se agitó durante 20 min a 200 RPM, con un golpe de vortex de 15 seg cada 5 min. Luego, 1mL de la suspensión fue incubada con Trizol® (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), para proceder con la extracción del ARN de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Para analizar la presencia de ARN de HEV fueron implementadas dos RT-nPCR diseñadas en base a secuencias del ORF1 y ORF2. La primera, que amplifica el extremo 3' del genoma viral fue descrita previamente en esta Tesis³.

La segunda fue implementada a partir de un protocolo publicado por Meng et al.⁴, y descrita a continuación. Para la RT, 5 uL de ARN fueron copiados a ADNc mediante la enzima SuperscriptII® (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, utilizando 0.5 uM del primer 3157 (5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3'). Luego, 5 uL del ADNc fueron amplificados utilizando la enzima Taq Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) en un mix conteniendo 1X buffer Taq, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 uM primer 3157 y 3156 (5'-AAT(C)TATGCC(A)CAGTACCGGGTTG-3') y 2U de Taq polimerasa. El ciclado de la reacción fue el siguiente: 94°C-5 min/ 39 ciclos de 94°C-1 min; 42°C-45 seg; 72°C 1 min/ 72°C-10 min.

El producto de PCR fue re amplificado en las mismas condiciones descritas arriba pero empleando los primers 3158 (5'-GTT(C)ATGC(T)TT(C)TGCATACATGGCT-3') y 3159 (5'-AGCCGACGAAATC(T)AATTCTGTC-3'). Los fragmentos de PCR, de 350 pb en este caso, fueron separados en un gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta (UV). Por su parte, la identidad del producto fue confirmada por secuenciación, realizada en el Servicio de Secuenciación Automática de Macrogen (Macrogen Inc. Corea).

El análisis filogenético se implementó utilizando el software MEGA 5.1, por el método de Neighbor-Joining empleando el modelo de dos parámetros de Kimura como modelo de sustitución nucleotídica. Los valores de *bootstrap* fueron determinados con 1000 re-muestrados de los datos y se generó un árbol consenso. Valores de *bootstrap* mayores a 60% fueron considerados significativos.

Resultados y Discusión

Con el objetivo de amplificar más de una región genómica y así generar la mayor información posible acerca de las cepas suinas de HEV a ser detectadas, a cada

muestra de tejido de hígado y materia fecal se les aplicó las dos RT-nPCR implementadas en este trabajo.

En el relevamiento de las 115 muestras de hígado, sólo fue posible amplificar en un caso (0.9%) el fragmento correspondiente al ORF2, pero no así el ORF1. Lo mismo ocurrió en el caso de los especímenes de materia fecal, en las que en uno solo se detectó ARN de HEV (2.5%). Sin embargo, en esta única muestra sólo se amplificó la secuencia del extremo 5' del ORF1 (Fig. 5.1). Este hecho, en el que sólo algunas regiones parciales del genoma pueden ser amplificadas y no otras no es sorprendente, y ha sido descrito previamente para HEV⁵.

La frecuencia de animales infectados en las piaras de cerdos de Uruguay parece ser muy baja, respecto a lo observado en países de la región. En Argentina por ejemplo, se han reportado tasas de entre 4 y 98% de animales infectados por HEV, mientras que Brasil se encontró una frecuencia general de cerdos infectados del 15%, detectando además la circulación de HEV en el 62.5% de las granjas estudiadas^{1,6}.

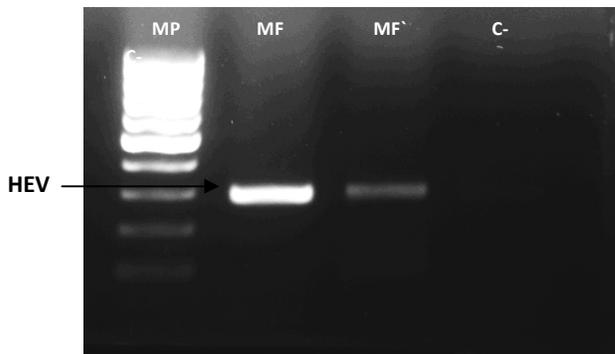


Figura 5.1. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de los productos de 287 pb de la RT-nPCR realizada en base al extremo 5' del ORF1. MF y MF', amplificación de HEV en materia fecal de la muestra pura y diluída 1/100, respectivamente. MP: marcador de peso molecular GeneRuler (ThermoScientific, Estados Unidos), de 100 pb; C-: control negativo de PCR.

El análisis y reconstrucción filogenética de la cepa detectada en la muestra de hígado, denominada Sw_Uy2 mostró resultados sorprendentes, agrupando con cepas del Genotipo 1 (Fig. 5.2.). Desafortunadamente, esta cepa suina no pudo ser comparada con la cepa humana del Genotipo 1 descrita en el **Capítulo 3**, dado que a pesar de los esfuerzos realizados, en los dos aislados se logró amplificar regiones genómicas diferentes.

A pesar de ello, la importancia de este hallazgo radica en que evidencia la posibilidad real de que las cepas de Genotipo 1 sean capaces de infectar cerdos en la naturaleza y ser zoonóticas. Hasta donde sabemos, este es el primer aislado

de estas características detectado en América, con únicamente un antecedente a nivel mundial de una cepa aislado en Camboya en el año 2006⁷. Lamentablemente la información de secuencia que se tiene de este aislado es muy escasa, limitándose a un pequeño fragmento dentro del ORF1.

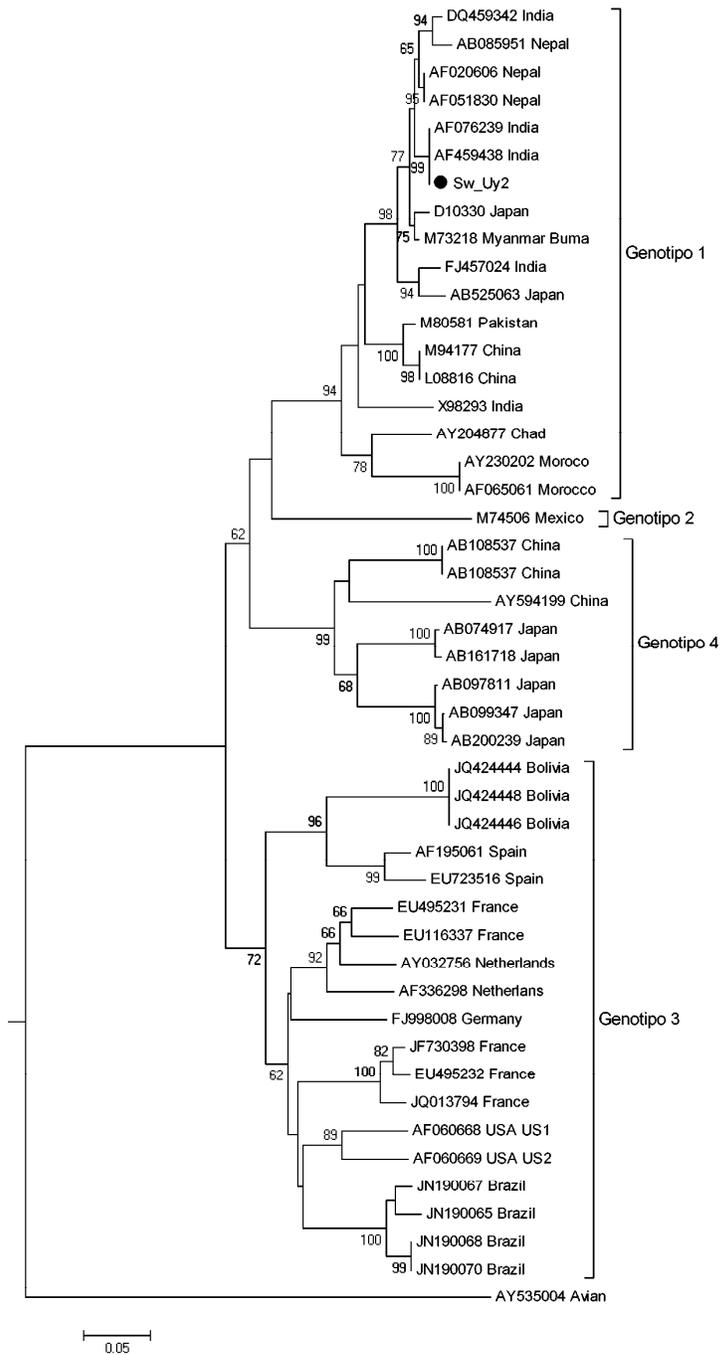


Figura 5.2. Reconstrucción filogenética de HEV en base a un fragmento de 350pb del ORF2, por el método de Neighbor-Joining. El aislado de HEV detectado en lamuestra de hígado de un cerdo doméstico se indica con un **círculo oscuro**. Se muestran únicamente valores de *bootstrap* $\geq 60\%$.

Por el contrario, la reconstrucción filogenética de la cepa detectada en la muestra de materia fecal (Sw_Uy1) , demostró pertenecer al Genotipo 3, y formó parte del cluster de cepas de HEV detectadas en humanos durante 2010-2011 (Fig. 5.3.).

El análisis bioinformático del fragmento amplificado reveló una identidad de secuencia nucleotídica de entre 95-97.5% con las cepas de HEV detectadas en humanos, lo cual es interesante dado que la región evaluada, correspondiente al extremo 3' es una de las más conservadas del genoma viral⁸.

Así , será necesario nuevos análisis mediante al estudio de otras regiones del genoma para determinar si el origen de la infección de HEV en humanos es zoonótico. Diversos trabajos que han reportado incidentes de transmisión zoonótica de HEV, han observado que las cepas suinas y humanas involucradas detectadas en una misma región, son idénticas a nivel nucleotídico⁹. Si bien en esta investigación eso no ocurre, aún evaluando una región altamente conservada del genoma viral, no es posible descartar la transmisión zoonótica de HEV en el pasado no inmediato.

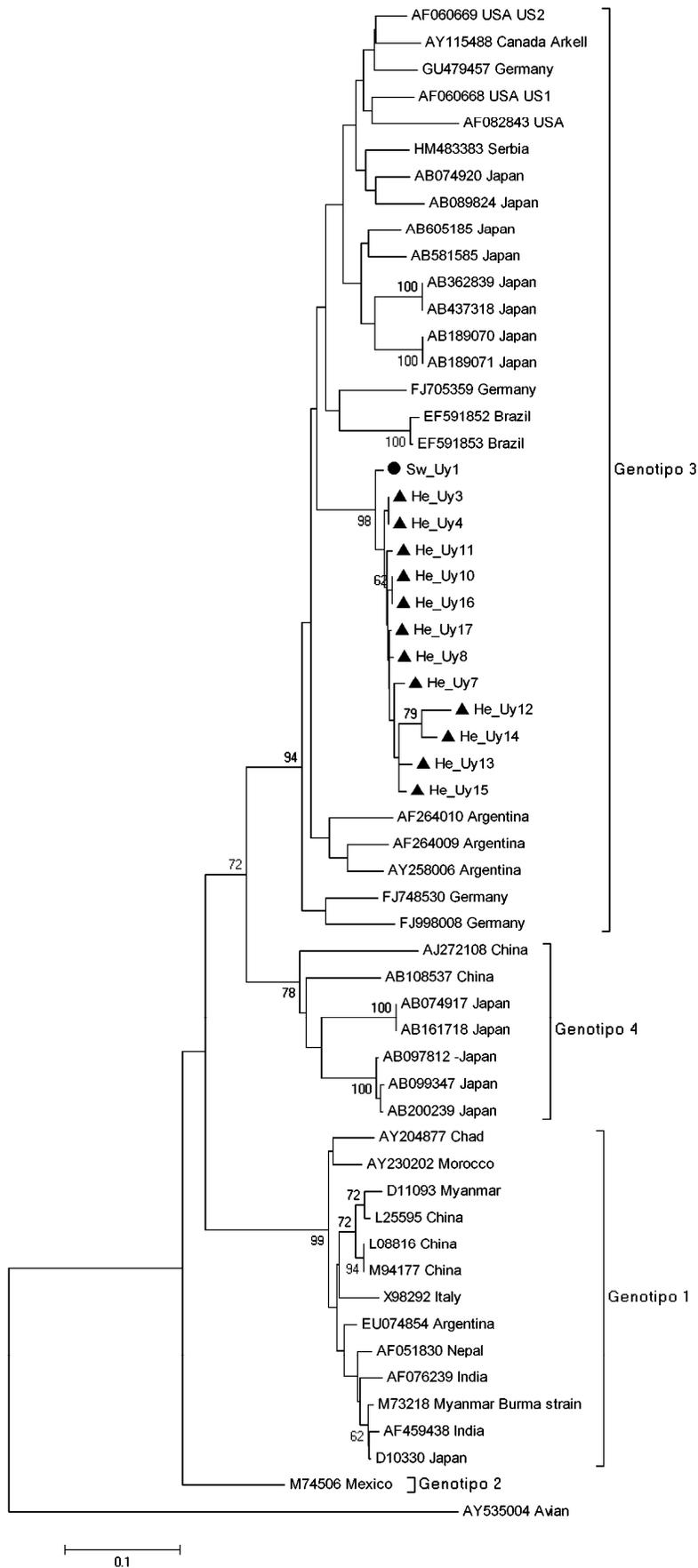


Figura 5.3. Reconstrucción filogenética de HEV en base a un fragmento de 287 pb del ORF1, por el método de Neighbor-Joining. Las cepas Uruguayas se resaltan (**triángulo relleno oscuro**). El aislado de HEV detectado en muestra de materia fecal de un cerdo doméstico se indica con un **círculo oscuro**. Se muestran únicamente valores de *bootstrap* $\geq 60\%$.

En resumen, los resultados aquí reportados reflejan el primer relevamiento de HEV en reservorios animales realizado en el país, y demuestran la presencia de HEV en suinos de nuestro país, y la co-circulación de los Genotipo 1 y 3.

PUBLICACIÓN ORIGINAL: Mirazo, S., Arbiza, J. 2014 Situación actual y potencial zoonótico de la infección por virus hepatitis E (HEV) en Uruguay. Temas de Zoonosis VI. Capítulo 53. Sociedad Argentina de Zoonosis.

ii) Evaluación de las ratas domésticas (*Rattus rattus*) y salvajes (*Scapteromys spp*) como reservorios para la infección por HEV

El papel de las ratas *Rattus spp.* y *Scapteromys spp.* y su rol como reservorios en la epidemiología y transmisión de HEV no es clara y es controversial, como hemos visto anteriormente. Sin embargo, la ubicuidad de estos animales en los entornos urbanos y periurbanos y su propensión para transmitir patógenos zoonóticos los convierte en un interesante y necesario objeto de investigación. De hecho, múltiples estudios han reportado la detección de altas tasas de IgG e IgM anti HEV en poblaciones de *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus* en Estados Unidos y Asia¹⁰⁻¹³. Otros trabajos a su vez, han sugerido que las cepas humanas pueden efectivamente replicarse y propagarse a través de *Rattus norvegicus*¹⁴.

Sin embargo, el reciente descubrimiento de una cepa específica de HEV de rata incapaz de infectar a los seres humanos^{15,16} sugiere que la alta seroprevalencia de anticuerpos contra HEV puede ser causada por la reactividad cruzada en lugar de infección generalizada con un Genotipo humano de HEV.

En este trabajo nos propusimos relevar la presencia de HEV en una población de ratas domésticas (*Rattus rattus*) y salvajes de la especie *Scapteromys timidus*, mediante RT-nPCR y rtPCR, con el objetivo de evaluar el potencial rol zoonótico de estos animales.

Materiales y Métodos

Muestras

En este trabajo se incluyeron 12 hígados de individuos de la especie silvestre *Scapteromys timidus* (Rata de pajonal) colectados en el departamento de Maldonado y 15 hígados de animales de la especie *Rattus rattus* (Rata doméstica) capturados en Montevideo y zona metropolitana.

Las muestras de Rata de pajonal fueron provistas por la Dra. Adriana Delfraro y el Lic. Andrés Cabrera de la Sección Virología de la Facultad de Ciencias, UdelaR. Por su parte, los especímenes de *Rattus rattus* fueron proporcionadas por el MDV. Gustavo Castro, de la Facultad de Veterinaria, de la misma Universidad.

Los hígados fueron tratados de forma idéntica a lo descrito más arriba para los hígados porcinos y el ARN fue extraído por el método de TRizol® (Invitrogen, Life

Technologies, Estados Unidos), de acuerdo a las especificaciones del fabricante, y luego almacenado a -70°C hasta su uso.

RT-nPCR y rt-PCR

Para llevar adelante la detección de HEV en las muestras de roedores se implementó un RT-nPCR descrita por Johne et al. ¹⁶, diseñada como herramienta de amplio espectro para la detección de cepas de HEV suinas, humanas, de aves y roedores.

Brevemente, 5uL de ARN fueron retrotranscritos a ADNc mediante la enzima SuperscriptII® (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, utilizando 0.5 uM del primer HEV-Cas (5`-GCCATGTTCCAGACDGTRTTCCA-3`). Luego, 5 uL del ADNc fueron amplificados utilizando la enzima Taq Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) en una mezcla conteniendo 1X buffer Taq, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 uM primer HEV-Cas y HEV-Cs (5`- TCGCGCATCACMTTYTTCARAA-3`) y 2U de Taq polimerasa. El ciclado de la reacción fue el siguiente: 94°C-5 min/ 40 ciclos de 94°C-1 min; 50°C-45 seg; 72°C 1 min/ 72°C-10 min.

El producto de PCR fue re amplificado en las mismas condiciones descritas arriba pero empleando los primers HEV-Csn (5`- TGTGCTCTGTTGGCCNTGGTTYCMG - 3`) y HEV-Casn (5`- CCAGGCTCACCRGARTGYTTCTTCCA -3`). Los fragmentos de PCR, de 334 pb en este caso, fueron separados en un gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta (UV). Como control de la reacción de RT-nPCR fue incluida una muestra de suero humano infectado con HEV,

La rt-PCR se llevó adelante utilizando el protocolo descrito por Jothijumar et al. (2006)¹⁷, diseñada para detectar un fragmento altamente conservado de la región de solapamiento de las ORF2 y 3, empleando el kit SuperScript® III Platinum® SYBR® Green-One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos).

Resultados y Discusión

En este trabajo se procuró implementar un ensayo de detección molecular de HEV en roedores, particularmente ratas, dado su rol potencial en la diseminación del virus y su riesgo de trasmisión zoonótica.

Con este objetivo, fue puesta a punto una RT-nPCR empleando una muestra humana de HEV, perteneciente al Genotipo 3 (Fig. 5.5). Sin embargo, en el análisis de las muestras de tejido hepático de *Rattus rattus* y *Scapteromys timidus* no se pudo detectar ARN de HEV en ninguna muestra, realizándose el ensayo por triplicado.

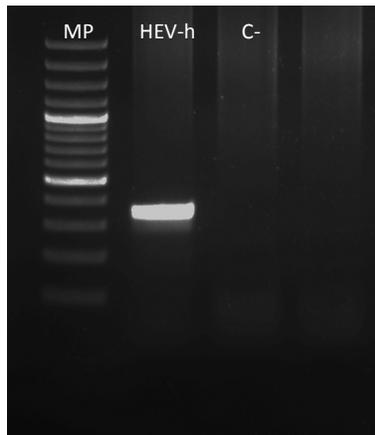


Figura 5.4. Electroforesis en gel de agarosa y visualización del producto de 334 pb de la RT-nPCR realizada en base al ORF1. Se amplificó una muestra de HEV humana como control (HEV-h) y fueron incluidos dos controles negativos (C-). MP: marcador de peso molecular GeneRuler (ThermoScientific, Estados Unidos), de 100 pb.

Al estudiarse las mismas muestras por rt-PCR, tampoco se detectó la presencia de HEV.

Los resultados aquí mostrados no son sorprendentes, considerando que aún en cerdos, el principal reservorio de HEV, la frecuencia del virus en Uruguay parece ser baja.

Lamentablemente, no existen reportes en la región acerca de la incidencia de HEV en roedores, que permitan comparar los hallazgos y cotejar estos resultados. De todas maneras, este trabajo procuró comenzar a indagar otros potenciales reservorios de HEV en la naturaleza como forma de valorar la capacidad zoonótica de HEV y el riesgo que conlleva para la población.

Claramente, nuevos estudios serán necesarios enfocados a investigar, por un lado la seroprevalencia de HEV en roedores y, por otro, continuar monitoreando estos animales por la presencia de ARN de HEV, como evidencia de infección activa.

Referencias

1. Gardinali, N.R., Barry, A.F., da Silva, P.F., de Souza, C., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2012. Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. *Res. Vet. Sci.* 93; 1515-1519.
2. Echevarría, J.M., González, J.E., Lewis-Ximenez, L.L. et al., 2013. Hepatitis E virus infection in Latin America: A review. *J. Med. Virol.* 85; 1037-1045.
3. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J.C., Arbiza, J., 2013. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res.* 173; 364-70.
4. Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94; 9860-9865.
5. Wang, Y., Ling, R., Erker, J.C. et al., 1999. A divergent genotype of Hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol.* 80;169–77.
6. Munné, M.S., Vladimirov, S., Otegui, L. et al., 2006. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol.* 78;1579-1783
7. Caron, M., Enouf, V., Than, S.C., Dellamonica, L., Buisson, Y., Nicand, E., 2006. Identification of genotype 1 Hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J. Clin. Microbiol.* 44; 3440-3442.
8. Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S. and Arbiza., 2014. Transmission, Diagnosis and management of hepatitis E: an update. *Hepat. Med.* 6; 45-59.
9. Meng XJ. 2013. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin. Liver. Dis.* 33: 41–49.
10. Favorov, M.O., Kosoy, M.Y., Tsarev, S.A., Childs, J.E. and Margolis, H.S., 2000. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.* 181; 449–455.
11. Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J.B., Elm, J. et al. 1999. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:331–335.
12. Hirano, M., Ding, X., Li, T.C. et al. 2003. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.* 27;1–5.
13. Easterbrook, J.D., Kaplan, J.B., Vanasco, N.B. et al. 2007. A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiol. Infect.* 135:1192–1199.
14. Maneerat, Y., Clayson, E.T., Myint, K.S., Young, G.D., Innis, B.L. 1996. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol.* 48; 121–128.

15. Johne, R., Heckel, G., Plenge-Bonig, A. et al. 2010. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 16; 1452–1455.
16. Johne, R., Plenge-Bonig, A., Hess, M., Ulrich, R.G., Reetz, J., Schielke, A. 2010. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 91:750–758.
17. Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J. and Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 131; 65-71.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 3.

. En esta Tesis fueron diseñadas, implementadas y optimizadas una serie de técnicas moleculares (PCR convencional y tiempo real) y serológicas (inmunofluorescencia) para la detección, identificación y caracterización de HEV.

. Se identificó por primera vez en el país cepas de HEV asociadas a casos de hepatitis aguda en Uruguay, siendo en todos los casos autóctonos y esporádicos.

. En nuestro país circulan cepas del Genotipo 3 (subtipos 3i y 3h) y Genotipo 1.

. Fue detectado por primera vez en el cono sur un caso autóctono de hepatitis E asociado al Genotipo 1. El aislado está relacionado filogenéticamente con dos cepas detectadas en Cuba y Venezuela en la última década, cuyo ancestro común sería la cepa India YAM67.

.Se detectó una muy alta frecuencia, en comparación con datos históricos de seroprevalencia, de anticuerpos anti HEV en pacientes HIV en nuestro país, a la vez que se detectaron aislados circulantes en esta población. Todas las cepas fueron del Genotipo 3 relacionadas con las detectadas anteriormente en Uruguay.

. Con el objetivo de llevar adelante todos los estudios y análisis moleculares descritos en esta Tesis, se logró desarrollar y optimizar un sistema sencillo y reproducible de aislamiento de HEV *in vitro* empleando la línea celular A549. Paralelamente, se logró aislar HEV en la línea Hep-G2 (hepatoma humano), pero con una eficiencia mucho menor.

. Se implementó un sistema de cultivo e hepatocitos primarios de rata (*Rattus rattus*) con el objetivo de aislar HEV. Sin embargo no se obtuvieron evidencias de que HEV Genotipo 3 pueda replicar en estas células *in vitro*.

. El clado de los aislados del Genotipo 3 parecen tener un origen muy reciente, habiendo compartido un ancestro común en los 4 a 6 años anteriores a su detección (2010). A su vez, estas cepas compartieron un linaje con aislados de origen europeo, particularmente Francesas y Alemanas. El tMRCA fue calculado en hace aproximadamente 100 años.

CAPÍTULO 4

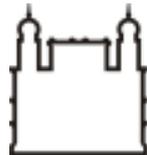
- . Mediante una pasantía en un laboratorio de referencia internacional se transfirieron e implementaron técnicas de amplificación por PCR, expresión en *E. coli* y purificación de las proteínas codificadas por los ORF2 y 3 de HEV.
- . Se llevaron adelante estudios preliminares sobre la localización celular de la proteína codificada por el ORF3 viral en la línea celular A549 empleada para el aislamiento de HEV y en hepatocitos primarios de rata.
- . Se realizaron estudios preliminares para evaluar la capacidad de un sistema de expresión de antígeno basado en la tecnología VLP en células eucariotas, y que utiliza las propiedades biológicas de la proteína Z del Virus Junin, de expresar el ORF2 de HEV. Los estudios confirmaron que ORF2 se expresa con este sistema lo que resulta en una atractiva línea de investigación para desarrollar estrategias inmunoprotectoras para el control de la infección por HEV.

CAPÍTULO 5

- . Se implementó un relevamiento de piaras de cerdos domésticos de la región de Uruguay de mayor producción porcina, así como de poblaciones de jabalíes.
- . Se detectó la circulación de HEV en cerdos domésticos, aunque su distribución no es amplia.
- . Fue identificado un aislado de HEV Genotipo 3 (Sw_Uy1) en un cerdo de granja, que resultó estar filogenéticamente relacionado con las cepas de HEV detectadas en humanos durante los años 2010 y 2011. Así, esta es la primer cepa de HEV porcino detectada en Uruguay.
- . Paralelamente, al analizarse hígados de cerdos faenados, se detectó una cepa de Genotipo 1 (Sw_Uy2). Esto es llamativo, dado que se considera que los Genotipos 1 y 2 son antroponóticos. Un único caso previo de circulación de Genotipo 1 en porcinos había sido descrito en el mundo.
- . Sin embargo, los cerdos domésticos presentan en general una muy baja frecuencia de HEV, por lo que su rol en la transmisión zoonótica del virus en nuestro país no parece ser relevante.

. Al ser los roedores potenciales reservorios de HEV, se implementó un relevamiento molecular de poblaciones de ratas domésticas (*Rattus rattus*) y salvajes (*Scapteromys timidus*) por PCR convencional y en tiempo real. Sin embargo, si bien las técnicas fueron optimizadas, no se detectaron evidencias de circulación de HEV en estas poblaciones.

AGRADECIMIENTOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

