



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

**Evaluación de la presencia de cuasiespecies del virus de hepatitis
C en suero, saliva y fluido crevicular gingival de pacientes
infectados.**

Trabajo Especial de Grado

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por el Br. Eduardo José Rodríguez Román
como requisito parcial para optar
al título de Licenciado en Biología
Tutores: Dra. Flor H. Pujol (IVIC)
Dra. Palmira Guevara (UCV)

Caracas – Venezuela
Febrero – 2011

Resumen.

El virus de la hepatitis C (VHC) es el agente etiológico de la hepatitis C, una enfermedad viral que afecta principalmente al hígado en humanos y chimpancés. Aproximadamente el 3% de la población mundial humana, está infectada con este virus. Es un virus que contiene ARN como material genético. Su genoma es de cadena lineal, y contiene unos 9500 nucleótidos. Posee una alta tasa de error en la incorporación de nucleótidos al momento de la replicación, ya que su ARN polimerasa dependiente de ARN carece de un sistema de actividad correctora, se dan mutaciones al azar constantemente, que influyen directamente en el genotipo y fenotipo del virión, y se seleccionan mutantes (variantes) de resistencia a distintas presiones selectivas, como la que ejercen los fármacos antivirales, o la presión del sistema inmune del hospedador. Las distintas variantes genómicas de este virus, que infectan a un mismo individuo, se denominan cuasiespecies.

El objetivo principal de este estudio, fue determinar la presencia de cuasiespecies en suero y saliva de pacientes infectados en la fase crónica de la hepatitis C.

La amplificación de dos regiones del genoma del VHC (5'-NC y NS5B), la secuenciación de los amplicones, y la clonación, junto con el uso de programas de bioinformática para su análisis, permitió caracterizar al virus molecularmente, tanto en genotipo, como en subtipos, a nivel poblacional. A nivel individual, se determinó la presencia de cuasiespecies en las distintas regiones del VHC en muestras de suero y saliva de pacientes infectados en fase crónica de la hepatitis C.

La carga viral que circula en suero con respecto a saliva, es mayor, y esto le da mayor probabilidad de amplificación en el primero. Además, la región 5'-NC

es más sensible a la amplificación, por ser más conservada que la NS5B. La región 5'-NC es suficiente para la asignación de genotipos. Sin embargo, la región NS5B da una mayor discriminación, y permite asignar subtipos y genotipos.

El alineamiento de secuencias consenso de las regiones del VHC que circula en suero y saliva, mostró un alto grado de identidad, lo cual indicó que tanto la muestra de saliva como la de suero, pueden ser usadas para caracterización molecular.

A nivel poblacional, la caracterización molecular mostró que los genotipos predominantes en Venezuela, siguen siendo el genotipo 1 y el genotipo 2, con una prevalencia del 67% (10/15) y 33% (5/15), respectivamente. Por otro lado, la caracterización molecular a nivel individual, demostró la presencia de cuasiespecies del VHC en las muestras de suero y saliva de dos pacientes, en el cual no se observó mayor distancia genética entre las variantes de la cuasiespecie que circula en suero, con respecto a las variantes de la cuasiespecie que circula en saliva, puesto que no formaron clados distintos entre ellas.

El realizar estudios de cuasiespecies es de suma importancia para la vigilancia, patogenicidad, epidemiología y evolución del virus en un individuo, y muchas veces es pasado por alto.

Aunque se han llevado a cabo numerosos trabajos de distribución de cuasiespecies en distintos órganos, tejidos y/o fluidos corporales, como suero, PBMCs, tejido hepático, entre otros; este es el primer trabajo que pone en evidencia la presencia de cuasiespecies del VHC en la saliva de pacientes infectados, a pesar de que ya ha sido reportada la presencia del VHC en este fluido.

A la VIDA...

Agradecimientos.

... A ese posible hecho que debió haber ocurrido hace unos 4000 millones de años en la Tierra primitiva, en donde, probablemente, hubo una transición de moléculas que no poseían información, a moléculas que empezaron a tener información...

... A ese gran paso clave de tener información no transmisible, a información transmisible, y capaz de aumentar su complejidad... La Evolución...

... Al nacimiento de la teoría de las cuasiespecies... A los virus... A las primeras células... A la formación de células completas... A las bacterias... A los organismos unicelulares... A los organismos multicelulares compartimentalizados... La Evolución, de nuevo... A eso que se le denomina VIDA.

De manera que, gracias a todos los sucesos anteriores, hoy puedo agradecer a quienes estuvieron, están y seguirán estando conmigo en todo este proyecto, al cual ahora, yo le llamo VIDA...

... A mi madre, padre, hermanos y familiares más cercanos, porque de ellos aprendo a diario... Evolución, de nuevo...

... A Flor, por su apoyo y gran ayuda... Aprendí mucho contigo. ¡Qué bueno que te elegí como tutora! Gracias por aceptarme en tu laboratorio.

... A mi abuelo "Mi Prenda" Eugenio... Persona con gran sapiencia, gran apego a la poesía, bastante humilde, alegre, emprendedor, brioso, justo.

... A Carmen Luisa y Yoneira, por enseñarme, guiarme, orientarme (y todos los demás sinónimos que hayan), en torno a lo referente de esta tesis.

... A mis compañeros de laboratorio, quienes me ayudaron y enseñaron muchísimo, no solo en el ámbito científico, sino también en el ámbito personal... Gracias Carmen Luisa y Yoneira (de nuevo, ambas), Miguel, Héctor, Domingo, Yesseima, Zoila, Rossana, Denisse, Idamelis, Luzmir, Mary Luz, Patricia, María de los Ángeles, Colmenares, Pereira... Las que no están ahora en el laboratorio, pero que también me enseñaron... Claudia, Clarissa, Rona, Marielys...

... A Ferdinando y Esmeralda, por haberme prestado las instalaciones de su laboratorio, para poder realizar algunos de mis experimentos...

... A Carmen de Olival, por su colaboración en el desarrollo de esta tesis...

... A todo el personal del Centro de Microbiología y Biología Celular del IVIC, porque cuando uno les pedía un favor, al menos, trataban de ayudarte...

... A mis amigos, colegas, compadres, panas, o lo que sean, con los cuales se abrieron temas de discusión bien interesantes, y con los cuales pasé gran parte de mi tiempo en la Universidad y el IVIC... David, Ricardo, Jhoniel, Leomar (González y Villarroel), Rosana, Luis Manuel, Jamileth, Jenniré, Giselle, Vanessa, Maryant, Víctor (Martín y Sojo)...

... A las cervezas de los viernes, que hacían que me relajara del estrés de cada semana... El Tropezón, "Alitas de Pollo"... Involución, pero que importa...

... A la Facultad de Ciencias, porque me enseñó a pensar, actuar. Sobre todo, a la Escuela de Biología, quien esencialmente, mediante el adiestramiento que me brindó, me ayudó a saber utilizar las ideas para hacer ciencia bonita... A Palmira y Guillermina, que me ayudaron, y muchas veces no se enteraron... A todos los profesores que me dieron clase...

... Al IVIC, por ser la casa en donde fue posible la realización de esta tesis... Una casa, prácticamente en todos los sentidos... Allí aprendí a madurar mucho mis ideas... Sé que aún me falta...

... A quienes sin saberlo, también me ayudaron a pensar, y a quienes admiro grandemente por su trabajo como científicos... Flor Pujol (de nuevo), Manfred Eigen, Esteban Domingo, Eddie Holmes, Leslie Orgel...

Índice General.

Resumen.....	1
Agradecimientos.....	4
Índice de Tablas.....	10
Índice de Figuras.....	11
Introducción.....	13
1. Concepto de virus.....	13
2. Virus de Hepatitis C.....	13
a. Biología de un <i>Hepacivirus</i>	13
b. Variabilidad genómica del VHC.....	16
c. Tasa de mutación del VHC.....	16
d. Epidemiología del VHC.....	18
e. Adaptabilidad del VHC.....	18
f. ¿Qué son las cuasiespecies virales?.....	19
g. Historia natural de la infección por el VHC.....	20
h. Tratamiento Anti-VHC.....	21
i. Resistencia al tratamiento.....	22
Antecedentes.....	23
1. Surgimiento de la teoría de cuasiespecies.....	23
2. ¿Realmente existen las cuasiespecies? Cuasiespecies de virus de ARN.....	23
a. Estudios de las cuasiespecies del VHC.....	24
b. Estudios de variabilidad genética del VHC en Venezuela.....	25
c. Distribución de las cuasiespecies.....	26

Justificación.....	28
Objetivos.....	29
1. Objetivo General.....	29
2. Objetivos Específicos.....	29
Materiales y Métodos.....	30
1. Extracción del ARN.....	31
2. Transcripción inversa.....	31
3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	32
4. Electroforesis en geles submarinos de agarosa al 1,5%.....	35
5. Purificación y cuantificación de los amplicones.....	36
6. Secuenciación.....	36
7. Análisis de secuencias.....	37
8. Clonación de los productos de PCR.....	38
9. Análisis de cuasiespecies.....	40
Resultados.....	42
1. Caracterización molecular del VHC en pacientes infectados.....	42
a. Amplificación de regiones del genoma del VHC en muestras de suero y saliva.....	42
b. Secuenciación y análisis de secuencias.....	48
c. Caracterización molecular a nivel de genotipos y subtipos.....	49
2. Análisis de cuasiespecies de las regiones genómicas del VHC circulante en suero y saliva de un mismo paciente.....	54
a. Clonación, secuenciación, y análisis de secuencias de amplicones de las regiones 5'-NC y NS5B.....	54

Discusión.....	66
Conclusiones y Recomendaciones.....	76
Referencias bibliográficas.....	78
Anexos.....	87

Índice de Tablas

Tabla I. Parámetros de la PCR para la región 5'-NC.....	33
Tabla II. Parámetros de la PCR para la región NS5B para la primera y segunda ronda de amplificación.....	34
Tabla III. Oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de las distintas regiones de VHC.....	34
Tabla IV. Secuencias de referencia del GenBank, de los distintos genotipos y algunos subtipos del VHC.....	38
Tabla V. Muestras de suero y saliva positivas en las distintas regiones del genoma del VHC.....	44
Tabla VI. Concentraciones de los amplicones purificados, correspondientes a regiones del VHC.....	47

Índice de Figuras

Figura 1. Organización del genoma y de las proteínas del VHC.....	15
Figura 2. Genotipos y subtipos del VHC: posibles rutas de difusión de la infección por el VHC a través de administración de drogas por vía parenteral y de la inmigración.....	17
Figura 3. Organización genómica y tasa de fijación de mutaciones de las distintas regiones, codificantes y no codificantes del VHC.....	17
Figura 4. Gel de agarosa (1,5%) de amplicones de la región 5'-NC y NS5B del VHC.....	43
Figura 5. Gel de agarosa (1,5%) de amplicones purificados de la región 5'-NC del VHC.....	45
Figura 6. Gel de agarosa (1,5%) de amplicones purificados de la región NS5B del VHC.....	46
Figura 7. Electroferograma de un fragmento de la secuencia de la región NS5B del VHC.....	49
Figura 8. Árbol filogenético de la región 5'NC del VHC. Caracterización molecular a nivel de genotipos.....	51
Figura 9. Árbol filogenético de la región NS5B del VHC. Caracterización molecular a nivel de subtipos.....	53
Figura 10. Gel de agarosa (1%) de la digestión de plásmidos con insertos de los amplicones de la región NS5B del VHC.....	55
Figura 11. Alineamiento de secuencias de clones de amplicones de la región 5'-NC del VHC presente en suero y saliva del paciente 21.....	57

Figura 12. Comparación de la secuencia consenso de nucleótidos y del electroferograma perteneciente a la región NS5B del VHC que circula en suero y en saliva de un mismo paciente	58
Figura 13. Alineamiento de secuencias de clones de amplicones de la región NS5B del VHC presente en suero y saliva del paciente 20.....	59
Figura 14. Alineamiento de secuencias de clones de amplicones de la región NS5B del VHC presente en suero y saliva del paciente 21.....	60
Figura 15. Alineamiento de secuencias de clones de amplicones de la región NS5B del VHC presente en suero y saliva del paciente 20 y 21.....	61
Figura 16. Alineamiento de un fragmento de las secuencias de aminoácidos, provenientes de los clones de amplicones de la región NS5B del VHC, de las muestras de suero y saliva de un mismo paciente con VHC genotipo 1, subtipo 1a (paciente 20).....	62
Figura 17. Alineamiento de un fragmento de las secuencias de aminoácidos, provenientes de los clones de amplicones de la región NS5B del VHC, de las muestras de suero y saliva de un mismo paciente con VHC genotipo 1, subtipo 1b (paciente 21).....	63
Figura 18. Árbol filogenético radial, de las variantes de la región NS5B del VHC que infectan a un mismo individuo (cuasiespecies).....	64

Introducción.

1) Concepto de virus.

Para dar a conocer el concepto de virus, se pueden citar dos definiciones que son bien aceptadas hasta la fecha. Según Lwoff (1957), los virus son entidades estrictamente intracelulares y potencialmente patogénicas, con una fase infecciosa, y 1) poseen un solo tipo de ácido nucleico, 2) se multiplican según su material genético, 3) son incapaces de crecer y llevar a cabo fisión binaria, 4) carecen de un sistema Lipmann. Según Luria y Darnell (1967), los virus son entidades cuyo genoma se replica dentro de células vivas usando su maquinaria de síntesis, lo cual determina la formación de elementos especializados que permiten la transferencia del genoma viral a otras células.

2) Virus de Hepatitis C.

a. Biología de un *Hepacivirus*.

Se pueden encontrar virus en casi cualquier lugar en donde haya vida, estando así presentes desde organismos tan simples como bacterias y arqueas, hasta organismos tan complejos como plantas y animales. Por lo general, actualmente, se estudian mucho los virus que infectan animales (especialmente al hombre), por el gran impacto que tienen a nivel social y de salud pública. Es el caso del virus de la hepatitis C (VHC), que infecta a humanos, un virus identificado en 1989, utilizando técnicas de biología molecular, por trabajadores de la Chiron Corporation (Choo y col., 1989). Este virus pertenece al género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae* (Pawlotsky, 2004).

El VHC es un virus cuyo material genético es ARN de cadena lineal y simple, de polaridad positiva, de unos 9500 nucleótidos (nt) de longitud, que nunca pasa en su ciclo replicativo por fase de síntesis de ADN. Es un virus con envoltura lipídica. Su genoma contiene un único marco abierto de lectura (MAL) que codifica para una poliproteína precursora, delimitada por dos regiones no codificantes (NC) en ambos extremos: 5' y 3' (Figura 1A).

La región 5'-NC está muy conservada entre los diferentes aislados y está ubicada junto a los primeros 30-40 nt de la región codificante de la cápside. Actúa como un lugar interno de entrada al ribosoma (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES), y su función es unirse a la subunidad 40S del ribosoma para iniciar la traducción del ARN de manera independiente. La región 3'-NC se puede dividir en tres zonas: una región variable de unos 40 nt, seguida de una secuencia poli-U/polipirimidinas de longitud variable, y la región terminal de 98 nt, altamente conservada entre las variantes del VHC y esencial para iniciar la replicación viral (Guarner y Enríquez, 2008).

El MAL codifica para un precursor poliproteico de unos 3000 aminoácidos (aa), el cual es procesado cotraduccionalmente y postraduccionalmente en el Retículo Endoplasmático (RE), tanto por proteínas celulares como por proteínas virales, para producir 10 proteínas maduras (Figura 1B). De esas proteínas, el primer tercio, en sentido N-terminal del MAL, codifica para las proteínas estructurales de la cápside y envoltura (E1 y E2), procesadas por proteínas de la célula infectada. Los otros dos tercios en sentido C-terminal, codifican para las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, que son indispensables para que se dé la replicación del virus en la célula hospedadora, y

que son procesadas por proteínas del virus. Entre esas dos regiones, se encuentra un polipéptido denominado P7 (también procesado por proteínas celulares), Figura 1B.

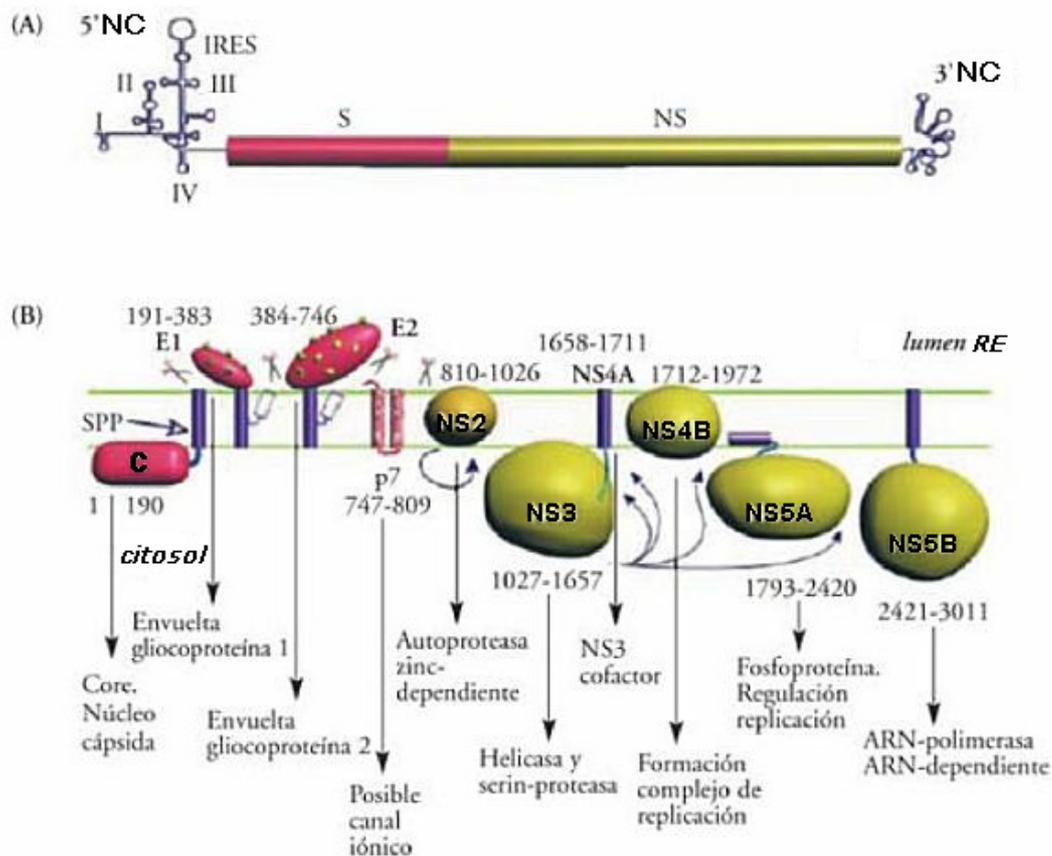


Figura 1. **Organización del genoma y de las proteínas del VHC.** A) Organización genómica del VHC. B) Proteínas funcionales con su tamaño en aminoácidos y posible función. Se indica lugar de corte de las peptidasas del retículo endoplasmático (tijeras), autoprocésado de la unión NS2-NS3 (flecha semicircular) y lugares de corte de la serín-peptidasa NS3/NS4A (flechas con origen NS3). Tomado y modificado de Guarner y Enríquez, 2008.

b. Variabilidad genómica del VHC.

El VHC se puede clasificar a nivel molecular, en genotipos, subtipos, y cuasiespecies (conjunto de variantes estrechamente relacionadas que infectan a un mismo individuo), según el porcentaje de similitud/divergencia de bases que posea una región bastante conservada del genoma. El valor promedio de divergencia entre genotipos oscila entre el 31-34%, y entre 20-23% entre los diferentes subtipos (Pawlotsky, 2004). El análisis de un gran número de secuencias de aislados del VHC procedentes de todas partes del mundo, ha revelado la existencia de seis genotipos (G1 a G6) y de una serie de subtipos dentro de cada uno de estos genotipos, los cuales se clasifican con números y letras (subtipo 1a, 1b, 2c, 3a...), siguiendo el orden de descubrimientos en ambos casos (Figura 2). Las determinaciones de los subtipos y genotipos, por lo general, deben realizarse en regiones distintas del genoma. La región NS5B, es más precisa para la determinación de subtipos, los cuales tienen mayor valor en estudios epidemiológicos; mientras que, la región 5'-NC, es de mejor uso para la determinación de genotipos, que es más usado para propósitos clínicos (Cantaloube y col., 2006; Laperche y col., 2005).

c. Tasa de mutación del VHC.

El VHC presenta distintas tasas de fijación de mutaciones a lo largo de su genoma, para cada uno de los segmentos codificantes y no codificantes (Figura 3). Siendo así la región 5'-NC la más conservada, puesto que es un sitio de entrada al ribosoma, y las regiones codificantes, las que presentan mayor tasa de fijación de mutaciones por nucleótido copiado. De manera que, esto es un

indicador de la variabilidad mutacional intrínseca que posee este virus, a lo largo de su genoma, presentando así, una tasa de mutación promedio de aproximadamente $1,92 \times 10^{-3}$ bases por genoma por año (Ogata y col., 1991).

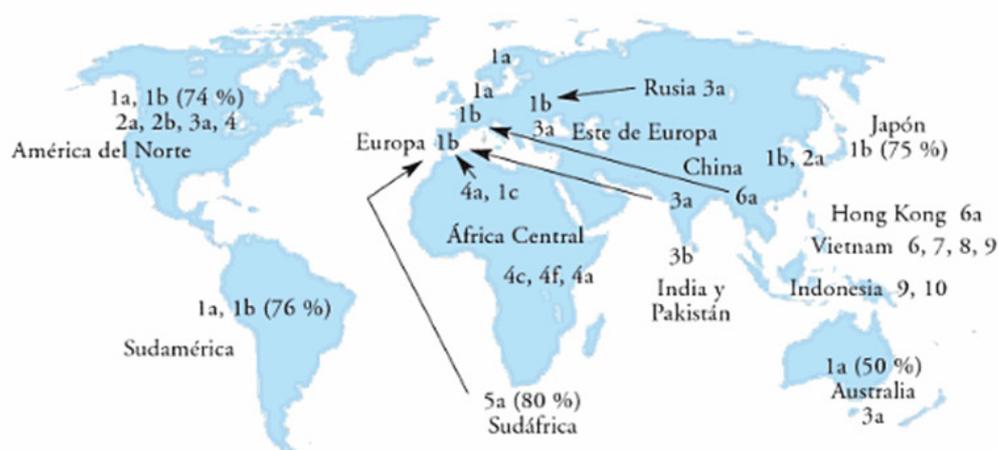


Figura 2. **Genotipos y subtipos del VHC: posibles rutas de difusión de la infección por el VHC a través de administración de drogas por vía parenteral y de la inmigración.** Tomado de Guarner, C., Enríquez, J. 2008.

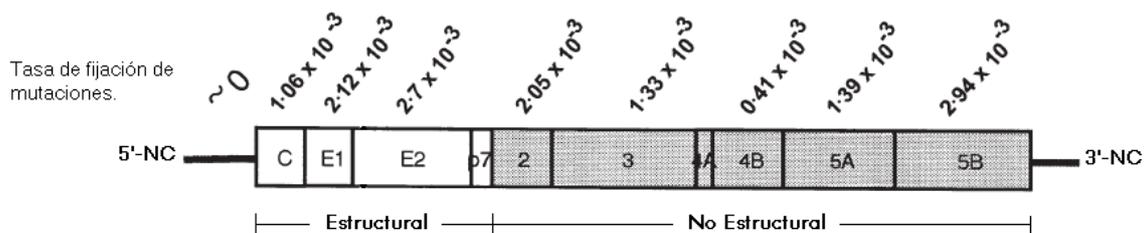


Figura 3. **Organización genómica y tasa de fijación de mutaciones de las distintas regiones, codificantes y no codificantes del VHC.** Las regiones no codificantes delimitan las regiones codificantes estructurales C (cápside), E1 y E2 (envoltura), y p7, y las no estructurales (en sombreado) NS2-NS5B. La región 5'-NC presenta la menor tasa de fijación de mutaciones por sitio por año. Tomado y modificado de Gómez y col., 1999.

d. Epidemiología del VHC.

La infección por el VHC es una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular en todo el mundo (Brass y col., 2006). Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999), se estima que aproximadamente el 3% de la población mundial está infectada con el VHC; esto se traduce en unos 180 millones de personas en todo el mundo.

El VHC se transmite principalmente por vía parenteral. Sin embargo, en la mayoría de estudios epidemiológicos efectuados en los años siguientes al descubrimiento del VHC (1989), sólo la mitad de los pacientes, con infección crónica C, reconocían antecedentes de transfusión sanguínea, incluyendo hemoderivados, o el uso de drogas por vía intravenosa, que son las vías de transmisión parenteral mejor caracterizadas (Guarner y Enríquez, 2008).

e. Adaptabilidad del VHC.

El VHC escapa, en un alto porcentaje de pacientes infectados, al tratamiento combinado actual (interferón pegilado más ribavirina), y aparecen mutantes de escape a cada uno de los nuevos inhibidores de funciones vitales del virus que se están diseñando. La causa principal de la extensa prevalencia, rápida evolución y poder de adaptación del VHC reside en la enorme variabilidad genética que presenta como resultado de su elevada tasa de mutación, elevados niveles de replicación, y de la presencia de cuasiespecies (Guarner y Enríquez, 2008).

f. ¿Qué son las cuasiespecies virales?

Para responder a esta pregunta, hay que tener muy claro el concepto de especie, ya que la definición estándar de una especie biológica no se aplica a los virus.

Una especie biológica se considera una sociedad de individuos que son capaces de generar descendencia fértil (Biebricher y Eigen, 2006). En el caso de los virus, éstos son capaces de multiplicarse, y generar una progenie de partículas infecciosas (viriones), que naturalmente son “fértiles”, ya que podrían generar más viriones luego de infectar a una célula, y que a nivel genómico, presentan una organización bien definida, al igual que cualquier especie biológica. Sin embargo, los virus, al poseer una tasa de mutación tan alta, deben evolucionar más de un millón de veces más rápido que los microorganismos celulares, y no se les puede catalogar como especie, ya que se carece de estas bases teóricas en biología. No obstante, en el ámbito de las ideas químicas y matemáticas, surge una posibilidad, y se ha demostrado que, una especie viral es en realidad una población compleja auto-perpetua, de diversas entidades relacionadas, que actúan como un conjunto, y a esto es lo que denominamos cuasiespecie. De manera que, no es meramente semántica la sustitución del término “especie” por “cuasiespecie” (Eigen, 1993).

Al hacer una recopilación de ideas interdisciplinarias, encontramos que, los virus, en realidad, son cuasiespecies.

Las cuasiespecies virales son distribuciones dinámicas de genomas virales mutantes y recombinantes estrechamente relacionados, pero no idénticos, que están sujetos a un proceso continuo de variación genética, competencia y selección, que actúan como una unidad de selección. Esta definición incorpora los

principios generales de evolución Darwiniana, cuyos efectos, en el caso de los virus, pueden ser observados en cortos períodos de tiempo (usualmente días y semanas), tanto en hospedadores naturales y sistemas modelos, como en hospedadores alternativos *in vivo* o en cultivo de células (Domingo y col., 2006).

g. Historia natural de la infección por el VHC.

La hepatitis C puede verse en dos fases, en fase aguda o en fase crónica, dependiendo del tiempo de infección, y de la evolución que tenga el virus dentro de cierto individuo. Durante la fase aguda de la infección, muchos individuos, aproximadamente el 80%, no presenta síntomas (Mast y col., 1999). Este periodo de incubación para la hepatitis C aguda puede durar de 6 a 10 semanas, en promedio (Hoeprich y col., 1994). Probablemente, hasta un 70% a 90% de los individuos infectados con el VHC en fase aguda, no pueden eliminarlo y pasan a ser portadores crónicos del virus (European Association for the Study of the Liver, 1999; Mandell y col., 1995; WHO, 1999). Los rangos de gravedad de casos asintomáticos, en aproximadamente el 75% de las infecciones, raramente son casos fulminantes o fatales (Hoeprich y col., 1994; Mandell y col., 1995). De aquellos con enfermedad hepática crónica, 5% a 20% pueden desarrollar cirrosis. Aproximadamente 5% de las personas infectadas puede morir por consecuencias de una infección de larga duración (hepatocarcinoma o cirrosis), aunque después de una infección aguda, un 15% a 25% de los infectados puede resolver la infección sin secuelas (US Department of Health and Human Services - CDC, 1998).

La eliminación espontánea del VHC por parte del organismo humano, ocurre en un 20% de los casos y depende de la cantidad y variabilidad genética del virus (de la naturaleza de cuasiespecies del VHC) que ingresa al cuerpo al momento de producirse la infección; en donde, la dinámica evolutiva de las cuasiespecies del VHC, especialmente cuando existe incremento en la complejidad de las secuencias de la región hipervariable 1 (HVR1) del gen de envoltura E2, durante la fase aguda de la hepatitis C, predice si la infección será resuelta o se convertirá en crónica (Farci y col., 2000).

Según la OMS, la hepatitis crónica puede ser definida como una enfermedad continua, sin mejoría, durante al menos seis meses. Muchas personas (60% a 80%) quienes tienen hepatitis C crónica, no poseen los síntomas (Mast y col., 1999).

h. Tratamiento anti-VHC.

Muchos de los pacientes que son diagnosticados tempranamente, tienen la posibilidad de recibir el tratamiento actual, interferón- α pegilado más rimbavirina. Este tratamiento se administra de forma única para cada paciente, dependiendo, principalmente, de la carga viral y del genotipo del VHC que infecta a cada uno de los pacientes, además de algunas características físicas, como la masa corporal. Aunque el tratamiento no es suficientemente eficaz como para brindar una respuesta virológica sostenida (RVS) total al individuo, sí es capaz de brindar una RVS del 42% al 52%, en promedio, en individuos infectados con el genotipo 1 del VHC (Hadziyannis y col., 2004; Fried y col., 2002; Manns y col., 2001) y una RVS del 76% al 93% en individuos infectados con los genotipos 2 ó 3 del VHC

(Hadziyannis y col., 2004; Fried y col., 2002; Manns y col., 2001; Zeuzem y col., 2004).

Para mejorar la eficacia del tratamiento actual anti-VHC, se han desarrollado terapias antivirales específicas contra nuevas dianas (STAT-C, *Specifically Targeted Antiviral Therapy C*), usando pequeños péptidos contra enzimas clave para la replicación y función del VHC, especialmente contra el dominio de la peptidasa NS3 y contra el dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de NS5B (Guarner y Enríquez, 2008).

i. Resistencia al tratamiento.

La principal causa de fallo de la terapia antiviral, es la selección de mutantes de resistencia. Esto es consecuencia de la enorme variabilidad de los virus de ARN, los cuales poseen una tasa de mutación en el orden de 10^{-3} - 10^{-4} , es decir, aproximadamente una mutación cada 1000-10000 nt copiados. Con los elevados niveles de replicación del VHC en un paciente no tratado (10^{11} nuevas partículas por día), todas las mutaciones puntuales en cada posición aparecen al menos una vez al día por azar; por lo tanto, los mutantes potencialmente resistentes se generan de forma continua (Domingo y col., 2008). El RdRp del VHC, tiene una elevada tasa de error, con un promedio de incorporaciones erradas de 10^{-4} - 10^{-5} por nucleótido copiado, lo que significa que cada progenie de ARN viral sintetizada en una célula infectada, contiene, en promedio, aproximadamente una mutación por molécula de ARN copiada (Pawlotsky, 2006).

Antecedentes.

1) Surgimiento de la teoría de cuasiespecies.

En 1971, Manfred Eigen del Instituto Max Planck, publica en la revista Die Naturwissenschaften, un artículo titulado “Autoorganización de la materia y Evolución de Macromoléculas Biológicas”, que es el trabajo clave en la teoría de cuasiespecies. Eigen desarrolló el primer tratamiento teórico de un sistema que replica con fidelidad limitada, de modo que el proceso de replicación genera copias mutantes de los patrones (Eigen, 1971). Esta teoría, que luego se conocería como teoría de cuasiespecies, nace de una trilogía de trabajos que comprenden un estudio detallado de un tipo especial de organización funcional y demuestra su relevancia con respecto al origen y evolución de la vida (Eigen y Schuster, 1977).

2) ¿Realmente existen las cuasiespecies? Cuasiespecies de virus de ARN.

La primera evidencia de que un virus de ARN consiste en la distribución de genomas mutantes y que el tipo salvaje existe sólo como un promedio ponderado de muchas secuencias diferentes, fue obtenida por muestreo de secuencias genómicas de clones biológicos del bacteriófago Q β , en Zurich (Domingo y col., 1978). Posteriormente, se publica un trabajo en donde se hace constatar, mediante distintas técnicas de biología molecular, la gran implicancia biológica que tiene esta enorme variabilidad que presentan los virus de ARN, ya que mutaciones en uno o varios sitios del material genético de este tipo de virus, puede alterar

fácilmente su fenotipo (Domingo y col., 1985). Esta variación de fenotipos puede implicar que haya una menor respuesta virológica sostenida (RVS) por parte del hospedador, de manera tal que pudiera haber una mayor oportunidad de adaptación por parte del virus. Esto anterior, es afirmado en un artículo titulado “Rápida evolución de los virus de ARN”, en el cual se hace resaltar la importancia que tiene la variabilidad de virus de ARN con respecto a virus de ADN, precisamente por la naturaleza de cuasiespecies que estos primeros poseen, pudiendo así provocar una alteración en el equilibrio poblacional, que es lo que conlleva a la evolución extremadamente rápida de estos virus, y además, esto es precisamente lo que permite la proliferación de graves enfermedades causadas por virus de ARN como, por ejemplo, el SIDA, ya que se hace más difícil la obtención de una vacuna (Steinhauer y Holland, 1987). Para principios de los años 90`s del siglo XX, quedaba claro el papel de la variación y diversidad fenotípica de virus de ARN altamente patógenos, como el VIH, virus de hepatitis, hantavirus, entre otros, de modo que, para poder lograr un control de las enfermedades causadas por el espectro de mutantes de cuasiespecies de estos virus de ARN, debían utilizarse vacunas y tratamientos antivirales de varios componentes (Duarte y col., 1994).

a. Estudios de las cuasiespecies del VHC.

Mediante técnicas de amplificación, secuenciación y clonación, se hace resaltar la naturaleza de cuasiespecies de la distribución del genoma del VHC (Martell y col., 1992), y encuentran que, para aquellas personas infectadas, que luego reciben un transplante de hígado, la dinámica de cuasiespecies se ve

disminuida, lo que conlleva a pensar que las cuasiespecies posiblemente se dan cuando hay condiciones de equilibrio (Martell y col., 1994). Además, se evidencia que, necesariamente, no existe una relación directa entre las cuasiespecies circulantes y las que se encuentran en replicación en el hígado, lo que es de gran relevancia en el ámbito de la historia natural de la infección por el VHC (Cabot y col., 1997), y esto conlleva a realizar estudios de cuasiespecies en distintos órganos y/o fluidos corporales. El estudio de variabilidad genómica, puede ser llevado a cabo en distintas regiones del genoma viral. En el caso del VHC, se ha determinado que la región HVR-1 del gen de envoltura 2, es la que presenta mayor variabilidad en los distintos genomas aislados, por lo cual, esta es una región que es blanco para el estudio de cuasiespecies del VHC (Pawlotsky, 2006), además de ser una región que codifica para una proteína que es esencial para la resistencia viral, ante la presión de anticuerpos del sistema inmunitario del hospedador.

b. Estudios de la variabilidad genética del VHC en Venezuela.

En Venezuela, se han llevado a cabo estudios para determinar los genotipos prevalentes del VHC, obteniéndose que un 66%, 20% y 2,5% fueron clasificados como genotipos 1, 2, y 3, respectivamente; 0,8% fue clasificado como genotipo 4 y 10% parecían ser infecciones mixtas (Pujol y col., 1997). Sin embargo, en estudios posteriores se observó que, luego de un período de 10 años, parece haber un indicio de sustitución del subgenotipo 1b, por el genotipo 2 (Pujol y Loureiro, 2007). A pesar de que el genotipo 1 (subtipo 1b) sigue siendo el prevalente en Venezuela, los autores muestran un claro aumento del genotipo 2,

con respecto a éste, especialmente la gran prevalencia del subtipo 2j (Sulbarán y col., 2010). Esto demuestra la dinámica que poseen los virus de ARN, incluso a nivel regional, mostrando la gran diversidad genética que alberga a estos virus en tan pocos períodos de tiempo, especialmente el VHC, para este caso.

A pesar de todos estos estudios, no se ha reportado que en Venezuela se haya publicado algún trabajo, un tanto más complejo, en donde se haya caracterizado al VHC a nivel de cuasiespecies. De manera que, la distribución de cuasiespecies de poblaciones del VHC a menudo es pasada por alto en estudios clínicos y experimentales (Pawlotsky, 2006). El hacer estudios a nivel de cuasiespecies tiene un valor significativo en el ámbito epidemiológico y de diagnóstico clínico, ya que provee una información adicional, que puede ser específica para cada paciente, de modo tal que pudiera hacerse, por ejemplo, más certero y eficiente un tratamiento antiviral.

c. Distribución de las cuasiespecies.

Se han realizado estudios sobre la presencia del VHC en distintos componentes o fluidos corporales, demostrando así la presencia de ARN del VHC en sangre (suero), tejido hepático, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), saliva, fluido crevicular, orina, ascitis, y otros fluidos y órganos (Luna y col., 2008; Liou y col., 1992; Maggi y col., 1997; Maticic y col., 2001, Bruns y col., 2009). Las diferentes distribuciones de mutantes son encontradas en diferentes órganos, o en sitios diferentes del mismo órgano dentro de un mismo individuo infectado (Domingo y col., 2006). De modo que, para estudiar la cuasiespecies virales debe hacerse a nivel de individuo, pero en sus distintos órganos y/o fluidos

corporales, ya que dependiendo de las cuasiespecies, éstas tendrán un tropismo mayor hacia ciertos órganos y/o fluidos; siendo esto una determinante muy importante para la administración de tratamientos antivirales.

Justificación

Desde que el virus de hepatitis C fue identificado en 1989, numerosos trabajos se han publicado, con respecto a este patógeno humano.

Su naturaleza de cuasiespecies dificulta la obtención de una vacuna, y la eficiencia del tratamiento se ve disminuida. Además, el estudio de las cuasiespecies es de gran valor epidemiológico y clínico, y muchas veces es pasado por alto.

Han sido reportado muchos trabajos de distribución de cuasiespecies entre los distintos compartimientos corporales, como la sangre, PBMCs, tejido hepático, entre otros. Aunque se ha reportado la presencia del VHC en saliva, no se ha hecho un estudio, más complejo, en donde se ponga de manifiesto la distribución de cuasiespecie en ese fluido.

En Venezuela, se hacen estudios de caracterización molecular a nivel poblacional, determinando genotipos y subtipos del VHC, mas no se ha realizado nunca la caracterización molecular a nivel de individuo, para determinar cuasiespecies

Objetivos.**General:**

Determinar la presencia de cuasiespecies del VHC en suero y saliva de pacientes infectados con el VHC en fase crónica de la hepatitis C.

Específicos:

1. Caracterizar molecularmente al Virus de Hepatitis C (VHC) en diferentes fluidos corporales (suero y saliva) de pacientes infectados crónicamente, mediante el análisis de la secuencia consenso de la región 5'-NC y NS5B.
2. Analizar la presencia de cuasiespecies del VHC en los distintos fluidos corporales (suero y saliva) mediante el análisis de la secuencia de clones de amplicones de la región NS5B.

Materiales y Métodos.

En general, para llevar a cabo los objetivos propuestos en el estudio, se tomó muestras de suero y saliva de pacientes diagnosticados en fase crónica de la hepatitis C, y sin tratamiento.

Un total de 44 muestras (22 de suero y 22 de saliva), provenientes de 22 pacientes (todos positivos para anticuerpos anti-VHC) que aceptaron y firmaron bajo consentimiento informado, aprobado por el comité de bioética del IVIC (ver Anexos), cedió una muestra de cada fluido; estas muestras fueron facilitadas por la Dra. Carmen de Olival (Hospital Domingo Luciani).

Este estudio fue financiado por los fondos FONACIT y LOCTI, número G-2005000394.

En estos fluidos se ha reportado la presencia del ARN del VHC (Luna y col., 2008; Liou y col., 1992; Maticic y col, 2001; Bruns y col., 2009), siendo la muestra de suero la que presenta mayor facilidad para la detección del ARN-VHC (Guarner y Enríquez, 2008).

El suero es el componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación de ésta, y eliminar el coágulo de fibrina y otros componentes (Randall y col., 1998).

La saliva, es una mezcla compleja de las secreciones de las glándulas salivales parótida, submandibular y sublingual, que se mezcla con las bacterias, leucocitos, células epiteliales descamadas, y el fluido crevicular (Tenovuo, 1989).

1) Extracción del ARN.

La extracción del ARN puede realizarse usando una serie de reactivos y métodos bioquímicos o empleando estuches diseñados comercialmente. En nuestro trabajo, se utilizó el método de extracción del ARN viral con el estuche comercial de QIAGEN, debido a que el mismo ofrece un mayor rendimiento, una mayor pureza en cuanto a material genético aislado; además de reducir el tiempo de obtención del ARN por ser un procedimiento sencillo.

La extracción del ARN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del estuche de extracción de ARN viral, QIAamp Viral RNA Mini Kit for purification of viral RNA (QIAGEN Inc.), partiendo de 140 μ L de la muestra de saliva y/o suero obtenido por punción venosa en tubos sin anticoagulante y separado mediante centrifugación.

2) Transcripción inversa.

La transcripción inversa se realizó para dos regiones distintas del genoma del VHC (5'-NC y NS5B). La mezcla para realizar la transcripción inversa, consistió en el uso de: la enzima Moloney Murine Leukemia virus Reverse Transcriptase (M-MLV- RT) [200 U/ μ L] (Invitrogen), que induce la formación de una hebra de ADN complementaria a la cadena de ARN aislada; la proteína RNase Out [10 U/ μ L] (Invitrogen), que inhibe las posibles ribonucleasas que puedan degradar el material genético; el tampón 5X [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂] (Invitrogen), que provee el medio iónico para la enzima M-MLV-RT; el DTT (Ditiotreitol) [0,1 M] (Invitrogen), que garantiza que la cadena de ARN a ser

transcrita permanezca lineal para la hibridación de los oligonucleótidos; los dNTPs, dNTP Set, PCR Grade [100 mM] (Invitrogen), que proveen las bases necesarias para la extensión de la cadena a amplificar y el oligonucleótido iniciador de sentido inverso a la hebra de ARN del virus (específico para cada región).

Para la región 5'-NC, se tomó 10 μ L del ARN aislado (QIAamp Viral RNA Mini Kit), se mezcló con la solución A (1 μ L RNase Out, 1 μ L oligonucleótido 209 [10 μ M], 8 μ L de agua destilada) en un tubo de microcentrifuga, y se incubó a 65 $^{\circ}$ C por 10 minutos, esto ayudó a que el bucle de la región 5'-NC del ARN viral perdiera su conformación, luego se enfrió hasta 4 $^{\circ}$ C y se le realizó una centrifugación breve, posteriormente se añadió a la mezcla 10 μ L de la solución B (6 μ L Tampón 5X, 3 μ L DTT, 3 μ L dNTPs [10 mM], 1 μ L M-MLV-RT), se centrifugó brevemente y se incubó por 1 hora a 37 $^{\circ}$ C; finalmente se congeló por 10 minutos como tiempo mínimo para detener la acción de la enzima M-MLV-RT.

Para la región NS5B, se tomó 10 μ L del ARN aislado, se mezcló con la solución AB (0,5 μ L RNase Out, 3 μ L Tampón 5X, 3 μ L DTT, 2 μ L dNTPs [10 mM], 1 μ L M-MLV-RT, 1 μ L oligonucleótido 8645n [10 μ M] y 9,5 μ L de agua destilada), se llevó a incubación por 1 hora a 37 $^{\circ}$ C y finalmente se congeló por 10 minutos.

3) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se utilizó una PCR anidada, una variante de la PCR convencional que se realiza en dos rondas de amplificación, utilizando un par de oligonucleótidos iniciadores diferentes para cada ronda y para las regiones seleccionadas del genoma del virus. La enzima utilizada fue la Platinum *Taq* DNA Polymerase [5

U/mL] (Invitrogen). Los oligonucleótidos iniciadores y los parámetros de la PCR que se utilizaron en este trabajo, son los mismos utilizados por Pujol y Loureiro, 2007 y Sulbarán y col., 2010.

El programa de amplificación para la Región 5'-NC del VHC (para la primera y la segunda ronda) se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Parámetros de la PCR para la región 5'-NC.

Paso	Proceso	Temperatura	tiempo
1	Desnaturalización	94 °C	10 min
2	Desnaturalización	94 °C	1 min
3	Hibridación	50 °C	35 seg
4	Extensión	68 °C	2 min
5	Ir al paso 2 por 24 veces		
6	Extensión	68 °C	7 min
7	Almacenamiento	4 °C	Continuo

El programa de amplificación para la Región NS5B del VHC (para la primera y la segunda ronda) se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Parámetros de la PCR para la región NS5B para la primera y segunda ronda de amplificación.

Paso	Proceso	Temperatura	tiempo
1	Desnaturalización	94 °C	4 min
2	Desnaturalización	94 °C	1 min
3	Hibridación	50 °C ^{*1}	1 min
4	Extensión	72 °C	2,5 min
5	Ir al paso 2 por 35 veces		
6	Extensión	72 °C	10 min
7	Almacenamiento	10 °C	Continuo

^{*1} Para la segunda ronda de amplificación, se utilizó una temperatura de hibridación de 55 °C.

La composición de los distintos oligonucleótidos iniciadores se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de las distintas regiones de VHC.

Región	Ronda	Oligonucleótidos iniciadores.	Secuencia
5'-NC	Primera	HCV 209 (a)	5'-ATACTCGAGGTGCACGGTCTACGAGACCT -3'
		HCV 211 (a)	5'- CACTCTCGAGCACCCCTATCAGGCAGT -3'
	Segunda	HCV 939 (a)	5'- CTGTGAGGAACTACTGTCTT -3'
		HCV 940 (a)	5'- TTCACGCAGAAAGCGTCTAG -3'
NS5B	Primera	HCV 8645N (b)	5'- GGCGGAATTCCTGGTCATAGCCTCCGTGAA -3'
		HCV 8245P (b)	5'- TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGYTTYGA -3'
	Segunda	HCV 8645N (b)	5'- GGCGGAATTCCTGGTCATAGCCTCCGTGAA -3'
		HCV 8276P (b)	5'- CTCCACAGTCACTGAGAGCGACAT -3'

(a) Chan y col., 1992. (b) Radkowski y col., 2001.

4) Electroforesis en geles submarinos de agarosa al 1,5%.

Los productos amplificados por PCR, fueron analizados en geles de agarosa ultra pura al 1,5%. Los geles se prepararon disolviendo Agarosa Ultra Pura (Invitrogen) en tampón TBE (1X): Tris base [10,6 g/L], ácido bórico [5,5 g/L], EDTA [0,5 M] (pH 8,0), mediante calor, se añadió el bromuro de etidio (BrEt) [10 mg/mL] y se agregó a un molde permitiendo el enfriamiento y la solidificación. Posteriormente el gel se sumerge en la cámara de electroforesis, conteniendo tampón TBE para la corrida. Las muestras se colocaron en los pocillos del gel, previamente mezcladas con una solución de carga (concentrado 6x): azul de bromofenol, xilencianol, glicerol, que aumenta la densidad de la muestra y permite estimar el nivel de la corrida. Es importante colocar un marcador de peso molecular, Marcador de Peso Molecular 1 Kb plus [1 µg/µL] (Invitrogen), como patrón de referencia, para comparar el margen de corrida de las muestras. Se empleó una diferencia de voltaje para la electroforesis (120 Voltios) y finalmente la observación de los geles se realizó en un transiluminador de luz UV, ya que el BrEt se intercala en las hebras de ADN y emite fluorescencia cuando es expuesto con luz UV, permitiendo evidenciar la presencia del producto amplificado y estimar su tamaño al compararlo con un patrón conocido. Productos amplificados y visualizados como una banda de 250 pb, pertenecen a la región 5'-NC, y una banda de 370 pb pertenece a la región NS5B. Los registros de los productos amplificados se realizaron mediante fotografía digital (OLYMPUS Model No. C3020 200M).

5) Purificación y cuantificación de los amplicones.

A partir de aquí, se realizó la purificación de los amplicones separados en las electroforesis, usando el estuche de purificación de productos de PCR de QIAGEN, QIAquick PCR Purification Kit, (QIAGEN Inc). Se purificaron los amplicones, según el protocolo del fabricante. Este proceso se requiere para eliminar el remanente de componentes de la PCR que puedan interferir en el proceso de secuenciación. Una vez obtenidos los productos purificados, se procedió a realizar una corrida electroforética en geles de agarosa (ver paso anterior), que permitió cuantificar, mediante comparación de la intensidad de fluorescencia del amplicón, la concentración de muestra purificada, con respecto a un control de fago lambda de concentración conocida.

6) Secuenciación.

Los purificados fueron enviados a secuenciar a la casa comercial MacroGen Inc. (Seúl, Corea). Estos realizan un método de secuenciación automatizada, usando una modificación del método de terminación de la cadena de Sanger, denominado secuenciación por terminador fluorescente, en donde cada uno de los dideoxinucleótidos está acoplado a un fluoróforo distinto, y emiten una fluorescencia a distintas longitudes de ondas al ser analizados por un láser durante la corrida de la muestra en una electroforesis capilar, lo que permite generar, en una sola corrida, una secuencia nucleotídica de la muestra enviada.

7) Análisis de Secuencias.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante los programas BioEdit y MEGA 4, para la comparación de los aislados del VHC obtenidos y los disponibles en el banco de genes (GenBank), ver Tabla IV, permitiendo la caracterización molecular de cada una de las muestras del VHC en los fluidos de cada paciente. Se realizó la construcción de árboles filogenéticos con el programa MEGA 4, utilizando el modelo evolutivo de distancias genéticas, Kimura dos parámetros (K-2P), y el método del vecino más cercano “Neighbour-Joining”, con un total de 1000 pseudorréplicas de arranque (“bootstrap”).

Tabla IV. **Secuencias de referencia del GenBank, de los distintos genotipos y algunos subtipos del VHC.**

Secuencias de referencia del GenBank			
Genotipos (5'-NC)		Subtipos (NS5B)	
1	D10749-1a	1a	C1116 1a (HM777063)
	M62321-1a	1b	C1105 1b (HM777185)
	D00172-1b	2a	C1726 2a (HM777247)
	D01217-1b	2b	C1103 2b (HM777252)
	D90208-1b	2c	C1117 2c (HM777351)
	D14853-1c	2j	C1114 2j (HM777264)
2	D00944-2a	3a	C1182 3a (HM777334)
	D01221-2b		
	D50449-2c		
	U81278-2vnz		
	U81279-2vnz		
3	U81280-2vnz		
	D28917-3a		
	D26556-3b		
4	U81283-3vnz		
	Y166044-4a		
	ay624983-4		
	ay673084-4		
	ay6730914		
5	U81284-4vnz		
	Sa1-5a		
6	D88476-6a		

8) Clonación de los productos de PCR.

Para la clonación, fueron utilizados los amplicones de la región 5'-NC y NS5B, previamente amplificadas y purificadas. De esta manera, se procedió a clonar dos regiones del VHC que difieren en cuanto a su tasa de incorporación de copias erradas al momento de la replicación. Teniendo así, una región más

conservada (5'-NC), y una región que es más variable o menos conservada (NS5B), y por ende, es más sensible para observar cuasiespecies del VHC. Los amplicones obtenidos de la región 5'-NC y NS5B del VHC circulante en cada fluido corporal de los distintos pacientes, fueron clonados utilizando el vector de clonación, pCR4-TOPO, que viene en forma linearizada, y contiene un residuo de deoxitimidina en cada uno de sus extremos 3', por lo cual está diseñado para ligar productos de PCR que hayan sido amplificados con una polimerasa que añada residuos de deoxiadenosina en sus extremos 3', luego del paso final de extensión, como es el caso de la Platinum *Taq* DNA Polymerase, por lo que puede lograrse la completación de las bases nitrogenadas, y se da la circularización del vector. Este plásmido contiene una región genómica de actividad lacZ (α), y está acoplado a una topoisomerasa que tiene actividad de ligasa dentro de sí. Además, contiene regiones codificantes que le confieren, a su célula hospedadora, resistencia a ampicilina y /o kanamicina, cuando es transcrito, traducido y expresado. La transformación se llevó a cabo en la cepa competente XL1-Blue de *Escherichia coli*. Se siguió el protocolo del estuche de clonación TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen), como sigue:

-Una vez obtenido el producto de PCR de las distintas regiones genómicas del VHC (5'-NC y NS5B), se realizó la reacción de clonación TOPO: 1) Se mezclaron los amplicones de cada región y el vector pCR4-TOPO; 2) se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente; 3) se realizó la transformación en células competentes XL1-Blue de *E. coli*; 4) se crecieron las células transformadas, en agar LB líquido, LB Broth (Sigma) a 37°C, con agitación constante, hasta ver

turbidez del medio; 5) por rastrilleo, se sembraron las células, en placas con agar LB sólido (Sigma), X-gal y kanamicina [50 µg/µL], y se dejó incubando a 37°C por 17 horas (formación de colonias de 1-2 mm de diámetro); 6) se seleccionaron las colonias (por selección blanco-azul), se aislaron, y se sembraron de nuevo (separadamente) en un tubo de 15 mL con 4 mL de agar LB líquido a 37° C, con agitación constante toda la noche; 7) se aisló el ADN plasmídico, mediante el método de aislamiento del recombinante, del estuche comercial AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (AXYGEN Biosciences), y se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* que flanquea y corta el sitio de inserción del producto de PCR, luego, se comprobó la presencia de un inserto de aproximadamente 300 pares de bases, para la región 5'-NC, y de 400 pares de bases para la región NS5B, mediante la visualización de un gel de agarosa, luego de una corrida electroforética, y se cuantificó por comparación de intensidad de la banda, con ADN de fago lambda de concentración conocida. Se mandó a secuenciar la región para evaluar la presencia de variantes utilizando los oligonucleótidos iniciadores universales (M13F y M13R).

9) Análisis de cuasiespecies.

Se realizó mediante el análisis de comparación de las secuencias de clones de amplicones de las distintas regiones del genoma del VHC.

Un total de 170 nucleótidos, aproximadamente, fueron seleccionados como la longitud de la secuencia a evaluar para determinar las variantes en la población viral. Una vez obtenidas las secuencias, se procesaron y se creó un archivo

multiFASTA. Se alinearon todas las secuencias por ClustalW en el programa BioEdit.

Se realizó la comparación entre secuencias, para observar las diferencias (al menos una mutación puntual) entre las secuencias consenso y entre los clones provenientes de las muestras de suero y saliva de un mismo paciente.

Un total de 10 secuencias (de cada muestra), seleccionadas al azar, se tomaron para evaluar la presencia de variantes en la población viral circulante en cada muestra de un mismo paciente.

Las cuasiespecies se evaluaron junto a su secuencia consenso (ya antes caracterizada) y usando secuencias de referencia del GenBank. Para ello, se procedió a realizar un árbol filogenético radial en el programa MEGA 4, usando el modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos Kimura dos parámetros (K-2P), y el método del vecino más cercano (Neighbour-Joining), con 1000 pseudorréplicas de arranque ("bootstrap"), con la finalidad de observar si existía alguna diferencia filogenética entre las distintas variantes genómicas.

Resultados

1. Caracterización molecular del VHC en pacientes infectados.

a. Amplificación de regiones del genoma del VHC en muestras de suero y saliva.

Se evaluaron 44 muestras de ADN complementario, provenientes de ARN viral de suero (22 muestras) y de saliva (22 muestras), amplificadas por RT-PCR-nested en la región 5'-NC y NS5B del VHC, de pacientes infectados en la fase crónica de la infección por el VHC. Para determinar la positividad de estas en la región 5'-NC y NS5B, se utilizaron oligonucleótidos iniciadores, específicos para cada región (Tabla IV).

En la Figura 4, puede observarse el resultado tras la corrida electroforética de las secuencias amplificadas, pertenecientes a las dos regiones del VHC amplificadas. Las bandas de aproximadamente 250 pb de longitud, pertenecen al amplificado de la región 5'-NC del VHC, tanto en la muestra de suero, como en la muestra de saliva. Las bandas de aproximadamente 370 pb de longitud, pertenecen al amplificado de la región NS5B del VHC, tanto en la muestra de suero, como en la muestra de saliva.

Se muestra sólo la amplificación de las muestras del VHC en suero y saliva del paciente 20, como representación gráfica de lo que se logró amplificar en los distintos pacientes, lo cual está resumido en la Tabla V.

Como control positivo de la infección, o de la presencia de ARN del VHC en cada individuo, se fijó la presencia de un fragmento amplificado de la región 5'-NC

en suero, mediante la visualización del amplicón en un gel de agarosa, tras la corrida electroforética. De manera que, aquellas muestras que resultaron positivas para esta región en suero, fueron utilizadas para la caracterización molecular a nivel de genotipos. Para algunas muestras positivas en suero, no pudo obtenerse la secuencia, sin embargo, resultaron positivas en saliva, y fueron usadas para la caracterización molecular. Las muestras de saliva y suero del paciente 12, resultaron positivas solo en la región NS5B y no en la 5'-NC, por lo cual no es tomada en cuenta para la caracterización molecular con la región 5'-NC, pero sí para la caracterización a nivel de subtipos.

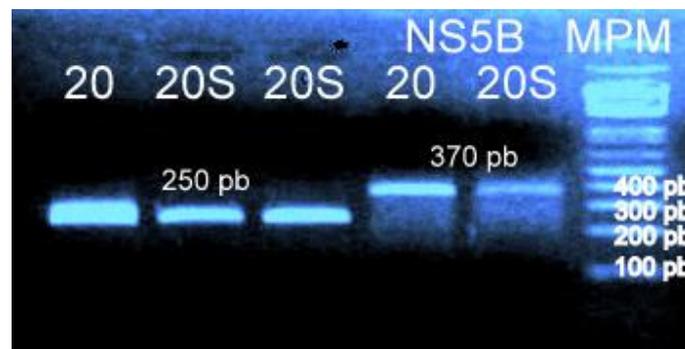


Figura 4. **Gel de agarosa (1,5%) de amplicones de la región 5'-NC y NS5B del VHC.** Se muestra la amplificación de dos fragmentos con distintos pesos moleculares, de dos regiones del VHC, en las muestras de suero y saliva del paciente 20 (20, suero; 20S, saliva). Marcador de peso molecular (MPM) 1Kpb Plus Ladder (Invitrogen).

Tabla V. **Muestras de suero y saliva positivas en las distintas regiones del genoma del VHC.** Se muestra los pacientes que resultaron positivos (+) y negativos (-) para las distintas regiones del VHC, para los cuales, luego, los amplicones fueron purificados, cuantificados y mandados a secuenciar.

Paciente	Muestra			
	Suero		Saliva	
	5'-NC	NS5B	5'-NC	NS5B
1	+	-	-	-
2	-	-	-	-
3	+	+	+	-
4	+	-	+	-
6	+*	-	-	-
7	+*	-	+	-
8	+	+	-	-
9	+	+	+	-
10	-	-	-	-
11	+	-	+	-
12	-	+	-	+*
13	+	-	-	-
14	+	+	+	-
15	+	+	-	-
16	+	-	+	-
17	-	-	-	-
18	+*	-	-	-
19	-	-	-	-
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	-	-	-	-
23	+	-	-	-
TOTAL	16/22 positivos	8/22 positivos	9/22 positivos	3/22 positivos
TOTAL	17/22 positivos 77%		10/22 positivos 45%	

*Estas muestras resultaron positivas al analizar el gel de electroforesis, sin embargo, la secuencia resultó de muy baja calidad, por lo cual no pudieron ser adoptadas para la caracterización molecular. La muestra 5 no existe.

De las 22 muestras analizadas (todas positivas para anticuerpos anti-VHC), se obtuvo un total de 17 positivos para la presencia de ARN del VHC (tomando en cuenta la muestra 12, que no resultó positiva para las región 5'-NC). Esto es 77% de presencia de ARN-VHC en la población estudiada, ver Tabla V.

En la Figura 5, se muestra la purificación de amplicones de la región 5'-NC del VHC, de muestras de suero y saliva del paciente 20, como representación del resultado de la purificación de las distintas muestras que resultaron positivas en el estudio (Tabla V). Se compararon con un patrón de marcador de peso molecular (MPM), y con un patrón de ADN de fago lambda para cálculo de concentraciones cualitativamente.

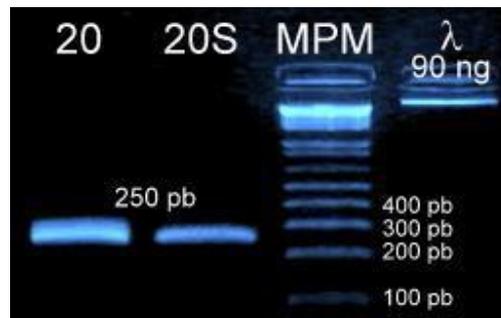


Figura 5. **Gel de agarosa (1,5%) de amplicones purificados de la región 5'-NC del VHC.** Purificado de amplicón de un fragmento de la región 5'-NC del VHC de distintos fluidos corporales (suero, 20; saliva, 20S) de un mismo paciente. Marcador de peso molecular (MPM) 1Kpb Plus Ladder y fago lambda (λ) de concentración conocida (30ng/ μ L).

En la Figura 6, se muestra la purificación de amplicones de la región NS5B del VHC, de muestras de suero y saliva del paciente 20, como representación del resultado de la purificación de las distintas muestras que resultaron positivas en el

estudio (Tabla V). Se comparan con un patrón de marcador de peso molecular (MPM), y con un patrón de ADN de fago lambda para cálculo de concentraciones cualitativamente.

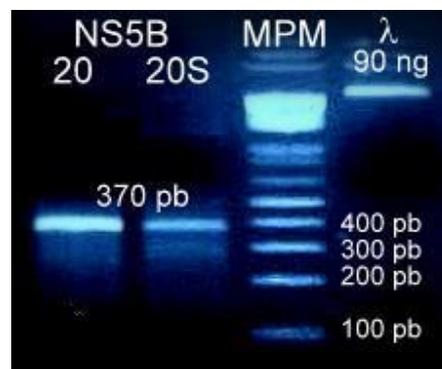


Figura 6. **Gel de agarosa (1,5%) de amplicones purificados de la región NS5B del VHC.** Purificado de amplicón de un fragmento de la región NS5B del VHC de distintos fluidos corporales (suero, 20; saliva, 20S) de un mismo paciente. Marcador de peso molecular (MPM) 1Kpb Plus Ladder y fago lambda (λ) de concentración conocida (30ng/ μ L).

Tabla VI. **Concentraciones de los amplicones purificados, correspondientes a regiones del genoma del VHC.** Se muestra la concentración en ng/ μ L de los purificados obtenidos, tras la verificación de su amplificación en un gel de agarosa, como el de la Figura 4.

Paciente	Muestra			
	Suero		Saliva	
	5'-NC [ng/ μ L]	NS5B [ng/ μ L]	5'-NC [ng/ μ L]	NS5B [ng/ μ L]
1	20			
3	22	25	15	
4	18		15	
6	20			
7	20		20	
8	15	10		
9	25	10	20	
11	25		20	
12		15		15
13	18			
14	25	7	10	
15	15	10		
16	25		20	
18	25			
20	25	15	15	10
21	30	25	25	4
23	30			

b. Secuenciación y análisis de secuencias.

Antes de proceder a la secuenciación, los productos amplificados fueron purificados y se calculó su concentración cualitativamente, mediante la comparación de la intensidad de la banda purificada, con respecto a un ADN control de fago lambda de concentración conocida. Las concentraciones obtenidas, se muestran en la Tabla VI.

Utilizando estas concentraciones (Tabla VI), fue posible enviar a secuenciar los productos purificados de las distintas muestras, al servicio de secuenciación, Macrogen Inc, el cual, para nuestro caso, requiere de la concentración de cada muestra. Macrogen Inc, utilizó el método de terminación de la cadena de Sanger modificado. Los resultados de las secuencias se muestran como un gráfico de la corrida electroforética capilar, en donde, dependiendo de la concentración de un nucleótido en cierta posición de la secuencia, se observa un pico de un color distinto. Este gráfico se denomina electroferograma, y cada uno de los picos que se muestra en este (perteneciente a las 4 bases nitrogenadas del ADN), viene dado por un color distinto (un color para cada base). Además, el resultado viene acompañado de la secuencia nucleotídica, de manera que se puede comparar el resultado de la secuencia del gráfico, con la secuencia nucleotídica (representada con letras, A para adenosina monofosfato, T para timidina monofosfato, C para citosina monofosfato, G para guanosina monofosfato), ver Figura 7.

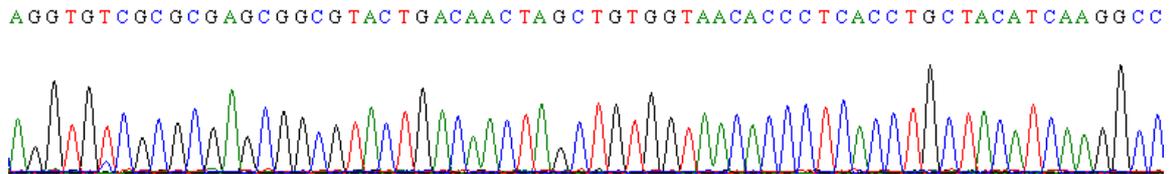


Figura 7. **Electroferograma de un fragmento de la secuencia de la región NS5B del VHC.** Se muestra la representación gráfica de un fragmento de la secuencia de NS5B del VHC circulante en suero, del paciente 20. Los picos muestran la absorbancia nucleotídica al momento de la corrida en la secuenciación. Los picos rojos pertenecen a la timidina monofosfato, los verdes a la adenosina monofosfato, los azules a la citosina monofosfato, y los negros a la guanosina monofosfato. Arriba de cada uno de los picos, se muestra la secuencia nucleotídica (representada con letras).

Las secuencias fueron analizadas mediante el uso del programa BioEdit, el cual reconoce el formato de secuencias provenientes de Marcogen Inc. (.ab1), y lo permite editar y transformar en formato de texto FASTA (.fas), con el cual puede hacerse más fácil la manipulación de la secuencia, y su posterior interpretación. De esta forma, se procedió a realizar el archivo MultiFASTA, el cual contiene todas las secuencias analizadas y editadas, pertenecientes a cada región amplificada del genoma del VHC, y se añadió secuencias de referencia de distintos genotipos (región 5'-NC) y subtipos (región NS5B), provenientes del GenBank (Tabla IV), para su posterior alineamiento y caracterización.

c. Caracterización molecular a nivel de genotipos y subtipos.

Para realizar la caracterización molecular de las secuencias provenientes de amplificados por PCR de las regiones 5'-NC y NS5B del VHC circulante en las muestras positivas de suero y saliva de cada paciente infectado, se procedió a

realizar un alineamiento del archivo MultiFASTA, por alineamiento multiple ClustalW, usando el programa MEGA 4.

Para la región 5'-NC, se tomaron las 22 muestras resultantes positivas (Tabla V), tanto en suero como en saliva, y se alinearon con 22 secuencias de referencia (Tabla IV), provenientes del GenBank, en las cuales están contenidos los distintos genotipos pertenecientes al VHC, para tener así 6 secuencias de referencia del genotipo 1, 6 del genotipo 2, 3 del genotipo 3, 5 del genotipo 4, 1 del genotipo 5 y 1 del genotipo 6.

Una vez alineadas las secuencias, y teniéndolas con una misma longitud, se realizó el árbol filogenético para asignar el genotipo al cual pertenecía cada muestra. Así, se obtuvo el árbol filogenético que muestra los genotipos que predominaron en este estudio (Figura 8).

De las 22 muestras analizadas filogenéticamente para la caracterización molecular, usando la región 5'-NC, un total de 15 muestras resultaron ser genotipo 1, y 7 resultaron pertenecer al genotipo 2. No se observó algún otro genotipo dentro de este estudio.

Sólo a las muestras provenientes de 14 pacientes se les pudo hacer caracterización molecular con la región 5'-NC, de los cuales 9 resultaron estar infectados con genotipo 1, y 5 con genotipo 2.

Para un mismo paciente, las muestras del VHC circulante en suero, que resultaron ser clasificadas como genotipo 1, también resultaron ser genotipo 1 en la saliva. Al igual que, aquellas que resultaron ser clasificadas como genotipo 2 en suero, en la saliva también lo fueron (Figura 8).

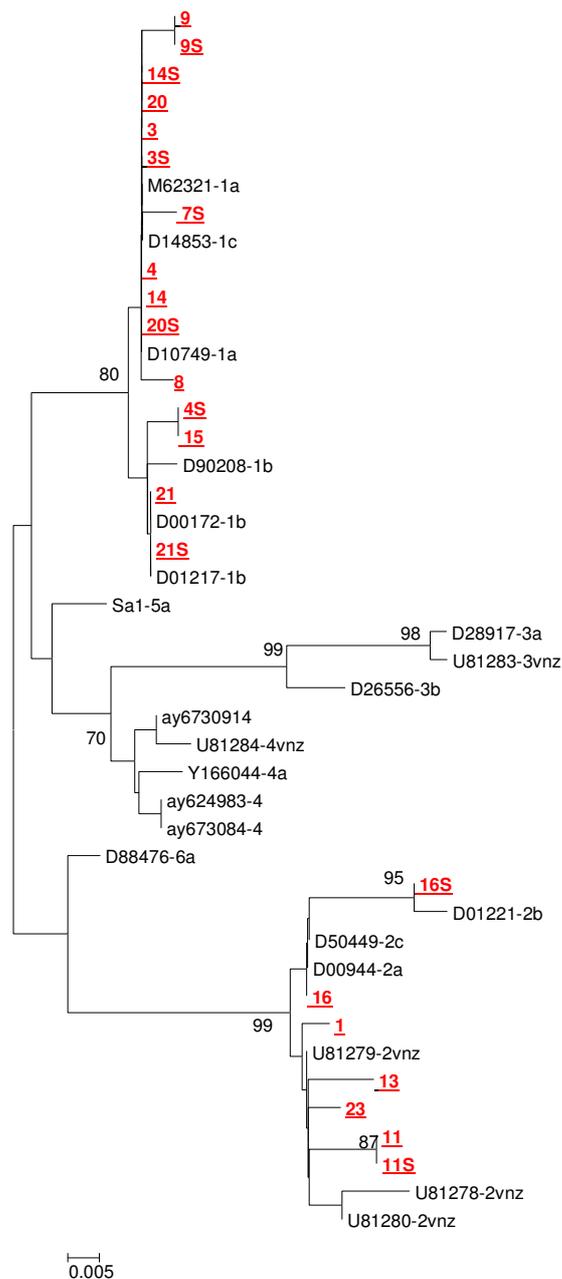


Figura 8. **Árbol filogenético de la región 5'NC del VHC. Caracterización molecular a nivel de genotipos.** Se analizaron las secuencias de este estudio (en rojo y subrayado), con respecto a controles de genotipos, provenientes del GenBank (en negro). Para la construcción de cada árbol, se utilizó el método de Neighbour-Joining (NJ) y se calcularon las distancias genéticas por el modelo de Kimura dos parámetros (K-2P), usando 1000 pseudorréplicas (“bootstrap”).

Para la región NS5B, se tomaron las 10 muestras resultantes positivas (Tabla V), tanto en suero como en saliva, y se alinearon con 7 secuencias de referencia (Tabla IV), provenientes del GenBank, en las cuales están contenidos algunos de los distintos subtipos pertenecientes al VHC. De manera que, solo se incluyeron en el alineamiento las secuencias patrones de los subtipos 1a y 1b, dentro del genotipo 1; los subtipos 2a, 2b, 2c y 2j, dentro del genotipo 2; y el subtipo 3a, dentro del genotipo 3.

De las 10 muestras analizadas filogenéticamente, todas pertenecientes al genotipo 1, para la caracterización molecular con la región NS5B, 8 muestras resultaron pertenecer al subtipo 1a, y 2 resultaron pertenecer al subtipo 1b (Figura 9).

De un total de 8 pacientes, a cuyas muestras se les hizo caracterización molecular usando la región NS5B del VHC, 7 resultaron estar infectados con el subgenotipo 1a, y 1 con el subgenotipo 1b (Figura 9). Esto es, 88% (7/8) y 12 % (1/8) de prevalencia de los subtipos 1a y 1b del VHC en las muestras de distintos pacientes, analizadas que resultaron positivas para la NS5B.

En resumen, de los 15 pacientes a quienes se les realizó el análisis de suero y saliva para la caracterización molecular del VHC con las distintas regiones genómicas, un total de 10 (67%) pacientes resultaron estar infectados con el genotipo 1 y 5 (33%) con el genotipo 2.

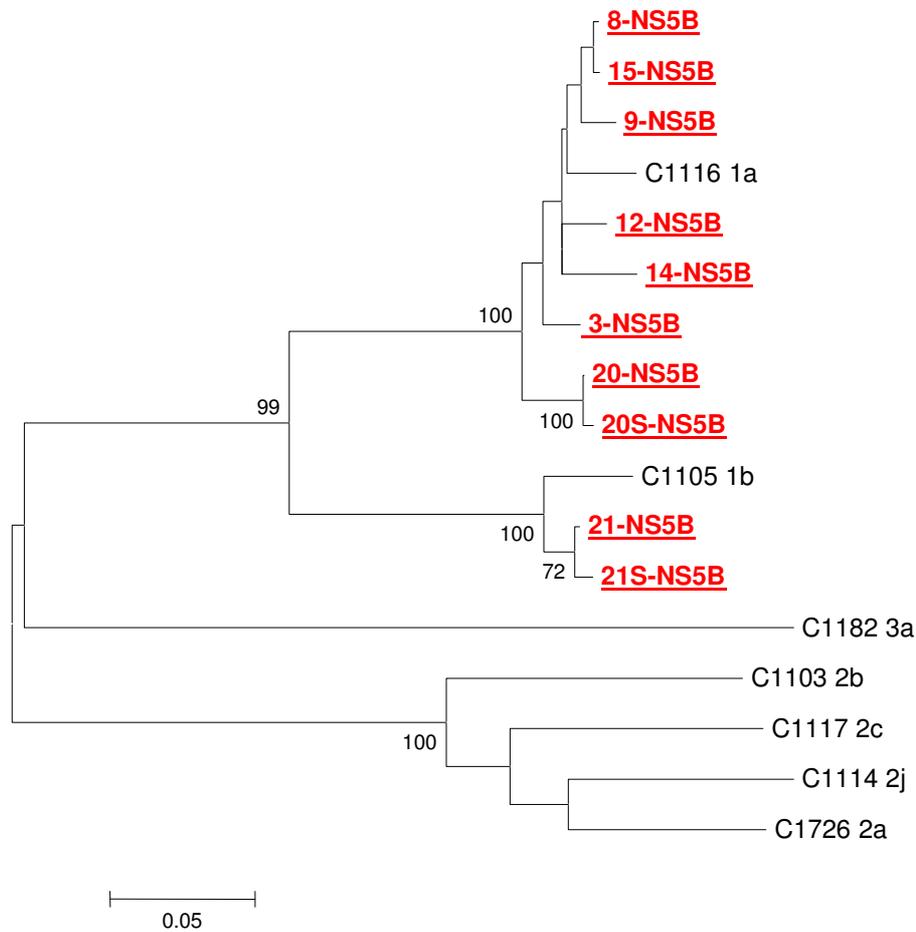


Figura 9. **Árbol filogenético de la región NS5B del VHC. Caracterización molecular a nivel de subtipos.** Se analizaron las secuencias de este estudio (en rojo y subrayado), con respecto a controles de subtipos, provenientes del GenBank (en negro). Para la construcción de cada árbol, se utilizó el método de Neighbour-Joining (NJ) y se calcularon las distancias genéticas por el modelo de Kimura dos parámetros (K-2P), usando 1000 pseudorréplicas (“bootstrap”).

Al comparar los árboles de la región 5'-NC y la NS5B, resulta claro que la región NS5B es mejor para determinar tanto subtipos, como genotipos, puesto que los valores de “bootstrap” arrojan mayor porcentaje de confiabilidad que la 5'-NC.

2. Análisis de cuasiespecies de las regiones genómicas del VHC circulante en suero y saliva de un mismo paciente.

a. Clonación, secuenciación, y análisis de secuencias de amplicones de las regiones 5'-NC y NS5B.

Dos pacientes (VHC+) resultaron positivas al amplificar en las dos regiones, tanto en la muestra de suero, como saliva (Tabla V). Estas muestras, que pertenecieron a los pacientes 20 y 21, fueron seleccionadas para la clonación de los amplicones de las regiones del genoma del VHC circulante en suero y en saliva.

Una vez obtenidos los clones de los amplicones, se verificó la presencia de los amplicones insertos y clonados en el vector plasmídico, mediante una digestión con enzimas de restricción, y electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 10). Se llevó a cabo el cálculo de la concentración cualitativamente, por comparación de intensidad de bandas, usando el ADN de fago lambda de concentración conocida, como descrito anteriormente

La digestión permitió evidenciar la presencia de un fragmento de aproximadamente 300 y 400 pb para la región 5'-NC y NS5B, respectivamente.

En la Figura 10, sólo se muestra la digestión de plásmidos con el inserto de la región NS5B clonada.

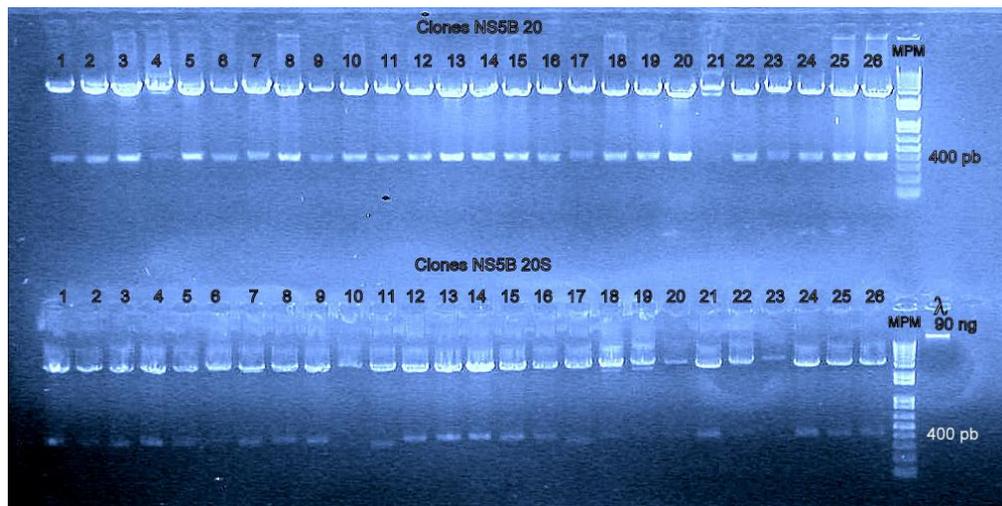


Figura 10. **Gel de agarosa (1%) de la digestión de plásmidos con insertos de los amplicones de la región NS5B del VHC.** Se muestran las digestiones realizadas a los plásmidos de cada colonia, para verificar la presencia de un inserto de 400 pb aproximadamente, perteneciente a la región NS5B del VHC. Marcador de peso molecular (MPM) 1Kpb Plus Ladder y fago lambda (λ) de concentración conocida (30ng/ μ L).

Luego de verificada la presencia del inserto del fragmento de 5'-NC y NS5B en las distintas clonas, se procedió a secuenciar el plásmido completo, utilizando el servicio de secuenciación de la casa Macrogen Inc.

Los resultados de la secuenciación se obtuvieron, y se procedió a realizar un alineamiento del archivo MultiFASTA, por alineamiento multiple ClustalW, usando el programa BioEdit, tanto para la muestra 20 y 20S de la región NS5B (Figura 13), como para la muestra 21 y 21S de la región 5'-NC (Figura 11) y NS5B (Figura 14). Estas muestras pertenecen al genotipo 1 del VHC, pero a distintos subtipos. La muestra 20 y 20S pertenecen al subtipo 1a, mientras la muestra 21 y 21S pertenecen al subtipo 1b. Por lo cual se realizó un alineamiento entre estas,

en la región NS5B, para evidenciar las diferencias que existen entre los distintos subtipos de un mismo genotipo del VHC (Figura 15), y así complementar el punto de caracterización molecular, con el de análisis de cuasiespecies.

Los resultados del alineamiento, permitieron poner en evidencia la gran variabilidad que tiene la región NS5B con respecto a la 5'-NC de un mismo paciente. En el caso de las variantes de la cuasiespecie de la región 5'-NC, la heterogeneidad de las variantes fue menor, que la heterogeneidad de las variantes de la cuasiespecie en la región NS5B de las muestras de un mismo paciente.

La realización de un árbol filogenético que contiene las secuencias de los clones de amplicones de la región NS5B del VHC que circula en suero y saliva de un mismo paciente, permitió caracterizar a cada una de las clonas, con la finalidad de evidenciar si existe alguna variante que pueda ser clasificada, por su porcentaje de variabilidad, en, al menos, un subtipo distinto (Figura 18).

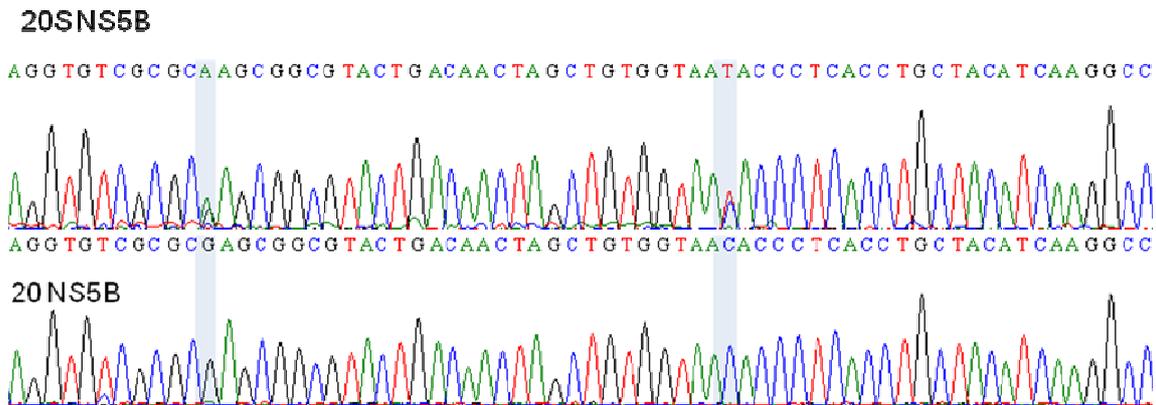


Figura 12. **Comparación de la secuencia consenso de nucleótidos y del electroferograma perteneciente a la región NS5B del VHC que circula en suero y en saliva de un mismo paciente.** Se muestra la representación gráfica de un fragmento de la secuencia de NS5B del VHC circulante en suero (abajo) y saliva (arriba), del paciente 20. La línea en azul, indica la base de la secuencia de NS5B que varía entre un fluido y otro.

El análisis de los electroferogramas de las secuencias consenso, ofrecen evidencia de la variabilidad genómica que hay entre las muestras del VHC que circula en suero y saliva de un mismo paciente. Se observa una sobreposición de picos de absorbancia, en donde las bases de esa posición en la secuencia, se encuentran en más o menos la misma proporción en todas las variantes de la cuasiespecie (Figura 12).

En la Figura 13 y la Figura 14, se hace más evidente cual es la secuencia que predomina en la población viral que circula en cada fluido, y se observa la frecuencia de mutación que tiene una base, y mediante el análisis del electroferograma (Figura 12), se puede inferir, la proporción de mutación en esa posición nucleotídica (Figura 13, indicado con flechas).

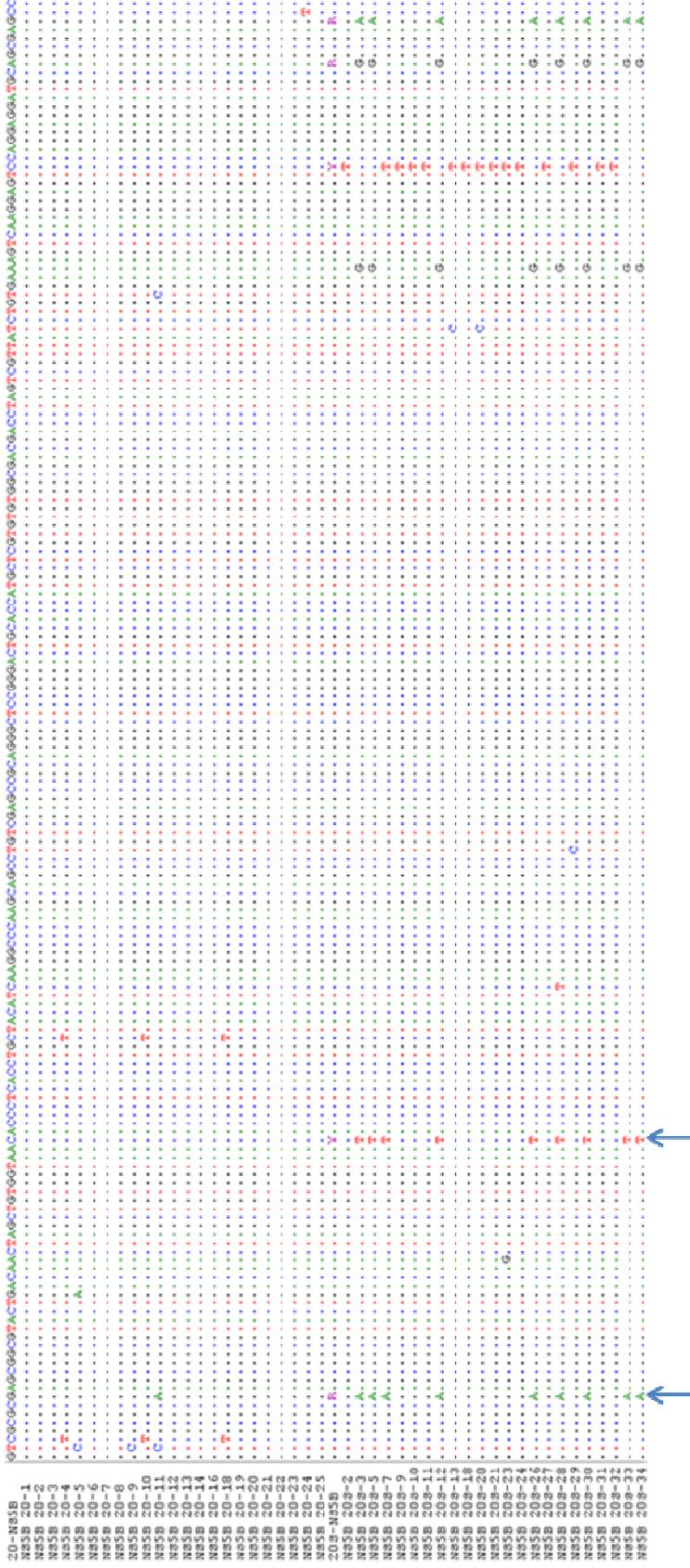


Figura 13. Alineamiento de secuencias de clones de amplicones de la región NS5B del VHC presente en suero y saliva del paciente 20. Se comparan 23 secuencias de clones de amplicones de la región NS5B del VHC con la secuencia consenso perteneciente al virus que se replica en suero y al que se replica en saliva. Las 23 secuencias de cada muestra se escogieron al azar. Las secuencias consenso se muestran como 20 para suero y 20S para saliva. Los clones de estas, se muestran con un número, luego de un guión. En la secuencia consenso 20S, las letras R y Y, representan universalmente a la presencia de dos distintos nucleótidos. La letra R representa la aparición de una guanosina (G) o una adenosina (A) en esa misma posición de la secuencia. La letra Y representa la aparición de un citosina (C) o un timidina (T) en esa misma posición de la secuencia. Los puntos representan alineamiento de bases. La flecha señala el nucleótido en donde se observó diferencia de bases en el electroferograma de la Figura 12.

En la Figura 15, se muestra la cantidad de variantes que contiene cada una de las cuasiespecies. De manera que, para la muestra 20, en la saliva se encontraron 4 variantes de diez secuencias analizadas, mientras que en el suero hubo 5 variantes de las diez analizadas. Para la muestra 21, se encontraron 4 variantes en saliva de diez analizadas, y 8 variantes en suero de las diez analizadas. Se hace evidente que, la mayoría de las mutaciones que se dan, son transiciones, en donde una purina es sustituida por una purina, y una pirimidina es sustituida por una pirimidina.

20-NS5B	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-2	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-3	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-4	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-7	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-9	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-12	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-13	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-19	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-21	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20-23	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
20S-NS5B	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-5	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-7	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-13	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-18	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-21	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-24	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-26	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-28	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-30	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_20S-33	R	E	E	A	I	Y	C	C	D	L	P	A	A	V	A	I	S	L	E	R	L	V	G	G	F	L	S	S	G	I	C	G	Y	R	R	C	A	S	G	V	L	T	T	S	C	G	T	L	C	Y	I	A	A	A	C	R	A	A	G	L	R	D	C	M	L	V	C	G	D

Figura 16. Alineamiento de un fragmento de las secuencias de aminoácidos, provenientes de los clones de amplicones de la región NS5B del VHC, de las muestras de suero y saliva de un mismo paciente con VHC genotipo 1, subtipo 1a (paciente 20). Los signos de interrogación en la secuencia consenso 20S, se deben a las ambigüedades R y Y en nucleótidos, en orden respectivo, como en la Figura 11. Estos representan mutaciones sinónimas.

21-NS5B	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-2	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-5	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-6	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-7	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-8	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-9	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	V	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-10	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-15	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-18	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21-20	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
21S-NS5B	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-2	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-5	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-6	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	V	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-11	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-12	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	V	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-13	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-18	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-20	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	V	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D
NS5B_21S-23	R	V	E	E	I	Y	Q	C	D	L	A	P	E	A	R	L	A	I	R	S	L	E	R	L	I	G	G	L	T	S	R	G	L	D	G	Y	R	R	C	R	A	S	G	V	L	T	S	C	G	L	I	C	Y	L	K	A	A	A	C	A	A	A	L	D	C	M	L	V	C	G	D

Figura 17. Alineamiento de un fragmento de las secuencias de aminoácidos, provenientes de los clones de amplicones de la región NS5B del VHC, de las muestras de suero y saliva de un mismo paciente con VHC genotipo 1, subtipo 1b (paciente 21).

La Figura 16 y la Figura 17, son los alineamientos obtenidos por ClustalW, para la secuencia de aminoácidos de las secuencias amplificadas y clonadas de un fragmento de la región NS5B del VHC que circula en el suero y la saliva de los pacientes infectados. A nivel de secuencia de aminoácidos, las diferencias son notablemente menores, comparado con la alineación a nivel de nucleótidos (Figura 12 y 14, respectivamente), de los mismos pacientes. La mayoría de las mutaciones resultaron ser sinónimas.

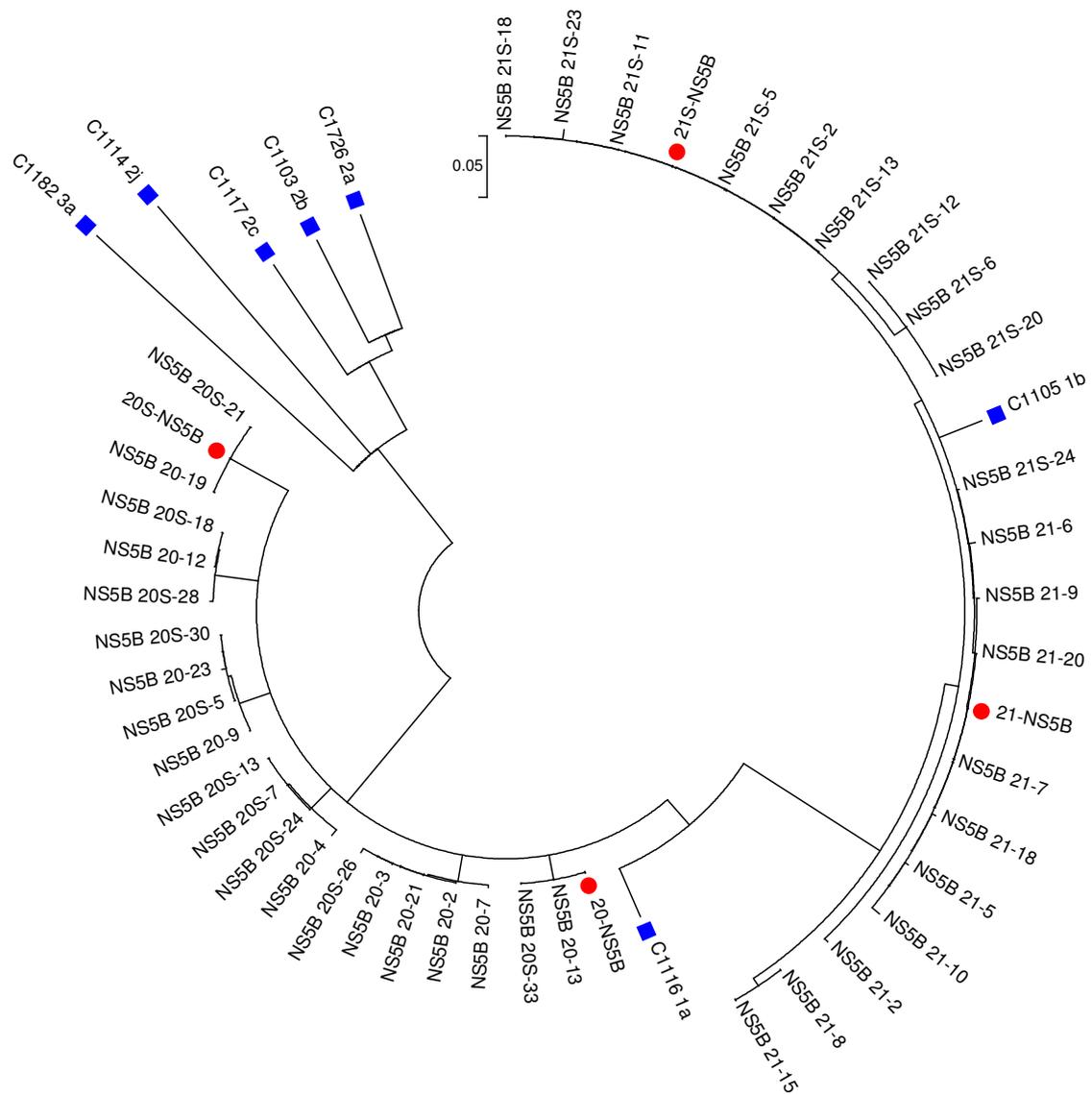


Figura 18. **Árbol filogenético radial, de las variantes de la región NS5B del VHC que infectan a un mismo individuo (cuasiespecies).** Se analizaron las secuencias de este estudio, clones de amplicones de la región NS5B del VHC que circula en suero y saliva de dos pacientes distintos, con respecto a controles de subtipos, provenientes del GenBank (identificadas con un cuadro azul). Las secuencias consenso de cada muestra, están identificadas por un punto rojo. Para la construcción de cada árbol, se utilizó el método de Neighbour-Joining (NJ) y se calcularon las distancias genéticas por el modelo de Kimura dos parámetros (K-2P), usando 1000 pseudorréplicas (“bootstrap”).

Como se observa en la Figura 18, no hubo diferencias en la determinación de los subtipos de cada clona. Todos las clonas de la región NS5B del VHC circulante en suero y en saliva del paciente 20 y 21, siguieron perteneciendo al subtipo 1a y 1b, respectivamente, al igual que su secuencia consenso.

Las cuasiespecies de saliva y suero no se separan en clados distintos. Además, no se observó un agrupamiento de las variantes. Las variantes se encontraron intrincadas en un mismo clado.

Discusión.

En este estudio, se logró la amplificación de las regiones 5'-NC y NS5B del genoma del VHC, en muestras de suero y saliva infectadas con el virus. Se observó que la sensibilidad de amplificación es mucho mayor en la región 5'-NC, puesto que es una región más conservada, además, esta sensibilidad incrementa/decrece dependiendo del fluido que se evalúa, de manera que, en suero, la sensibilidad de amplificación es mayor que en saliva (Figura 4, Figura 5, Figura 6, Tabla V, Tabla VI), y esto se debe a que en suero la cantidad de virus en replicación, es mucho mayor que en saliva (Rey y col., 2001; Hermida y col., 2002; Gonçalves y col., 2005; Wang y col., 2006; Guarner y Enríquez, 2008).

El 77% de positividad para el ARN del VHC en la población estudiada, muestra similitud con resultados publicados en estudios realizados en Brasil (Gonçalves y col., 2005; Oliveira y col., 1999; Silva y col., 2000), en donde el genotipo predominante, al igual que en Venezuela, es el genotipo 1 (Pujol y Loureiro, 2007; Pujol y col., 1997; Sulbarán y col., 2010).

Esta prevalencia de 77% de ARN-VHC con respecto a la positividad total en suero por anticuerpos anti-VHC, no está claro a que se debe, pero, en los estudios realizados en Brasil, se determinó que este resultado está significativamente asociado a los niveles alterados de aspartato aminotransferasas (AST) y alanina aminotransferasas (ALT) (Silva y col., 2000). Sin embargo, para este estudio, no puede aseverarse lo anterior, ya que no se hizo la medición de los niveles de las aminotransferasas de los pacientes. El resultado también puede estar asociado a un mal manejo de las muestras, lo cual estaría arrojando un dato no verídico. Niveles elevados de ALT son indicativos de lesión hepática, y existe una

asociación entre el aumento de la complejidad de las cuasiespecies del VHC en la región hipervariable 1 (HVR1) de la secuencia de envoltura (E2), que está sometida a la presión selectiva que ejercen los anticuerpos neutralizantes del hospedador, y los niveles de ALT (Rothman y col., 2005). Para la región 5'-NC y NS5B no se ha reportado una asociación directa, debido a que estas son secuencias de, una región no codificante, y una región codificante para una proteína no estructural, respectivamente.

El haber obtenido una mayor sensibilidad en la región 5'-NC, comparado con la región NS5B, se debe, precisamente, a lo conservado que es la región 5'-NC, ya que, al contener un sitio de reconocimiento por el ribosoma, para empezar la traducción de forma independiente, necesariamente debe ser más conservada, de forma tal de garantizar la traducción y posterior replicación del genoma viral. Una región más conservada permite tener iniciadores más específicos, incluso entre los distintos genotipos del virus, y por ende, se hace más eficiente la amplificación por PCR.

La región 5'-NC del VHC resultó ser más conservada que la región NS5B en un mismo individuo infectado, y resulta más precisa para la determinación de genotipos (Figura 8), que para propósitos clínicos, es suficiente (Laperche y col., 2005). Sin embargo, la región 5'-NC no es suficiente para discriminar a nivel de subtipos, y por eso se usa una región más variable (NS5B), que se ha determinado, es mejor para asignar subtipos del VHC, lo cual tiene un valor significativo en estudios epidemiológicos (Laperche y col., 2005; Cantaloube y col., 2006).

No obstante, el grado de diversidad que hemos encontrado en la región 5'-NC del VHC, que va asociada a la naturaleza de cuasiespecies que tienen todos los virus de ARN, es mucho menor a la diversidad que existe en la región de la polimerasa (NS5B), y esto es debido a la tasa de fijación de mutaciones y a la variabilidad intrínseca que posee el VHC a lo largo de su genoma al momento de replicarse.

La prevalencia del 67% (10/15) y 33% (5/15) para los genotipos 1 y 2, respectivamente, confirma los reportes de prevalencia de estos genotipos en el país (Pujol y Loureiro, 2007; Pujol y col., 1997; Fortes y col., 2009; Sulbarán y col., 2010). Por lo cual, el genotipo predominante en Venezuela, por al menos un periodo de 20 años (cuando se empezaron a implementar los análisis de sangre en Venezuela), sigue siendo el genotipo 1. Sin embargo, en la última década, se ha observado una disminución de este genotipo (subtipo 1b), y el incremento de la circulación del genotipo 2 (Pujol y Loureiro, 2007). A pesar de que está reportada la presencia del genotipo 3 y 4 en Venezuela (Pujol y col., 1997), no se identificaron muestras positivas para estos genotipos en este estudio, muy probablemente porque el número de muestras no fue suficiente, y la prevalencia de estos genotipos es bastante baja. Esto no indica que no haya prevalencia actual de estos genotipos en el país.

Se observó 88% (7/8) y 12% (1/8) de prevalencia de los subtipos 1a y 1b del VHC en las muestras de distintos pacientes, que resultaron positivas para la región NS5B. Este resultado es similar a la prevalencia de los subtipos del VHC circulante en Venezuela. Por lo que, debido al alto porcentaje de prevalencia del subtipo 1a obtenido en este estudio, y por estudios previos realizados en el país

(Pujol y Loureiro, 2007, Pujol y col., 1997 y Sulbarán y col., 2010), se puede aseverar que el subtipo 1a predomina sobre el subtipo 1b en los pacientes venezolanos que están infectados con VHC, aunque no se pueda decir con certeza el porcentaje de prevalencia, puesto que hace falta el análisis de un mayor número de muestras.

Aunque no se logró amplificar la región NS5B de una muestra perteneciente a un paciente infectado con VHC genotipo 2, es necesario tener en cuenta que, en estudios recientes, se hace evidente la presencia de este genotipo, y se resalta el subtipo 2j como el más predominante en Venezuela, después de los subtipos 1a y 1b, respectivamente (Sulbarán y col., 2010), con un 21% de prevalencia, dentro de todos los subtipos pertenecientes a los distintos genotipos. Al parecer, el genotipo 2 (especialmente el subtipo 2j) está aumentando, lentamente, su prevalencia en Venezuela (Sulbarán y col., 2010; Pujol y Loureiro, 2007). Este último punto, a nivel epidemiológico, es muy importante para entender cómo pudo haberse originado la infección por VHC en Venezuela, ya que, mientras las cepas del genotipo 1 aparecen en un crecimiento exponencial entre 1985 y 1990, antes de llegar al plateau que coincide con la implementación de las pruebas de VHC en los bancos de sangre en Venezuela en 1994, las cepas del subgenotipo 2j, no parecen haber alcanzado el equilibrio de crecimiento durante ese periodo (Sulbarán y col., 2010), lo cual sugiere que éstas, están posiblemente en incremento de su proporción actual.

Para realizar el análisis de cuasiespecies, no sólo es necesario el análisis de la secuencia de la región amplificada por RT-PCR de la muestra problema (secuencia consenso), sino que debe hacerse un análisis exhaustivo de las

variantes que conforman la muestra (variantes de la población), debido a que la muestra en sí, no es homogénea, sino más bien heterogénea (Eigen y Schuster, 1977), en donde existe un gran variedad de secuencias (análogo a un enjambre), que son las que conforman la cuasiespecie.

Antes de proceder a realizar el análisis de las cuasiespecies, es muy recomendable comenzar con el análisis de las secuencias consenso, ya que las máquinas de secuenciación automática, por lo general seleccionan la base que es más común en una posición dada, y si dos o más bases están presentes con una frecuencia más o menos igual, el mecanismo de secuenciación automatizada no es capaz de identificar la base común, y se puede presentar más de un pico de absorbancia de nucleótidos distintos en una misma posición. De manera que, la revisión del cromatograma, acompañado de los resultados de la secuenciación, es muy útil para resolver las discrepancias y en la obtención rudimentaria de las variaciones en la población viral (Fishman y Branch, 2009).

En este estudio se logró estudiar la cuasiespecie de muestras pareadas de suero y saliva. En la cuasiespecie que se observó, hubo diferencias entre las variantes circulantes. Es decir, existen diferencias evidentes entre los distintos genomas circulantes en la población viral de un fluido corporal de un mismo individuo infectado. Estas diferencias se deben, principalmente, a los errores de copia que incorpora la polimerasa del virus al momento de la replicación, y a las distintas presiones selectivas que se dan en cada compartimiento corporal.

Las secuencias consenso de la región 5'-NC y la NS5B del VHC proveniente de las muestras de suero y saliva de un mismo individuo, curiosamente, presentan algunas diferencias entre ellas. Estas diferencias en la

secuencia consenso de las cuasiespecies, probablemente sería el resultado de diferencias de tropismo hacia un tejido (Pawlotsky, 2006), si se tratase de una secuencia que codifica para una proteína estructural (por ejemplo, HVR1). Sin embargo, la región 5'-NC y la NS5B, pertenecen a una región no codificante y codificante no estructural, respectivamente.

Como era de esperar, no se observaron diferencias en el alineamiento de aminoácidos de las secuencias consenso de la NS5B, tanto en los aislados que circulan en suero, como en los que circulan en saliva, lo que sugiere que, las mutaciones encontradas a nivel de nucleótidos, en los aislados de las distintas muestras, por lo general, son mutaciones de tipo sinónimas, por lo cual la estructura de la proteína se conserva, aunque la secuencia de nucleótidos sea bastante variable. La región NS5B, codifica para una proteína no estructural, que es esencial para la replicación, y sin embargo, se observaron diferencias a nivel de aminoácidos en algunas de las variantes de la cuasiespecie de cada fluido. Esta diferencia de secuencia aminoacídica en algunas variantes minoritarias que circulan en los distintos fluidos, puede significar que las proteínas no estructurales están sometidas a grandes presiones selectivas, tal vez no tan importantes como la que ejercen los anticuerpos neutralizantes hacia las regiones de envoltura del virus, pero que, definitivamente, influyen en que se seleccionen estas variantes. De hecho, el haber encontrado que existe mayor cantidad de mutaciones sinónimas, que no sinónimas, marca un indicio de selección negativa. Se ha demostrado que proteínas más conservadas, tales como la proteasa NS3, NS5A y NS5B, sólo pueden tolerar cambios de aminoácidos en ciertas posiciones. Estos cambios involucran principalmente residuos expuestos en la proteína, sin afectar

la funcionalidad de la estructura tridimensional del núcleo hidrofóbico (Pawlotsky, 2006). Por otro lado, en la región de envoltura, la cantidad de mutaciones en las distintas variantes de la cuasiespecie, es muy alto, y generalmente, se considera un principio de selección positiva, en donde hay mayor número de mutaciones no sinónimas, ya que las presiones selectivas que actúan sobre esa región, son mayores, debido a que es una región estructural, que está sometida a la presión que ejercen los anticuerpos neutralizantes del hospedador. De manera que, si se evalúa esta región en las muestras de suero y saliva, se esperaría encontrar diferencias importantes en las secuencias aminoacídicas, incluso a nivel de secuencia consenso.

Contrario a lo anterior, la región 5'-NC, que es una región no codificante, presentó una menor heterogeneidad en la población que circula en suero y/o saliva, y esto es debido a que es una región muy conservada, puesto que es un sitio de entrada al ribosoma. No puede hablarse de mutaciones sinónimas o no sinónimas, pero puede hacerse la comparación, en cuanto a secuencia nucleotídica, con otras regiones, demostrando ser la más conservada en este estudio, lo cual se explica por la baja frecuencia mutacional que esta región posee.

Un trabajo reportó divergencia entre el genotipo del VHC circulando en saliva, y el que circula en suero de usuarios de drogas intravenosas (Roy y col., 1998). Sin embargo, esto no ha sido reportado en trabajos posteriores. En tal caso, hemos demostrado que, en las secuencias, tanto de la muestra de saliva como de suero, circula el mismo genotipo, incluso el mismo subtipo, al menos para pacientes infectados con el genotipo 1.

Queda claro que, la diferencia que existe entre el subtipo 1a y 1b, es bien marcada a nivel de nucleótidos, e incluso, se encuentran diferencias importantes a nivel de aminoácidos. Esto, es importante para el tratamiento de un paciente infectado que reciba tratamiento STAT-C, porque es esencial que se conozca no solo el genotipo, sino el subtipo del VHC con el cual está infectado, para poder dirigir la terapia y hacerla lo más eficientemente posible.

Muchas de las mutaciones encontradas en las distintas variantes de la cuasiespecie de cada fluido, corresponden a transiciones, lo cual coincide con el principio del modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos de Kimura dos parámetros, el cual dicta que, en la naturaleza, la tasa de transición, por lo general, es mucho mayor a la tasa de transversión (Page y Holmes, 1998), además que, por cuestiones estocásticas, es más factible que se dé un cambio purina-purina o pirimidina-pirimidina, a el cambio purina-pirimidina (y viceversa).

La cuasiespecie del VHC que circula en el suero de los pacientes (20 y 21), mostró ser más heterogénea que la circulante en saliva (20S y 21S). El suero, en teoría, puede contener todas las variantes del VHC que se producen en todos los compartimientos y/o fluidos corporales (Maggi y col., 1997), y eso explicaría la mayor heterogeneidad de secuencias en la muestra de suero con respecto a las de saliva. Sin embargo, no se observaron variantes de la NS5B del VHC que circula en saliva, en el suero de un mismo individuo infectado. No obstante, se ha encontrado que muchas variantes que han sido detectadas en el hígado y en PBMCs, no están presentes en el suero correspondiente (Maggi y col., 1997; Cabot y col., 2000), y, contradictoriamente, se ha demostrado que la variabilidad genética ha sido mayor en suero que en tejido hepático o PBMCs en cuanto a

complejidad (como número de secuencias obtenidas de cada tipo de tejido) y nivel de distancia genética entre todas las secuencias aisladas de cada compartimiento (Navas y col., 1998). Es importante tener en cuenta que en el suero, por lo general, la carga viral es mucho mayor que en saliva, y esto indica que existen mayor cantidad de genomas en replicación en ese fluido, además de que la sangre irriga a muchos de los órganos en los cuales se replica el virus, y puede ser transportado fácilmente, por lo cual, debe prevalecer una variante mayoritaria con una abundancia relativa mucho mayor que la variante de mayoritaria en saliva. De manera que, debe ser el suero quien, en teoría, contenga mayor complejidad en la cuasiespecie, y por eso, se hace más difícil la identificación en el suero de las variantes que circulan en otros fluidos. También es importante acotar que, con respecto a la diferencia de complejidad de las cuasiespecies entre los fluidos de un individuo y otro, la muestra 20 resultó tener una concentración de 15 y 10 ng/ μ L en suero y saliva, respectivamente, mientras la muestra 21 tenía una amplia diferencia en las concentraciones en suero y saliva, 25 y 4 ng/ μ L, respectivamente. Quizá esa diferencia en las concentraciones, permitió que, al momento de hacer la selección de clones, en la muestra 20 se seleccionara con mayor equidad, en ambas muestras de los fluidos, mientras que en la muestra 21, la equidad fue más baja, puesto que la diferencia de concentraciones era más grande, lo cual permitió que la riqueza de la cuasiespecie en suero del paciente 21 (8 de 10 secuencias analizadas), fuera mayor que la del paciente 20 (5 de 10 secuencias analizadas). En la saliva de ambos pacientes, resultó haber la misma cantidad de variantes (4 de 10 secuencias analizadas).

Es importante mencionar que, el VHC puede replicarse en otros compartimientos que están presentes en la saliva, como es el caso de las células del epitelio oral y el fluido crevicular (Arrieta y col., 2000; Maticic y col., 2001), lo cual puede sugerir un aumento en la diversidad de la cuasiespecie estudiada en la saliva, debido al tropismo que debe tener cada variante, para poder replicarse en esos compartimientos.

El no haber encontrado diferencia de clados entre las variantes que circulan en suero y saliva de un mismo individuo, es indicativo de que, a pesar de que existe un alto grado de variabilidad, de diversidad en la cuasiespecie de cada fluido; la distancia genética entre esta es baja, y por eso son agrupadas con un mismo grado de identidad dentro del árbol filogenético.

Esta es la primera evidencia de la presencia de una cuasiespecie del VHC en saliva, y su comparación con la cuasiespecie que circula en suero de un mismo paciente. A pesar de que se han llevado a cabo estudios de cuasiespecies en distintos tejidos, órganos y/o fluidos, no se ha reportado un estudio de cuasiespecies del VHC en saliva.

Conclusiones y Recomendaciones.

- De 22 pacientes estudiados (positivos para anti-VHC), 17 (77%) resultaron positivos para la presencia de ARN-VHC. De estos 17, sólo a 15 se les pudo hacer la caracterización molecular del VHC circulante en suero y/o saliva, de los cuales 10 (67%) resultaron estar infectados con genotipo 1, y 5 (33%) infectados con el genotipo 2.
- A partir de 22 pacientes con hepatitis C en fase crónica, se logró amplificar 16 (73%) y 9 (41%) muestras en la región 5'-NC del VHC, en suero y saliva, respectivamente, y 8 (36%) y 3 (14%) muestras en la región NS5B, en suero y saliva, respectivamente. Esto confirma que, debido a la mayor carga viral que circula en suero con respecto a saliva, hay mayor probabilidad de amplificación en el primer compartimiento. Además, la región 5'-NC es más sensible a la amplificación, por ser más conservada que la NS5B.
- La región 5'-NC del VHC permite la determinación de genotipos, pero no permite determinar subtipos de forma concluyente. La región NS5B es más propicia para la caracterización molecular, pues permite discriminar tanto genotipos, como subtipos.
- Se observó un alto grado de identidad entre las secuencias consenso, provenientes de suero y saliva, para ambas regiones genómicas del VHC.
- Se observó la presencia de cuasiespecies, tanto en la región 5'-NC, como en la NS5B del VHC, con diferencias entre las variantes que circulan en suero y saliva. La región NS5B posee mayor heterogeneidad en las

variantes de la cuasiespecie, mientras las variantes de la región 5'-NC fueron menos heterogéneas.

- No se observaron clados específicos pertenecientes a las variantes de la cuasiespecie de un compartimiento y otro.
- Este es el primer estudio de cuasiespecies del VHC realizado en Venezuela. Además, es el primer estudio de cuasiespecies del VHC realizado en saliva.
- El estudio de cuasiespecies es de suma importancia para el seguimiento del curso de la infección por el VHC en un individuo, y para la administración de un tratamiento más eficiente.
- Las cuasiespecies son importantes para entender la evolución del virus, su patogenicidad y su epidemiología.
- Se sugiere realizar análisis de cuasiespecies con programas bioinformáticos más avanzados, para calcular diversidad en la población, y determinar si existe un patrón de diversidad de cuasiespecies en distintos compartimientos corporales, lo cual es de gran importancia para el diseño de fármacos antivirales, y de posibles vacunas contra virus de ARN altamente patógenos.

Referencias bibliográficas.

- Arrieta, J.J., Rodríguez-Inigo, E., Casqueiro, M., Bartolomé, J., Manzarbeitia, F., Herrero, M., Pardo, M. y colaboradores. 2000. Detection of hepatitis C virus replication by In situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus. *Hepatology*. **32 (1)**: 97-103.
- Biebricher, C.K., Eigen, M. 2006. What is a quasispecies?. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**: 1-31.
- Brass, V., Moradpour, D., Blum, H.E. 2006. Molecular virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *Int. J. Med. Sci.* **3**: 29-34.
- Bruns, T., Steinmetzer, K., Ermantraut, E., Stallmach, A. 2009. Hepatitis C virus RNA quantitation in venous and capillary small-volume whole-blood samples. *J. Clin. Microbiol.* **47 (10)**: 3231-3240.
- Cabot, M., Esteban, J.I., Martell, M., Genescà, J., Vargas, V., Esteban, R., Guardia, J. y colaboradores. 1997. Structure of replicating hepatitis C virus (HCV) quasispecies in the liver may not be reflected by análisis of circulating HCV virions. *J. Virol.* **71 (2)**: 1732-1734.
- Cabot, M., Martell, M., Esteban, J.I., Sauleda, S., Otero, T., Esteban, R., Guàrdia, J. y colaboradores. 2000. Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. *J. Virol.* **74 (2)**: 805-811.
- Cantaloube, J.F., Laperche, S., Gallian, P., Bouchardeau, F., Lamballerie, X., Micco, P. 2006. Analysis of the 5' Noncoding region versus the NS5b

region in genotyping Hepatitis C virus isolates from blood donors in France. *J. Clin. Microbiol.* **44 (6)**: 2051-2056.

- Chan, S.W., McOmish, F., Holmes, E.C., Dow, B., Peutherer, J.F., Follett, E., Yap, P.L. y colaboradores. 1992. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J. Gen. Virol.* **73**: 1131-1141.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* **244 (4902)**: 359-362.
- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., Arias, A. 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**: 51-82.
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J.C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C. y colaboradores. 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance. *Gene.* **40 (1)**: 1-8.
- Domingo, E., Parrish, C.R., Holland, J. 2008. Origin and evolution of viruses. Academic Press, Segunda edición, Hungría.
- Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T., Weissmann, C. 1978. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell.* **13 (4)**: 735-744.
- Duarte, E.A., Novella, I.S., Weaver, S.C., Domingo, E., Wain-Hobson, S., Clarke, D.K., Moya, A. y colaboradores. 1994. RNA virus quasispecies:

- significance for viral disease and epidemiology. *Infect. Agents Dis.* **3 (4)**: 201-214.
- European Association for the Study of the Liver. 1999. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J. Hepatol.* **31**: 3-8.
 - Eigen, M. 1971. Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften.* **58**: 465-523.
 - Eigen, M., Schuster, P. 1977. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften.* **64**: 541-565.
 - Eigen, M. 1993. Viral Quasispecies. *Sci. Am.* **269 (1)**: 42-49.
 - Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J.C., Strazzera, A. y colaboradores. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by evolution of the viral quasispecies. *Science.* **288 (5464)**: 339-344.
 - Fishman, S.L., Branch, A.D. 2009. The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus. *Infect. Genet. Evol.* **9(6)**: 1158-1167.
 - Fortes, M., Trómpiz, A., Canónico, Y., Vargas-Lovelle, B., Machado, I. 2009. Hepatitis C virus genotype 1 frequency has not varied in Venezuela. *Rev. Col. Gastroenterol.* **24 (3)**: 356-358.
 - Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncalves F.L. Jr., Häussinger, D. Y colaboradores. 2002. Peginterferon alfa-2a plus

ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347 (13)**: 975-982.

- Gómez, J., Martell, M., Quer, J., Cabot, B., Esteban, J.I. 1999. Hepatitis C viral quasiespecies. *J. Viral Hepat.* **6**: 3-16.
- Gonçalves, P.L., Cunha, C.B., Busek, S.C., Oliveira, G.C., Ribeiro-Rodrigues, R., Pereira, F.E. 2005. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz. J. Infect. Dis.* **9(1)**: 28-34.
- Guarner, C., Enríquez, J. 2008. Hepatitis C. Marge Medica Books, Primera edición, Barcelona, España.
- Hadziyannis, S.J., Sette, H.Jr., Morgan, T.R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G. y colaboradores. 2004. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* **140 (5)**: 346-355.
- Hermida, M., Ferreiro, M.C., Barral, S., Laredo, R., Castro, A., Diz Dios, P. 2002. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J. Virol. Methods.* **101 (1-2)**: 29-35.
- Hoeprich, P.D., Jordan, M.C., Ronald, A.R. 1994. Infectious Diseases. A treatise of infectious processes. JB Lippincott Co, Quinta edición, Filadelfia, Estados Unidos.
- Laperche, S., Lunel, F., Izopet, J., Alain, S., Dény, P., Duverlie, G., Gaudy, C. y colaboradores. 2005. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5'

noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* **43 (2)**: 733-739.

- Liou, T.C., Chang, T.T., Young, K.C., Lin, X.Z., Lin, C.Y., Wu, H.L. 1992. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J. Med. Virol.* **37 (3)**: 197-202.
- Luna, M., De Guglielmo, Garassini, M., Perrone, M., Correnti, M. 2008. Detección de ARN de virus de hepatitis C en la saliva de un grupo de pacientes con hepatitis C crónica. *Acta Odontol. Venez.* **46 (3)**: 269-272.
- Luria, S.E., Darnell, J.E. 1967. General Virology. John Wiley and Sons, Segunda edición, Nueva York, Estados Unidos.
- Lwoff, A. 1957. The concept of virus. *J. Gen. Microbiol.* **17**: 239-253.
- Maggi, F., Fornai, C., Vatteroni, M.L., Giorgi, M., Morrica, A., Pistello, M., Cammarota, G. y colaboradores. 1997. Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J. Gen. Virol.* **78**: 1521-1525.
- Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. 1995. Principle and Practice of Infectious Disease, Churchill Livingstone, Cuarta edición, Nueva York, Estados Unidos.
- Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.G., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D. y colaboradores. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for inicial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet.* **358 (9286)**: 958-965.

- Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, a., Esteban, R., Guardia, J. y colaboradores. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* **66 (5)**: 3225-3229.
- Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Vargas, V., Esteban, R., Guardia, J., Gómez, J. 1994. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *J. Virol.* **68 (5)**: 3425-3436.
- Mast, E.E., Alter, M.J., Margolis, H.S. 1999. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine.* **17 (13-14)**:1730-1733.
- Maticic, M., Poljak, M., Kramar, B., Seme, K., Brinovec, V., Meglic-Volkar, J., Zakojnik, B. y colaboradores. 2001. Detection of hepatitis C virus RNA from gingival crevicular fluid and its relation to virus presence in saliva. *J. Periodontol.* **72**: 11-16.
- Navas, S., Martín, J., Quiroga, J.A., Castillo, I., Carreño, V. 1998. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients. *J. Virol.* **72 (2)**: 1640-1646.
- Ogata, N., Alter, H.J., Miller, R.H., Purcell, R.H. 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88 (8)**: 3392-3396.

- Oliveira, G.C., Carmo, R.A., Rocha, M.O., Silva, M.O., Lima, A.T., Guimarães, M.D., Corrêa-Oliveira, R. 1999. Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the state of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion*. **39 (11-12)**: 1194-1199.
- Page, R., Holmes, E.C. 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science. Primera edición, Cambridge, Reino Unido.
- Pawlotsky, J.M. 2004. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* **12 (2)**: 96-102.
- Pawlotsky, J.M. 2006. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**: 261-284.
- Pujol, F.H., Loureiro, C.L. 2007. Replacement of hepatitis C virus genotype 1b by genotype 2 over a 10-year period in Venezuela. *J. Clin. Gastroenterol.* **41 (5)**: 518-520.
- Pujol, F.H., Loureiro, C.L., Devesa, M., Blitz, L., Parra, K., Beker, S., Liprandi, F. 1997. Determination of genotypes of Hepatitis C virus in Venezuela by Restriction Fragment Length Polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **35 (7)**: 1870-1872.
- Radkowski, M., Wang, L., Vargas, H., Wilkinson, J., Rakela, J., Laskus, T. 2001. Changes in Hepatitis C virus population in serum and peripheral blood mononuclear cells in chronically infected patients receiving liver graft from infected donors. *Transplantation*. **72 (5)**: 833-838.

- Randall, D., Burggren, W., French, K. 1998. Eckert Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones. McGRAW-HILL/Interamericana de España, Cuarta edición, España.
- Rey, D., Fritsch, S., Schmitt, C., Meyer, P., Lang, J.M., Stoll-Keller, F. 2001. Quantitation of hepatitis C virus RNA in saliva and serum of patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus. *J. Med. Virol.* **63 (2)**: 117-119.
- Rothman, A.L., Morishima, C., Bonkovsky, H.L., Polyak, S.J., Ray, R., Di Bisceglie, A.M., Lindskey, K.L. y colaboradores. 2005. Associations among clinical, immunological, and viral quasispecies measurements in advanced chronic hepatitis C. *Hepatology.* **41 (3)**: 617-625.
- Roy, K.M., Bagg, J., McCarron, B., Good, T., Cameron, S., Pithie, A. 1998. Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. *J. Med. Virol.* **54 (4)**: 271-275.
- Silva, L.K., Paraná, R., Souza, S.P., Berby, F., Kay, A., Trepó, C., Santana, N. y colaboradores. 2000. Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62 (2)**: 257-260.
- Steinhauer, D.A., Holland, J.J. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 409-433.
- Sulbarán, M.Z., Di Lello, F.A., Sulbarán, Y., Cosson, C., Loureiro, C.L., Rangel, H.R., Cantaloube, J.F. y colaboradores. 2010. Genetic History of Hepatitis C Virus in Venezuela: High Diversity and Long Time of Evolution of

HCV Genotype 2. *PLoS ONE*. **5(12)**: e14315.
doi:10.1371/journal.pone.0014315.

- Tenovuo, J.O. 1989. Human saliva: clinical chemistry and microbiology. CRC Press, Primera edición, Florida, Estados Unidos.
- US Department of Health and Human Services. 1998. Recommendations for Prevention and Control of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and HCV-Related Chronic Disease. *M.M.W.R. Recomm. Rep.* **47**: 1-39.
- Wang, C.C., Morishima, C., Chung, M., Engelberg, R., Krantz, E., Krows, M., Sullivan, D.G. y colaboradores. 2006. High serum hepatitis C virus (HCV) RNA load predicts the presence of HCV RNA in saliva from individuals with chronic and acute HCV infection. *J. Infect. Dis.* **193 (5)**: 672-676.
- World Health Organization. 1999. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in Collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board. *J. Viral Hepat.* **6 (1)**: 35-47.
- Zeuzem, S., Hultcrantz, R., Bourliere, M., Goeser, T., Marcellin, P., Sanchez-Tapias, J., Sarrazin, C. y colaboradores. 2004. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J. Hepatol.* **40 (6)**: 993-999.

Anexos

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
Hepatitis y Sida: características Moleculares de la Infección en Venezuela

Ficha de datos clínicos y epidemiológicos

Nombre: _____ Edad: _____

CI: _____ N° Muestra: _____

Sexo: _____ Edo. Civil: _____ Dirección: _____

Teléfono: _____

Deposito bancario N° de Bauche: _____

- CATEGORIAS DE EXPOSICION Y CONDICIONES DE RIESGO (Responda sí (s) o no (n) Usuario de drogas endovenosas: _____ Trabajador(a) del sexo: _____

Receptor de transfusión de hemoderivados y/o transplantes: _____ Hemofilia: _____

Fecha de la 1ra serología positiva: / / Fecha de la última serología negativa: / /
Dx confirmatorio: / /**Categoría de transmisión** heterosexual: _____ homosexual: _____

Bisexual: _____ Drogas IV: _____ Mixta: _____ otra: _____

Entorno de la transmisión con la pareja fija (> 6 meses): _____ con trabajador(a) del sexo: _____

relación sexual fortuita: _____ viajes: _____ otro: _____

Uso de sustancias psicoactivas y/o estimulantesAlcohol (semanalmente): _____ drogas inhaladas(semanal o mensualmente): _____
Combinaciones: _____ Cuáles: _____

- TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL (drogas y su duración)

ninguna:monoterapia: _____ biterapia: _____ triterapia: _____ cuatro o >: _____

- DATOS CLINICOS

Carga viral _____ CD4+ _____ Hepatis: _____

- COMENTARIOS: _____

Datos Obligatorios

Medico Tratante: Dr.**E-mail:****Fax o Telf:****CONSENTIMIENTO VALIDO**

Yo _____, Mayor de edad Portador de la
CI: _____ declaro de manera voluntaria mi conformidad de participar en este estudio
entendiendo todas las condiciones asociadas y descritas en el anexo.

Firma_____
Fecha

CONSENTIMIENTO VALIDO

En el instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C), en colaboración con el Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela, se está realizando el estudio titulado **"Epidemiología molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH): determinación de resistencia a drogas antirretrovirales y efecto de la coinfección con GBV-C sobre la replicación de VIH-1"** para analizar el virus que está en mi cuerpo y así permitirle a mi médico tratante escoger el mejor tratamiento para mí.

Yo, _____ C.I.: _____
 Nacionalidad _____ Estado Civil _____ Domiciliado en: _____
 _____ siendo mayor de 18 años en USO pleno mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que más abajo indico, en calidad de paciente o representante legal del menor de edad _____, declaro mediante la presente:

- 1.- Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, por parte de mi médico tratante y/o del grupo de Investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), coordinados por la Dra. Flor Pujol de todos los aspectos relacionados al proyecto de Investigación epidemiológica titulado **"Epidemiología molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH): determinación de resistencia a drogas antirretrovirales y efecto de la coinfección con GBV-C sobre la replicación de VIH-1"**
- 2.- Tener conocimiento claro de que el objetivo fundamental del trabajo antes señalado es analizar el virus que está en mi cuerpo y así permitirle a mi médico tratante escoger el mejor tratamiento para mí.
- 3.- Haber sido informado de que mi participación en el proyecto consiste en donar de manera voluntaria para el presente estudio una muestra de sangre de 10 cc, la cual se me extraerá de unas de las venas de la sangre, bajo las condiciones de rutina que se usan en los hospitales.
- 4.- Que la muestra sanguínea que acepto donar así como la información que suministre al equipo de investigadores será utilizada única y exclusivamente para analizar el virus que circula en mi cuerpo y que mis médicos tratantes puedan elegir el mejor tratamiento para mí.
- 5.- Que el equipo de investigadores me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa a mi persona a la que tengan acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
- 6.- Que estoy de acuerdo en el USO, para fines académicos, de los resultados obtenidos en el presente estudio.
- 7.- Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para mi salud.
- 8.- Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente por parte de mi médico tratante o el equipo de investigadores antes mencionado con quienes me puedo comunicar por el teléfono (Laboratorio de Virología Molecular): 0212-5041623 ó 5041049 con la Dra. Flor Pujol.
- 9.- Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.
- 10.- Que los resultados de las pruebas me serán entregados oportunamente.
- 11.- Uso de la muestras:

La muestra de sangre que me va a ser extraída será utilizada para conocer sobre el VIH infectante. Algunas muestras serán almacenadas en el IVIC. Como parte de este estudio los investigadores planean obtener y guardar muestras de sangre extra, que pueden ser usadas para futuras investigaciones para aprender más acerca del VIH y otras enfermedades. Las muestras pueden ser compartidas con investigadores de otras instituciones. Estas muestras pueden facilitar a los investigadores el desarrollo de pruebas médicas o tratamientos que tengan valor comercial. Estoy consciente de que no recibiré ninguna compensación económica derivada de la comercialización de esas pruebas o tratamientos. Ninguna información obtenida de esta última investigación será colocada en su historia médica. Para cualquier estudio, sus muestras serán identificadas por códigos, así su nombre no será fácilmente reconocido.

Si Ud. no desea que se guarden muestras de sangre extra, también puede participar en el estudio. Por favor marque abajo para indicar si desea o no autorizar a los investigadores para que guarden las muestras de sangre extra.

___ Yo autorizo guarden muestras de sangre para futuras investigaciones.

___ Yo no autorizo guarden muestras de sangre para futuras investigaciones.

Iniciales _____ Fecha _____

Las futuras investigaciones utilizando sus muestras de sangre extra deberán ser aprobadas también por el Comité de Ética de las instituciones participantes en este estudio; este comité tiene como misión proteger sus derechos como paciente.

Si en cualquier momento quiere Ud. desautorizar los estudios con sus muestras de sangre guardadas, comuníquese con los investigadores y manifiésteles su decisión. Entonces sus muestras no estarán disponibles para investigaciones.

Si Ud. autoriza guarden sus muestras de sangre extra para futuras investigaciones, los investigadores que estudien sus muestras pudieran querer saber más sobre Ud. Si los investigadores necesitan otra información sobre Ud.:

(Por favor marque abajo para indicar si Ud. puede o no ser contactado en el futuro)

___ Puedo ser contactado de nuevo para información.

___ No puedo ser contactado de nuevo para información.

Iniciales del voluntario: _____ Fecha: _____

Si Ud. está de acuerdo en ser contactado de nuevo, aún después puede cambiar de opinión en proveer información en el futuro.

Cualquier investigación adicional que se realice usando sus muestras será revisada por el Comité de Ética, un comité que vigila la investigación médica para proteger los derechos y bienestar de los voluntarios.

Ud. puede cambiar de opinión en cualquier momento en dejar identificables sus muestras para ser utilizadas en futuras investigaciones. Si Ud. cambia de opinión, contacte al investigador y hágale saber su decisión; entonces sus muestras no estarán más tiempo disponibles para la investigación.

Preguntas: Ud. es libre de preguntar sobre este estudio y sus derechos en este proyecto de investigación.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C) a realizar el referido estudio en las muestras de sangre que acepto donar a los fines indicados anteriormente.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del Voluntario

(o representante) _____

Nombres _____

C.I. _____

Lugar _____

Fecha _____

Tel _____

Firma del Investigador _____

Nombres _____

C.I. _____

Lugar _____

Fecha _____

Firma Testigo:

Nombres _____

C.I. _____

Lugar _____

Fecha _____

Firma Testigo:

Nombres _____

C.I. _____

Lugar _____

Fecha _____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción han impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Lugar y Fecha: