TESINA DE GRADO

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ORIENTACÍON BIOLOGÍA MOLECULAR

ACTUALIZACIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E Y ESTUDIO DEL PRIMER CASO CRÓNICO EN URUGUAY

Bach. Gabriel Ramírez Menza

Facultad de Ciencias (Udelar)

Sección Virología

Orientador: Dr. Santiago Mirazo

Febrero 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN 4
2. INTRODUCCIÓN 6
2.1 Descripción e importancia en salud pública 6
2.2 Historia 6
2.3 Clasificación y diversidad genética 7
2.4 Epidemiología 8
2.5 Biología viral y organización genómica 11
2.6 Vías de Transmisión 14
2.7 Presentación clínica 16
2.8 Infección crónica 17
2.9 Manifestaciones extrahepáticas 18
2.10 Diagnóstico y tratamiento 19
2.11 Hepatitis E en Uruguay: Una virosis emergente 21
2.12 Relevancia de HEV 22
3. OBJETIVOS 23
3.1 Objetivo general 23
3.2 Objetivos específicos 23
4. MATERIALES Y MÉTODOS 24
4.1 Muestras 24
4.2 Detección molecular de HEV 24
4.2.1 Extracción de ARN viral a partir de suero 24
4.2.2 Amplificación de la región ORF1 del genoma viral 24
4.2.3 Electroforesis en gel de agarosa 25
4.3 Profundización del caso problema 26
4.3.1 Microscopia Electrónica 26
4.3.2 Extracción de ARN viral a partir de la materia fecal 27
4.3.3 Retrotranscripción 27
4.3.4 PCR de las regiones MT, Cápside grande, HVR y ORF-1/2 29
4.3.5 Real time PCR cuantitativa 29
4.3.6 Secuenciación 31
4.4 Aislamiento viral en la línea celular A549. 33

4.4.1 Células 33
4.4.2 Preparación del inóculo de HEV 33
4.4.3 Aislamiento en A549 33
4.4.4 PCR integrada al cultivo celular (ICC-PCR, Integrated Cell Culture-PCR) 34
5. RESULTADOS 36
5.1 Detección de HEV mediante RT-PCR anidada 36
5.2 Estudio del caso problema 37
5.2.1 Microscopia electrónica en materia fecal 38
5.2.2 Amplificación de las múltiples regiones del genoma de HEV 38
5.2.3 Caracterización molecular 40
5.2.4 Análisis filogenético 40
5.2.5 Seguimiento de la carga viral mediante real time PCR cuantitativa 44
5.3 Aislamiento en A549 45
5.3.1 Análisis del aislamiento por ICC-RT-nPCR 45
6. DISCUSIÓN 46
7. PERSPECTIVAS 46
8. BIBLIOGRAFÍA 46

1. RESUMEN

El virus de la Hepatitis E (HEV), miembro de la familia viral *Hepeviridae*, es el agente etiológico de la Hepatitis E. Esta enfermedad posee una distribución mundial que, a pesar de ser subdiagnosticada, se detectan aproximadamente 20 millones de casos anuales alrededor del mundo. Actualmente se tienen reconocidos cuatro principales genotipos del virus que infectan seres humanos. HEV-1 y HEV-2, infectan exclusivamente a humanos, y se encuentran asociados a los grandes brotes epidémicos en países subdesarrollados. Mientras que, HEV-3 y HEV-4, son zoonóticos, siendo la principal causa de casos humanos? autóctonos de hepatitis E en los países industrializados.

La tasa de mortalidad de HEV, es relativamente baja en personas inmunocompetentes. Sin embargo, la infección en embarazadas eleva su mortalidad habitual y puede conllevar graves complicaciones al feto en el desarrollo del embarazo. Las personas inmunodeprimidas por su parte, presentan un mayor riesgo de contraer una infección crónica por HEV, como de desarrollar una hepatitis fulminante y/o manifestaciones extrahepáticas.

En Uruguay, HEV se ha reportado desde el año 2009, siendo HEV-1 y HEV-2, los únicos que se han detectado en humanos hasta el momento. Los actuales estudios de Hepatitis E en el país y la región, han demostrado que HEV es un problema de actualidad. Su potencial zoonótico y el carácter emergente de este virus presentan un riesgo a la salud pública. Por lo que estudios de epidemiologia molecular, pueden ayudar a evitar nuevos casos autóctonos y la diseminación de HEV.

Considerando este escenario, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar y actualizar la epidemiologia de HEV en Uruguay, a través de un relevamiento molecular en pacientes con hepatitis aguda sin etiología determinada. Asimismo, se planteó investigar y caracterizar en profundidad las cepas de HEV identificadas en los casos clínicos. Se halló en el transcurso una sola muestra positiva, correspondiente a una persona trasplantada la cual desarrolló una hepatitis E crónica, siendo el primer caso crónico

reportado para nuestro pais. El paciente fue tratado con ribavirina, y se le cuantificó la carga viral en suero mensualmente con el fin de estudiar la eficacia del antiviral. Al cabo de dos meses de tratamiento, HEV se volvió indetectable en suero, acompañado con la normalización de las enzimas hepáticas y una recupereción completa sin secuelas.

Posteriormente, se amplificó multiples regiones del genoma de HEV, con el fin de caracterizarlo filogenéticamente. La cepa crónica fue clasificada filogenéticamente dentro del genotipo 3. Sin embargo, no se pudo detectar la misma por la técnica de PCR integrada a cultivo celular (ICC-PCR, por sus siglas en inglés). Para la ICC-PCR se utilizó la línea celular A549 . Por otra parte, a través de microscopía electrónica de transmisión se logró detectar partículas virales de HEV en las heces del paciente. Logrando así, una detallada profundización de este particular caso clínico de hepatitis E en Uruguay

HEV es un patógeno zoonótico y emergente de creciente preocupación en la salud pública. A pesar de ello, esta enfermedad continúa siendo subdiagnosticada en la región, lo que presenta una dificultad para esclarecer tanto la epidemiologia como la patogénesis de este virus. Estudios epidemiológicos y el análisis detallado de casos clínicos como el que aquí se realiza, son de gran importancia para observar el escenario actual de HEV en el país, intentar evitar la aparición de nuevos casos autóctonos y estudiar el rango de la presentación clínica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Descripción e importancia en salud pública

La hepatitis E es una enfermedad hepática, cuyo agente etiológico es el virus de la Hepatitis E (HEV). La Organización Mundial de la Salud, estima que por año existen 20 millones de casos, de las cuales solo 3 millones son sintomáticos y 56.600 culminan con la muerte[1]. Si bien, en pacientes inmunocompetentes la infección es autolimitada y presenta una tasa de mortalidad relativamente baja (1-4%). En mujeres embarazadas la tasa de mortalidad asciende a un 25% y la infección puede presentar complicaciones en el desarrollo del embarazo[2]. Mientras que, en pacientes inmunocomprometidos, la probabilidad de contraer una infección crónica, hepatitis fulminante y/o manifestaciones extra hepáticas, aumenta considerablemente[3, 4, 5].

Esta enfermedad tiene una distribución mundial y el número de casos aumenta cada día. La mayoría de las infecciones son asintomáticas, la prevalencia de esta enfermedad sigue siendo aún subdiagnosticada y subestimada su incidencia. Lo que presenta un riesgo para la salud pública, especialmente de aquella población de riesgo (embarazadas, inmunodeprimidos y pacientes con enfermedad hepática subyacente) donde la probabilidad de falla hepática fulminante se acrecienta[6].

2.2 Historia

Si bien HEV se reconoce como agente etiológico de la hepatitis E hace relativamente poco, se cree que el mismo tiene un tropismo antropogénico desde hace más de 600 años, momento en el cual el antecesor de los genotipos que infectan humanos actualmente reconocidos, se diversificó de aquellos enzoóticos[7]. Por lo que se sospecha que varios brotes epidémicos de hepatitis aguda con frecuente incidencia en los siglos XVIII y XIX, pudieron haber sido causadas por HEV, a pesar de que los mismos ocurrieron en regiones geográficas donde actualmente la hepatitis E es poco habitual[8].

Sin embargo, no fue hasta 1980 que por primera vez la hepatitis E se sospechó como entidad distinta, donde se descubrió que un brote de hepatitis aguda ocurrido durante un período de seis meses (desde noviembre de 1978 hasta abril de 1979) en el valle de Kashmir en la India, no estaba relacionado ni con el Virus de la Hepatitis A ni con el Virus de la Hepatitis B[9]. La carencia de marcadores específicos en los sueros de pacientes que pudieran relacionar estos brotes con los agentes virales causantes de hepatitis A o B, planteaban la necesidad de buscar la etiología de estas epidemias de hepatitis aguda. Siendo en 1983 la confirmación de estas observaciones a través de la detección de partículas virales mediante microscopía electrónica, realizada en muestras de heces recogidas de un voluntario humano que había ingerido una suspensión fecal combinada de pacientes con hepatitis aguda, sin etiología definida, en Afganistán[10].

A pesar de tales hallazgos, muchos años después del descubrimiento de HEV como agente viral, se creía que el mismo infectaba exclusivamente humanos y se relacionaba exclusivamente con países en desarrollo, donde las condiciones sanitarias eran precarias. Sin embargo, a fines de la década del 90' se notificaron casos de Hepatitis E en países desarrollados, cuyos pacientes no habían viajado a zonas consideradas endémicas para este virus. A su vez, por la misma época se identificó a HEV en otros reservorios animales, lo que provocó un cambio en el paradigma hasta entonces establecido. Estos aportes, resultaron importantes para la comprensión de HEV y su epidemiología, reconociéndole hoy en día una amplia heterogeneidad genómica y circulación mundial, como así mismo un vasto rango de huésped[8].

2.3 Clasificación y diversidad genética

HEV pertenece a la familia viral *Hepeviridae*, la cual se subdivide en los géneros *Orthohepevirus* y *Piscihepevirus*[11](Fig. 1). Los miembros de esta familia han sido identificados en un amplio rango de hospederos animales (primates, cerdos, jabalíes, ciervos, conejos, mangostas, hurones, ratas, gallinas y truchas). La mayor cantidad de cepas identificadas se encuentran en el género *Orthohepevirus*, que a su

vez se divide en las especies A, B, C y D. Dentro de la especie *Orthohepevirus A*, se encuentran los cuatro genotipos de mayor relevancia en salud pública (HEV-1, HEV-2, HEV-3 y HEV-4), capaces de infectar humanos[12].

HEV-1 se encuentra bien documentado, es exclusivo de humanos y se divide en seis subtipos (1a, 1b, 1c, 1d, 1e y 1f). A su vez, HEV-2 a pesar de ser menos documentado se le reconocen dos subtipos diferentes (2a y 2b). HEV-3, es el genotipo mejor descrito y con el cual se cuenta con mayor cantidad de secuencias registradas, las cuales en su mayoría provienen de humanos, cerdos y jabalíes. Este se subdivide en 10 subtipos (3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i y 3j), de los cuales se describen 2 clados (3abchij y 3efg)[12]. Además, en este genotipo se encuentran un grupo de cepas aisladas en conejo y humanos (3ra), las cuales por el momento se las define como un clado distinto dentro de HEV-3[13]. HEV-4 por su parte, se ha detectado principalmente en humanos, cerdos y jabalíes divididos en nueve subtipos (4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h y 4i), con presencia también en otros animales de granja, pero la capacidad zoonótica en estos reservorios es cuestionada y aún está en estudio. Por otra parte, se encuentran los genotipos 5 y 6 (HEV-5, HEV-6), descriptos únicamente en jabalíes salvajes y sin reporte de infección en humanos por parte de estos genotipos[12]. También, se encuentra el genotipo 7 (HEV-7), aislado en camellos y descrito recientemente en humanos[14]. Por último, el genotipo 8 (HEV-8) ha sido reportado únicamente en camellos[15](Fig. 1).

2.4 Epidemiología

Los genotipos HEV-1 y HEV-2, infectan solo a los humanos y están asociados con grandes epidemias transmitidas por agua contaminada en áreas tropicales y subtropicales. Son los genotipos de mayor relevancia en países endémicos en vías de desarrollo, en donde las condiciones sanitarias son precarias. Mientras que HEV-1, es el agente etiológico responsable de la mayoría de las epidemias en Asia, HEV-2 es la principal causa de infección en algunos países de África (Fig. 2).

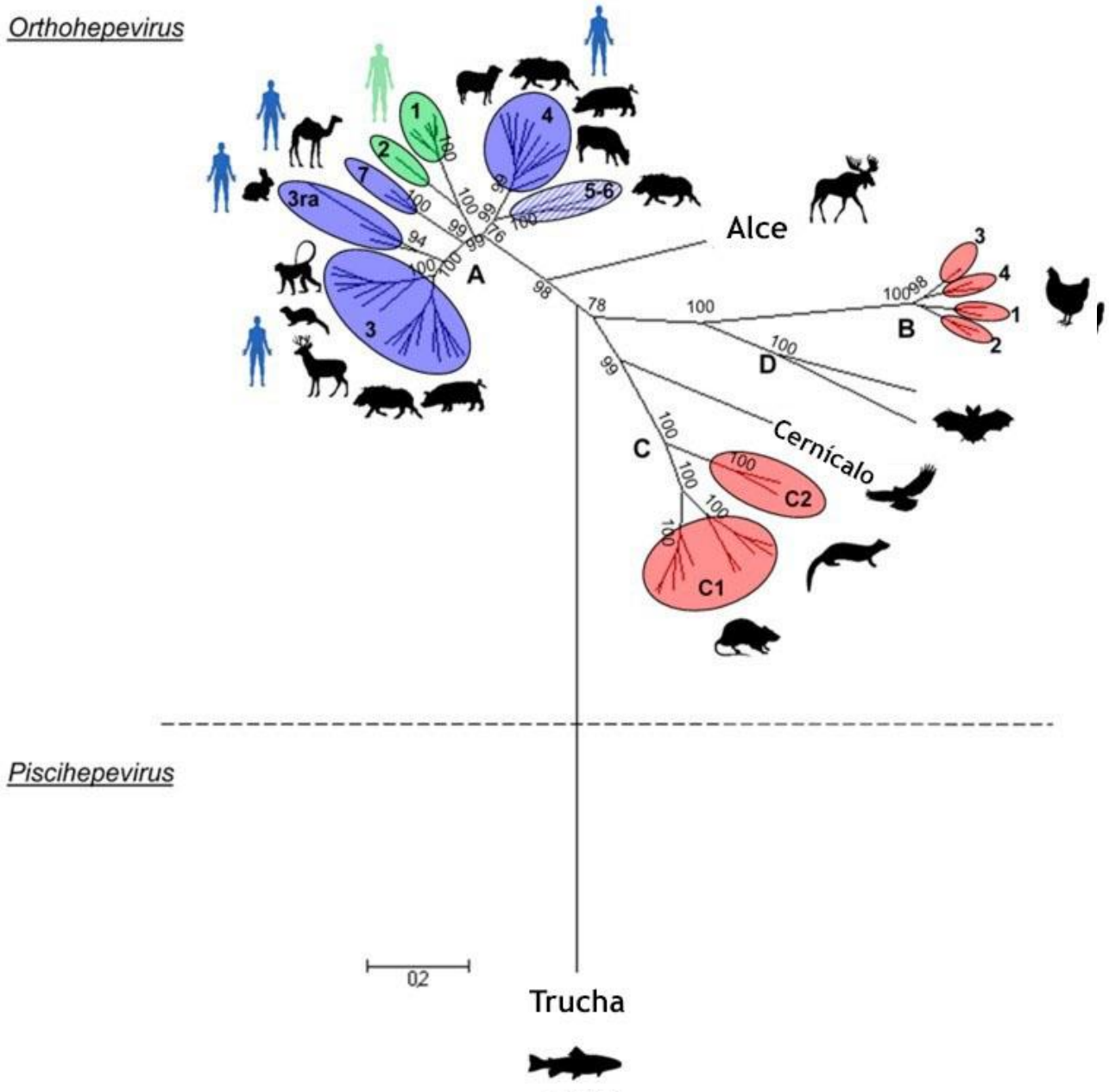

Figura 1: Árbol filogenético de la familia *Hepeviridae*. El análisis se realizó con 67 genomas completos de HEV o secuencias codificantes completas disponibles en la base de datos de GenBank y representativas para cada genotipo. Se muestran genotipos de especies de HEV no zoonóticas (rojo), genotipos que incluyen cepas de HEV aisladas de animales y humanos (azul), genotipos que infectan solo a humanos (verde) y genotipos que infectan jabalíes que no están relacionados con infecciones humanas (rayas azules). Modificado de Doceul *et al.* 2016.[12]

La vía fecal-oral es el modo de trasmisión más común en los brotes epidémicos causados por HEV-1 y HEV-2, la cual se da a través de fuentes de agua contaminadas. Las lluvias e inundaciones en los países donde usualmente ocurren las epidemias, facilitan la mezcla de heces humanas con fuentes de agua potable, lo que favorece la aparición de focos infecciosos. Sin embargo, las épocas más secas del año conllevan una reducción en el flujo de agua de ríos y arroyos, con el consiguiente aumento en la concentración de contaminantes fecales, lo que también favorece la aparición de estos brotes. Por otra parte, en el sudeste asiático, la eliminación de excrementos humanas en los ríos es común, y el uso de esta agua para beber, cocinar y/o higiene personal, podría explicar la frecuente recurrencia de esta enfermedad[8,17].

En cambio, los genotipos HEV-3 y HEV-4 están presentes en humanos y otros animales, y son los principales responsables de casos autóctonos de hepatitis E en los países industrializados. Siendo los de mayor preocupación en países no endémicos, debido a su potencial zoonótico y emergente, donde los casos suelen ser esporádicos[18]. Estos genotipos son transmitidos a los humanos a través de sus principales reservorios animales. Esta zoonosis puede darse mediante agua contaminada, alimentos contaminados y/o contacto directo con los animales. Sin embargo, se cree que la consumición de carne de cerdo cruda o semi-cruda es la principal vía de transmisión de HEV-3 y HEV-4[19]. Varios estudios han reportado el origen zoonótico en diferentes países por carne contaminada. En los mismos, la comparación genética de las cepas de los pacientes infectados con la de los productos de origen animal que habían consumido, reveló que las cepas eran las mismas[20].

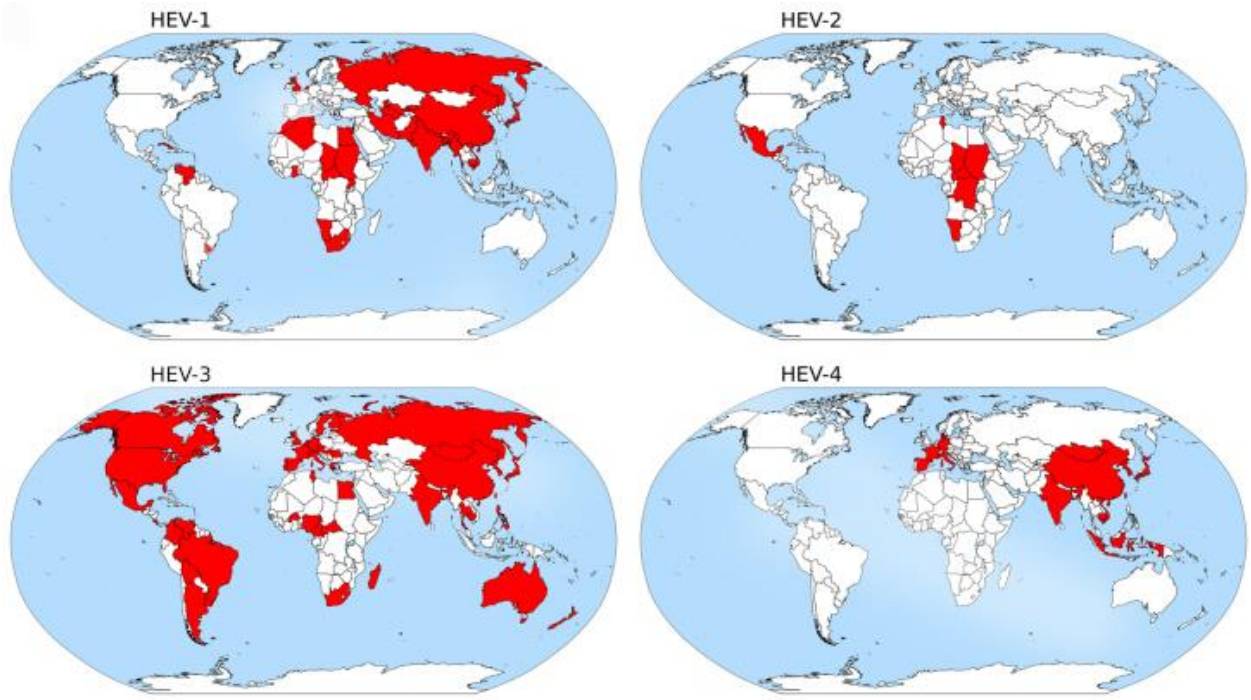

Figura 2: Distribución geográfica de los cuatro principales genotipos de HEV (HEV-1 a HEV-4). Los genotipos 1 y 2 circulan en poblaciones humanas y se transmiten principalmente a través de suministros de agua contaminados con materia fecal. HEV-2 se identificó por primera vez en México, pero posteriormente se ha encontrado en toda África. HEV-3 y HEV-4, con reservorios en porcino y otras especies, son los genotipos dominantes que afectan a las poblaciones humanas en los países industrializados. Modificado de Forni *et al.* 2018.[21]

2.5 Biología viral y organización genómica

El virus de la Hepatitis E (HEV) es un virus no envuelto, de simetría icosaédrica con un tamaño de diámetro que ronda entre 27 y 35 nm. Su genoma es de ARN simple hebra y polaridad positiva, de una extensión de 7,2 kb. El ARN genómico presenta un *cap* de 7'-metil-guanosina en su extremo 5', al cual le subsigue una pequeña región no codificante (5'NCR). En su extremo 3', el genoma viral culmina con una corta región no codificante (3'NCR) y una larga cola poli-A, de una extensión aproximada de entre 150 y 200 nucleótidos. En medio de las estructuras anteriormente mencionadas, se encuentran tres ORF's parcialmente solapados[22, 23] (Fig. 3).

En primer marco abierto de lectura (ORF1) presenta una extensión aproximada de 5,1 kb y codifica para una poliproteína no estructural de 1693 aminoácidos, precursora de las enzimas virales. Actualmente en esta poliproteína, se han identificado siete dominios funcionales putativos. En primera instancia el

dominio de la Metiltransferasa (MT), cuya función es catalizar el 5'*cap* en los ARNm virales e interactuar con la con la membrana citoplasmática de la célula, facilita la formación de complejos de replicación del genoma viral. Seguido, se encuentra el dominio Y, que contiene sitios de palmitoilación y una α-hélice hidrofóbica, esenciales para la asociación con las membranas celulares y la replicación del ARN viral. Posteriormente, el dominio proteasa de cisteína tipo papaína (PCP), es indispensable para la replicación viral y se cree que sería esencial para el procesamiento de la poliproteína. También existe el dominio PPR/HVR, correspondiente a la región hipervariable del ORF1. Este dominio le brinda flexibilidad a la proteína, y si bien no es indispensable para la replicación del ARN viral, si es esencial para la entrada y ensamblado de la cápside viral. La región HVR se reconoce como un *hotspot* de recombinación genética, lo que resulta un factor clave en la evolución del virus y su adaptabilidad. Contiguo, se presenta el dominio X, que se lo encuentra asociado a la patogénesis viral y se tienen evidencias en cultivo celular de que puede atenuar la respuesta inmune de la célula hospedera. *Downstream*, se encuentra el dominio correspondiente a la helicasa viral (Hel), que resulta indispensable en la replicación viral en el ciclo de HEV, y algunas mutaciones en la región que la codifican, pueden incrementar la severidad de la enfermedad provocada en las cepas que las porten. Por último, se encuentra la enzima encargada de polimerizar los genomas virales, la cual es una ARN polimerasa-ARN dependiente (RdRp)[24].

El segundo marco abierto de lectura (ORF2) tiene una extensión aproximada de 2 kb y codifica para la proteína estructural de la cápside. Esta ORF, contiene aproximadamente 660 aminoácidos, está involucrada en la encapsidación del genoma viral y su glicosilación en el retículo endoplasmático es importante para formar partículas virales infectivas[25].

Por último, el tercer marco abierto de lectura (ORF3), codifica para una pequeña fosfoproteína de aproximadamente 123 aminoácidos. La misma, se encuentra involucrada en la infectividad del virus a través de la inmunomodulación de la célula hospedera[26]. Además, se ha encontrado asociada al citoesqueleto de la célula hospedera y se considera esencial para el egreso del virión[25].

A pesar de que actualmente se tiene por consenso de que HEV presenta tres marcos abiertos de lectura en su genoma, recientemente se ha detectado una nueva proteína expresada únicamente en HEV-1. La cual se asocia a la polimerasa viral (RdRp) en la célula hospedera en situaciones de estrés, aumentando su actividad y por tanto la eficiencia de replicación del genoma viral. Esta pequeña proteína de aproximadamente 158 aminoácidos, estaría codificada por un nuevo marco abierto de lectura (ORF4), que se superpone al ORF1 del genoma de HEV-1[27].

La región que codifica para el ORF2 se superpone con ORF3, pero ninguno se solapa con ORF1. Por otra parte, las proteínas codificadas por ORF2 y ORF3 se producen a partir de un ARNm bicistrónico subgenómico de una longitud de 2,2 kb. Una región de unión no codificante (JR) está presente entre el ORF1 y el sitio de inicio de la región que codifica este ARN subgenómico, la cual presenta una estructura en forma de *stem-loop* que resulta crucial para la replicación del genoma y la producción de los ARNm subgenómicos virales[23].

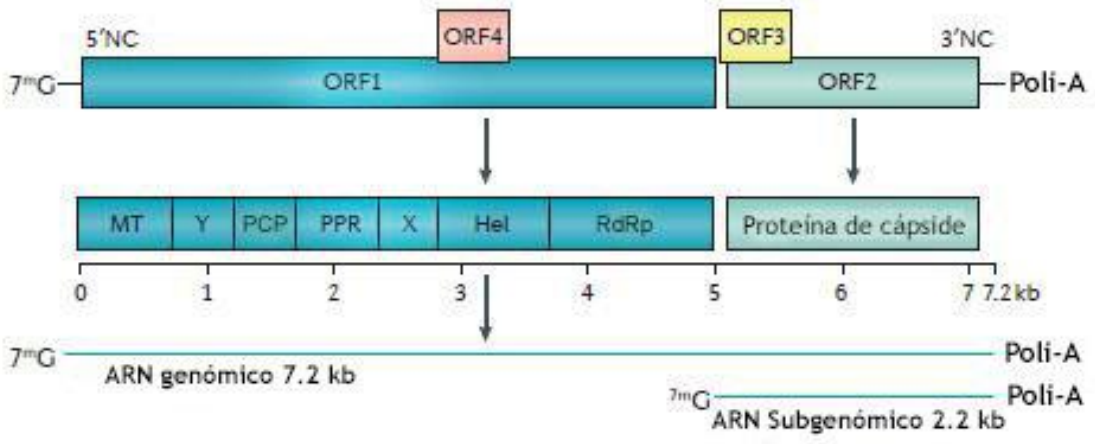

Figura 3. Genoma de HEV. La región 5' no codificante (5'NC) de HEV está cubierta con una 7'metilguanosina ($7^{m}G$) y la región 3' no codificante (3'NC) está poliadenilada (Poly-A). El marco abierto de lectura 1 (ORF1), codifica las proteínas no estructurales, que incluyen una metiltransferasa (MT), una proteasa de cisteína (PCP), una helicasa (Hel) y una ARN polimerasa-ARN dependiente (RdRp). Como asimismo las regiones Y, PPR y X, de funciones aún no clarificadas. El marco abierto de lectura 2 (ORF2), codifica para la proteína estructural de la cápside. El marco abierto de lectura 3 (ORF3), codifica una fosfoproteína involucrada en la infectividad viral. El marco abierto de lectura 4 (ORF4), presente únicamente en HEV-1, codifica una pequeña proteína que aumenta la eficiencia de la replicación viral en situaciones de estrés. Se encuentran representados el ARN genómico con 7,2 kb de largo y utilizado como molde para producir la poliproteína del ORF1. A su vez, se representa el ARN subgenómico con 2,2 kb de largo y encargado de codificar las proteínas del ORF2 y ORF3. Modificado de Kamar *et al.* 2017.[17]

Por su parte, el genoma de HEV contiene unas estructuras secundarias y terciarias, que se conocen como CREs, que mantienen la estabilidad del ARN viral y participan en las interacciones moleculares. Se forman por horquillas palindrómicas, provocadas por secuencias repetidas invertidas a lo largo del ARN simple hebra. Estas estructuras, son de vital importancia para la replicación del genoma viral y para la producción de ARNm del virus, a través de su interacción con la polimerasa viral (RdRp). HEV presenta dos de estas estructuras en su genoma: la primera se localiza en el 3'NCR y se superpone con parte del ORF2, siendo muy importante para la replicación genómica. El segundo CRE, se encuentra en el JR del genoma de HEV, oficiando como promotor para la síntesis del ARNm subgenómico que contiene la información de los ORF2 y ORF3[23].

2.6 Vías de Transmisión

La principal vía de transmisión del virus de la Hepatitis E, es la ruta fecal-oral, a través de la ingesta de comida y aguas residuales contaminadas. A su vez, la transmisión zoonótica contribuye considerablemente a la transmisión de HEV-3 y HEV-4. Tanto por el contacto directo con animales salvajes y domésticos infectados (jabalíes, ciervos, conejos y cerdos), como con sus heces (Fig. 4). Asimismo, con el consumo de carne contaminada, proveniente de los mismos[28]. También se ha detectado la presencia de mariscos y vegetales contaminados por HEV, por lo que su consumo puede ser una potencial vía de transmisión[29, 30].

Por otra parte, se encuentra la transmisión persona-persona, siendo una vía poco frecuente, pero que contribuye a la propagación del virus en epidemias que ocurren en regiones donde las condiciones de higiene son insalubres[31]. Otra ruta de infección, no menos relevante es la transmisión vertical, entre una madre que cursa una infección por HEV y su feto[32]. Siendo esta una de las tantas problemáticas que puede

surgir durante el embarazo si se contrae Hepatitis E, ya que se han descripto varios casos de prematuridad, aborto y mortalidad perinatal durante el transcurso de la enfermedad[31].

Por último, existe la transmisión parenteral, a través de transfusiones y trasplantes con sangre u órganos contaminados, respectivamente. Esta ruta de infección ocurre indiferentemente tanto en países desarrollados como en países en vía de desarrollo, siendo una transmisión de gran preocupación ya que el donador no es consciente de que otorga una muestra contaminada, debido a que generalmente la infección transcurre de forma asintomática[18, 33].

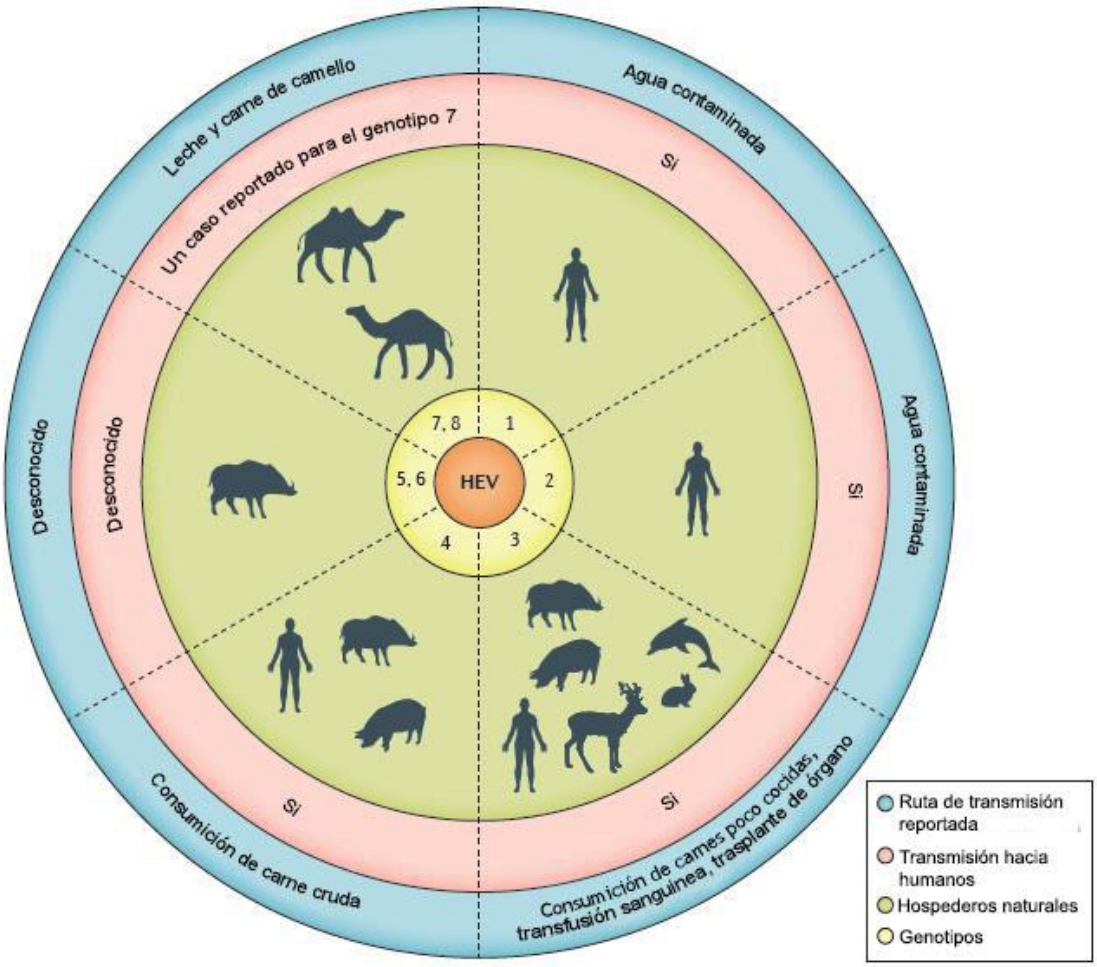

Figura 4. Rango de hospedero de HEV. El género *Orthohepevirus A* se clasifica en genotipos de HEV de 1 a 8. Los genotipos 1 y 2 están limitados a huéspedes humanos y se transmiten a través de la ruta fecal-oral, principalmente a través de agua contaminada. Los genotipos 3 y 4 tienen múltiples hospedadores y pueden transmitirse a los humanos a través del consumo de carnes poco cocidas, principalmente la carne de origen porcino. Los genotipos 5 y 6 son conocidos por infectar jabalíes; sin embargo, se desconoce si estos genotipos pueden transmitirse a los humanos. Finalmente, los genotipos 7 y 8 infectan dromedarios y camellos bactrianos, respectivamente. Se ha informado de un caso de transmisión de HEV del genotipo 7 a un paciente con trasplante de hígado que consumió carne y leche de camello. Modificado de Nimgaonkar *et al.* 2018.[34]

2.7 Presentación clínica

En la mayoría de los casos, HEV causa una enfermedad autolimitada y asintomática, con un promedio de duración de entre 4 a 6 semanas. Sin embargo, en los países desarrollados puede causar enfermedades crónicas con progresión rápida a la cirrosis, especialmente en pacientes que son trasplantados, que tienen tumores malignos hematológicos que requieren quimioterapia o que tienen infección por VIH. La enfermedad presenta un período de incubación de 2 a 6 semanas, donde luego aparecen los síntomas comunes de la hepatitis, como fiebre, náuseas, dolor abdominal, vómitos, anorexia, malestar general, hepatomegalia y en algunos casos ictericia[35]. Al igual que el resto de las hepatitis virales que manifiestan síntomas clínicos, se produce un aumento de enzimas hepáticas en sangre, siendo las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT), las más significativas. Acompañadas a su vez, por un aumento en los niveles de la fosfatasa alcalina (AP) y la gamma-glutamil-transferasa (γGT), como también de la bilirrubina en sangre[36].

Si bien es poco común, algunos pacientes desarrollan una lesión hepática grave que se manifiesta como insuficiencia hepática subaguda o aguda (o fulminante). Aquellos pacientes que presenten previamente una enfermedad crónica hepática, tienen mayor riesgo de agravar su presentación clínica. La enfermedad causada por HEV, a menudo es clínicamente y bioquímicamente indistinguible de la causada por otros virus hepatotrópicos, como el virus de la hepatitis A o el virus de la hepatitis B, excepto por sus características epidemiológicas, como la aparición de brotes y la corta edad de los pacientes[35].

En mujeres embarazadas, la infección por HEV principalmente en el primer trimestre, puede resultar en una presentación clínica más agravada, especialmente si se trata de HEV-1. En estos casos la probabilidad de contraer una insuficiencia hepática fulminante es mayor y la letalidad aumenta hasta un 25%. Los cambios hormonales e inmunológicos durante el embarazo promueven el mantenimiento del feto en el entorno materno mediante la supresión de la inmunidad mediada por células T, lo que hace que las mujeres embarazadas sean más susceptibles a las infecciones virales como la infección por HEV[37].

El riesgo de transmisión vertical de la madre al feto es muy alto, dando consigo numerosas complicaciones en la gestación. Estudios hospitalarios han asociado la infección por HEV con abortos espontáneos, nacimientos prematuros, muerte fetal y muerte neonatal, además del riesgo que le conlleva a la madre. Además, se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-HEV y ARN viral en el calostro, lo que resulta de sumo riesgo en caso de que se esté en una hepatitis aguda con elevada carga viral, ya que existe un riesgo de transmisión vertical a través de la leche materna, como asimismo de lesiones en el pezón de la madre por la succión[37, 38].

2.8 Infección crónica

Por definición, un paciente presenta Hepatitis E crónica cuando se le detecta ARN de HEV positivo en suero o heces durante más de 6 meses. En los países industrializados, los pacientes que desarrollan una infección crónica, se encuentran en general inmunodeprimidos, debido a que son receptores de trasplantes de órganos, personas con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y/o pacientes con malignidad hematológica. Una vez avanzada la cronicidad, la probabilidad de desarrollar una insuficiencia hepática y manifestaciones extrahepáticas incrementa considerablemente[39]. Si bien los casos de hepatitis E crónica involucran casi exclusivamente infecciones con HEV-3, también se ha reportado un caso de enfermedad crónica en un niño con leucemia linfoblástica aguda infectado con HEV-4[40].

Si bien la Hepatitis E crónica no presenta síntomas y manifestaciones clínicas específicas, la misma puede derivar progresivamente en una fibrosis, cirrosis y subsecuentemente en una falla hepática, la cual ocasionalmente requiere un trasplante hepático en el paciente afectado. En el 60% de los casos de HEV en pacientes inmunodeprimidos con trasplante de órgano sólido, desarrollan Hepatitis E crónica sin tratamiento antiviral, por lo que resultan casos de especial cuidado clínico[39].

Para tratar la Hepatitis E crónica, se busca reducir la dosis de fármacos inmunosupresores sumado a la implementación de IFN-alfa y/o ribavirina. Se ha informado que la reducción de las dosis de fármacos

inmunosupresores en pacientes trasplantados conduce a la eliminación espontánea de HEV en el 30% de los casos, aunque esta terapia también podría conducir al rechazo del órgano solido en los pacientes trasplantados. Muchas drogas inmunosupresoras suministradas en estos pacientes, evitan este rechazo al suprimir la respuesta de células T. Pero a su vez, se sospecha que la escasa fuerza de las respuestas de las células T es responsable de la progresión de la infección por HEV a la hepatitis crónica[39].

2.9 Manifestaciones extrahepáticas

Las manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis E pueden ocurrir en las fases aguda y crónica. Entre ellas, las complicaciones neurológicas son las más comunes, sin embargo, también pueden presentarse manifestaciones renales, pancreáticas, hematológicas y reumatológicas[20]. Se han observado varias enfermedades, incluyendo el síndrome de Guillain-Barré, amiotrofia neurálgica, glomerulonefritis, crioglobulinemia, pancreatitis, linfoma, trombopenia, meningitis, tiroiditis y miocarditis en el contexto de la hepatitis E (Tabla 1). Ya sea daño directo al tejido infectado por replicación viral extrahepática, o procesos inmunológicos inducidos por una reacción cruzada frente a componentes propios del huésped son posibles mecanismos patogénicos propuestos. Pero sin embargo hasta la fecha, los mecanismos fisiopatológicos entre el HEV y las manifestaciones extrahepáticas no se han establecido[41].

Tabla 1. Manifestaciones extrahepáticas descritas para Hepatitis E

Neurológica	Síndrome piramidal bilateral, ataxia, miopatía proximal, encefalitis, disfunción cognitiva, polineuropatía desmielinizante periférica, neuropatía sensorial periférica, síndrome de Guillain-Barré, parálisis de Bell, mielitis transversa aguda y meningoencefalitis aguda.
Renal	Glomerulonefritis membranoproliferativa, recaída de nefropatía por IgA y crioglobulinemia.
Reumatológica	Artralgia, mialgia y erupción cutánea.
Pancreática	Pancreatitis aguda.
Hematológica	Trombocitopenia y anemia aplástica.

2.10 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de hepatitis E aguda en un paciente se basa principalmente en la historia epidemiológica, manifestaciones clínicas y los resultados de las pruebas de laboratorio que se le realicen. HEV generalmente se transmite a través de la ruta fecal-oral, y muchos pacientes tienen antecedentes de beber agua contaminada, consumir alimentos crudos y procesados de origen porcino, estar en contacto con una persona que padece hepatitis y/o visitar áreas endémicas para HEV. Las manifestaciones clínicas de la hepatitis E aguda son similares a las de la hepatitis viral aguda causada por otros virus, y es difícil distinguirla de otras hepatitis virales basándose únicamente en las manifestaciones clínicas. Por ello se requieren pruebas de laboratorio con el fin de confirmar una infección por HEV[42].

Los diagnósticos de laboratorio para HEV incluyen la detección de ARN viral mediante técnicas moleculares, así como la detección serológica de inmunoglobulinas IgM o IgG anti-HEV en el suero del paciente. Los ensayos moleculares para la detección de ácidos nucleicos pueden evidenciar el ARN de HEV en las heces 1 o 2 semanas antes de la aparición de los síntomas clínicos, y hasta 52 días de comenzados los mismos[42]. En general, las pruebas de IgG anti-HEV indican contacto previo con el virus. Estos anticuerpos pueden estar presentes en los pacientes hasta 10 años después de la infección por HEV

y ocasionalmente en pacientes con una infección en curso. Los ensayos de IgM anti-HEV indican infecciones agudas recientes y deben desaparecer en pacientes después de la exposición al virus (Fig. 5). Sin embargo, el uso de estos ensayos de IgM sigue siendo dudoso, ya que la especificidad y sensibilidad de los mismos aún no están puestas a punto. Por ello la detección de ácidos nucleicos de HEV es el método estándar más directo para confirmar Hepatitis E aguda o crónica en un paciente[36].

HEV replica en el hígado durante la infección en el cuerpo humano, causando daño hepático que resulta en viremia. Durante la misma, el ácido nucleico de HEV puede ser detectado en el suero o heces del paciente infectado (Fig. 5). Siendo la transcripción reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa anidada (RT-nPCR) y los ensayos de RT-PCR en tiempo real, los principales métodos moleculares para la detección de los ácidos nucleicos de todos los genotipos de HEV[42]. Usualmente, las detecciones en heces mediante PCR pueden ser mucho más sensibles que la detección del ARN de HEV en suero. Sin embargo, debido a la practicidad y la aceptación de los pacientes, las pruebas de PCR en muestras de sangre son más factibles y se usan con más frecuencia[36].

Usualmente, las infecciones por HEV no necesitan tratamiento en paciente inmunocompetentes, ya que por lo general la enfermedad se resuelve espontáneamente. Si embargo, en algunas ocasiones, en pacientes con una infección aguda de HEV grave, el tratamiento con ribavirina durante aproximadamente 3 semanas, ha demostrado ser efectivo. Asimismo, con aquellos pacientes que transcurren una infección crónica causada por HEV, la ribavirina es el tratamiento más convencional. En los pacientes crónicos la duración del tratamiento con ribavirina es más extendida, llegando a ser de una media de 3 meses para lograr el *clearance* viral. A pesar de esto, en casos crónicos se han utilizado con éxito como tratamiento los peg-INF, pero los mismos están asociados a efectos secundarios importantes. Generalmente, estos interferones son una mejor opción en receptores de trasplantes donde la inmunosupresión no es posible. En el embarazo, la terapia con ribavirina está contraindicada debido a la teratogenicidad del medicamento. Sin embargo, el riesgo tanto para el feto como para la madre es alto si no se trata la infección, por lo tanto, se debe considerar la implementación de esta terapia[44,45].

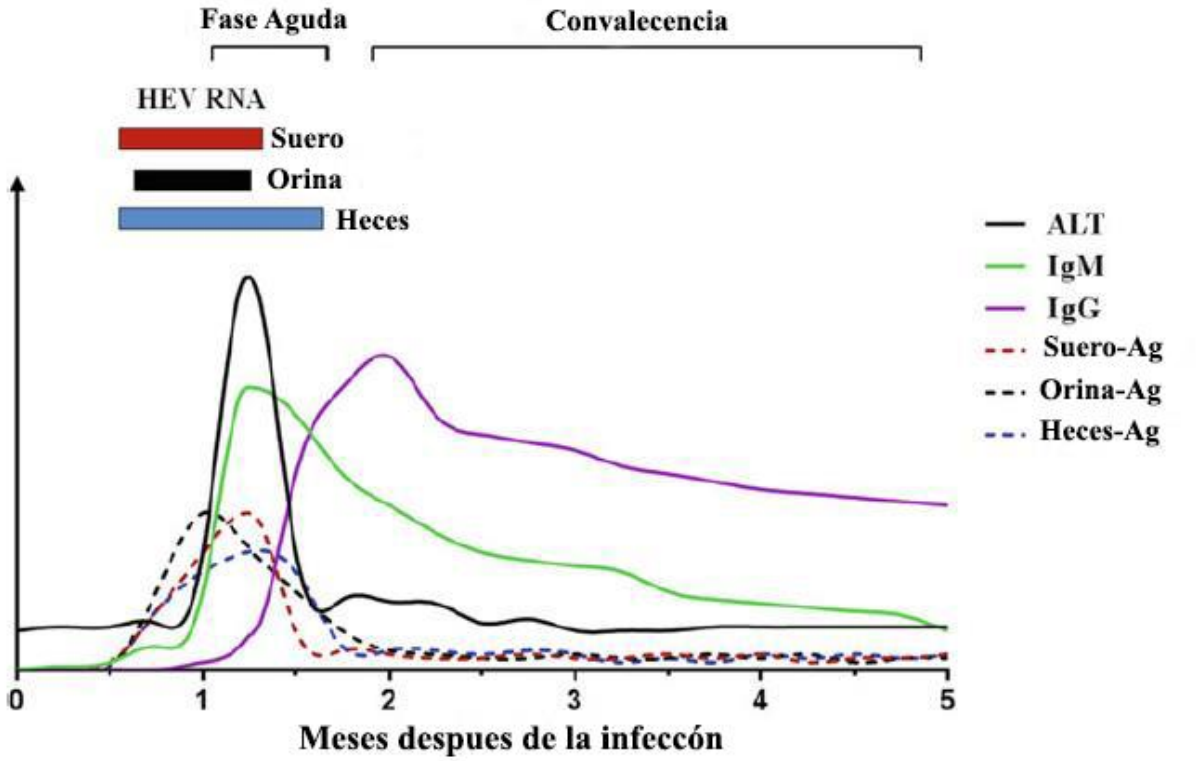

Figura 5. Cambios dinámicos en los marcadores de HEV durante una infección aguda. Se observa el periodo de tiempo en el cual existen niveles detectables de ARN de HEV en suero (rojo), orina (negro) y heces (celeste). Como asimismo los niveles de la enzima hepática alanina aminotransferasa (ALT), anticuerpos anti-HEV (IgM e IgG), y antígenos (Ag) de HEV detectables en las muestras clínicas. Extraído de Zhao *et al*. 2016.[42]

2.11 Hepatitis E en Uruguay: Una virosis emergente

Desde hace unos 25 años el HEV ha sido detectado y caracterizado en varios países de Latinoamérica[46]. Sin embargo, los primeros casos clínicos en Uruguay fueron detectados en el año 2009. Desde entonces, a pesar de ser considerado un país no endémico, el número de casos ha ido en aumento[47, 48]. El primer caso autóctono reportado, perteneció a una cepa de HEV-3, y al igual que el resto de la región, en nuestro país dicho genotipo es el más prevalente entre los humanos[46, 47, 49]. Posteriormente, se detectó en un paciente la presencia de HEV-1, siendo este el primer caso autóctono registrado en Uruguay para dicho genotipo[50].

Las cepas de HEV-3 autóctonas halladas en pacientes, están filogenéticamente relacionadas con cepas de cerdos europeos, precisamente de Alemania[51]. Por lo que el origen zoonótico de estos casos no resultaría sorprendente. Si bien la epidemiologia molecular de este virus en sus reservorios naturales, sigue siendo

un terreno desconocido para nuestro país, recientemente, se han encontrado cerdos domésticos y jabalíes salvajes, positivos para HEV, cuyas cepas, contienen una alta identidad nucleotídica con respecto a las cepas humanas reportadas para Uruguay[49].

2.12 Relevancia de HEV

Los actuales estudios de Hepatitis E en Uruguay y la región, han demostrado que HEV es un problema de actualidad. El potencial zoonótico y el carácter emergente de este virus presentan un riesgo en salud pública. Por lo que estudios de epidemiologia molecular, tanto en humanos, como en animales salvajes y de granja, pueden ayudar a prevenir el número de casos autóctonos en nuestro país. Evitando así, la dispersión de este virus y aportando conocimiento de la enfermedad a nuestra población. En Uruguay, no se conoce la incidencia de HEV, y no existen estudios epidemiológicos. Por ello es de gran importancia la presente tesina, para poder actualizar la epidemiología de este virus en el país.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo general estudiar y actualizar la epidemiologia de HEV en Uruguay, a través de un relevamiento molecular en pacientes con hepatitis aguda sin etiología determinada. Asimismo, pretende investigar y caracterizar en profundidad las cepas de HEV identificadas en los casos clínicos.

3.2 Objetivos específicos

1. Detectar HEV en pacientes con cuadro de hepatitis aguda. Identificar por métodos moleculares la infección por HEV en muestras de pacientes con hepatitis aguda sin etiología definida.

2. Detectar partículas virales en la materia fecal de pacientes positivos para HEV, mediante microscopia electrónica de transmisión.

3. Profundizar el estudio de casos puntuales positivos para HEV, y caracterizar molecularmente la cepa de HEV implicada a través del análisis de múltiples regiones del genoma.

4. Cuantificar la carga viral por PCR en tiempo real cuantitativa de aquellas muestras donde se haya detectado la presencia de HEV.

5. Aislar *in vitro* las cepas detectadas utilizando líneas celulares susceptibles.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestras

En esta tesis fueron analizadas 26 muestras de sueros por paciente estudiado, todos ellos provenientes del Hospital Central de las Fuerzas Armadas (HCFFAA), los cuales presentaban un cuadro clínico de hepatitis aguda sin etiología definida o una alteración del Enzimograma hepático, pero no así sintomatología. Por otra parte, se analizó una muestra de materia fecal por microscopía electrónica de transmisión, la cual pertenece al paciente diagnosticado con Hepatitis E. En todos los casos, los pacientes brindaron su consentimiento informado para participar del estudio.

4.2 Detección molecular de HEV

4.2.1 Extracción de ARN viral a partir de suero

A partir de las muestras tomadas, se extrajo el ARN total haciendo uso del kit comercial *QIAamp Viral RNA* (*QIAGEN*®, *Alemania*), siguiendo el protocolo especificado en el mismo y se las conservó a -80 °C hasta el momento de ser utilizadas.

4.2.2 Amplificación de la región ORF1 del genoma viral

Para la detección del ARN viral de HEV en las muestras de pacientes, se amplificó por retrotranscripción seguida de PCR anidada (RT-nPCR) un fragmento de 287 pares de bases (pb) ubicado en el extremo 5' del genoma, correspondiente al gen de la metiltransferasa. Para ello, se procedió en una primera instancia a realizar una retrotranscripción con la enzima *RevertAid*™ (*Fermentas life Science, EEUU*). La mezcla de retrotranscripción para cada muestra fue realizada a un volumen total de 11 µL, y colocada a 70 °C durante 5 minutos, seguida de una incubación en hielo durante otros 5 minutos. La mezcla constaba de 5 µL de ARN extraído, 4 µL de agua estéril y 2 µL del *primer* HEA1 (10µM). Posteriormente, se realizó y agregó la mezcla de reacción, cuyo volumen final era de 9 µL. Dicha mezcla contenía 4 µL de *buffer* de

reacción a 5X, 2 µL de dNTP's a 10 µM, 2 µL de agua estéril y 1 µL de transcriptasa reversa (1U/µL). La mezcla final contenía 20 µL, y se incubó 1 hora a 42 °C para la retrotranscripción, seguido de 15 minutos a 70 °C para inactivar a la enzima.

Una vez obtenidos los ADN copia (ADNc) de cada muestra, se procedió a realizar la primera ronda de amplificación de la PCR anidada. Para cada uno de los tubos de reacción con volumen final de 50 µL, se colocó 5 µL de ADNc, 5 µL de *buffer* de reacción a 10X, 4 µL de $MgCl_2$ a 25 mM, 1 µL de dNTP's a 10 µM, 1 µL de cada uno de los *primers* externos HEA1 y HES1 (50 µM), 32,6 µL de agua estéril y 0,4 µL de la enzima ADN polimerasa (5U/µL) (*Taq™ DNA Polymerase, Fermentas Life Science, EEUU*). El ciclado realizado constó de un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 50 °C más 60 segundos a 72 °C, y un último paso de extensión a 72 °C durante 10 minutos. La segunda ronda de amplificación se realizó utilizando 5 µL de producto de PCR correspondiente a la primera ronda de amplificación por muestra, siguiendo el mismo protocolo especificado, pero usando los *primers* internos HEA2 y HES2 (50 µM).

4.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

La detección de los productos de PCR y la visualización del fragmento de 287 pb amplificado, se realizó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (*Invitrogen™, EEUU*), donde se colocó 500 mg de Agarosa (*Amresco, EEUU*) en 50 mL de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, y una vez disuelto en el mismo se colocaron 5 µL de *SYBR® safe DNA Gel Stain*. Además de las muestras con los respectivos controles negativos y positivos, también se incluyó en la corrida electroforética al marcador de peso molecular de 100 pb *DNA Ladder*, (*Invitrogen™, EEUU*).

4.3 Profundización del caso problema

4.3.1 Microscopia Electrónica

Se realizó la detección de partículas virales en la materia fecal, mediante microscopía electrónica de transmisión, adaptando el protocolo de Amo *et al.* (1999) del caso problema[52]. La visualización se llevó a cabo en la Unidad de Microscopía Electrónica de Facultad de Ciencias de la Universidad de la República.

En una primera instancia se resuspendió la muestra fecal del paciente problema en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) al 10%, por duplicado en dos tubos falcon. Se mezclaron mediante vortex durante aproximadamente 5 minutos, llegando a un volumen final de 40 mL de materia resuspendida por tubo. Los cuales se procedieron a centrifugar a 15000 rpm a 4 °C durante 15 minutos, recuperando la fracción sobrenadante. El volumen obtenido fue filtrado en su totalidad a través de un microfiltro de jeringa *ABLUO*® (*GVS™, Filter Technology, Reino Unido*), con tamaño de poro de 0,2 µm, para luego centrifugar el filtrado a una velocidad de 45000 rpm a 4 °C durante 2 horas, en una ultracentrífuga Sorvall™ WX+ (Thermo Scientific™, EEUU) y utilizando un rotor T-865. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido en 700 µL de PBS 1X, para conservar adecuadamente en heladera a 4 °C.

Posteriormente, se procedió a visualizar mediante el microscopio electrónico de transmisión *Jem 1010 (Jeol Ltd., Japón)*, en la Unidad de Microscopía Electrónica de Facultad de Ciencias (UdelaR). Para ello, se colocó 10 µL del resuspendido de materia fecal sobre una grilla de cobre con film de carbón de 200 mesh, dejándose decantar por 2 minutos. Luego se secó el exceso con papel filtro y se colocó 10 µL de acetato de uranilo al 2%, dejando actuar al mismo durante 5 minutos. Se drenó el exceso y una vez seca la muestra, se colocó en el microscopio para observar a 100 kv.

4.3.2 Extracción de ARN viral a partir de la materia fecal

Previo a la extracción de ARN de la muestra de material fecal por *Trizol®(Invitrogen™, Life Technologies, EEUU)*, se procedió a resuspender la misma al 10% en PBS, tal y como se especifica en la anterior sección. Una vez realizado esto, se tomó 1 mL de muestra resuspendida y se centrifugó a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, donde se tomó 1 mL de sobrenadante y se pasó a un falcon para proseguir con la extracción. Al mismo se le agregó 2 ml de Trizol®, se le aplicó vortex durante 1 minuto y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. De esta mezcla se tomó 1 mL para un tubo eppendorf y se le agregó 200 µL de cloroformo, homogeneizándose mediante vortex durante 1 minuto y dejando reposar otros 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se procedió a centrifugar a una velocidad de 13400 rpm, durante 14 minutos, donde se tomó 600 µL de la fase acuosa superior y se llevó a un nuevo tubo. Al mismo, se le agregaron 600 µL de alcohol isopropílico y se mezcló por inversión 5 veces, dejándose posteriormente reposar a -20 °C durante 5 minutos, para precipitar el ARN. Pasado este tiempo, se centrifugó a 13400 rpm durante 14 minutos, para luego descartar el sobrenadante del tubo y lavar el pellet con 1 mL de etanol. Se efectuó una nueva centrifugación a una velocidad de 7500 rpm y se descartó el etanol sobrenadante, dejando secar el pellet con el tubo abierto en una estufa a 37 °C durante 20 minutos aproximadamente. Una vez hecho esto se resuspendió el mismo en 40 µL de agua destilada estéril libre de RNAsas, y se incubó en baño maría a 60 °C por 10 minutos. Por último, se rotuló y se conservó adecuadamente el ARN extraído a -80 °C hasta el momento de ser utilizado.

4.3.3 Retrotranscripción

Se amplificaron múltiples regiones del genoma de HEV en un caso problema, con el fin de profundizar su caracterización molecular. Los fragmentos amplificados corresponden al gen de la metiltransferasa (MT) con un largo de 287 pb, a la región hipervariable (HVR) con un largo de 687 pb, una región solapante entre el primer y segundo marco abierto de lectura (ORF 1/2) de 662 pb, y tres regiones del ORF2

correspondientes al gen de la cápside (CAP1, CAP2, CAP3) con un largo de 348 pb, 728 pb y 958 pb, respectivamente (Fig. 6).

En el caso de las regiones MT, CAP1 y ORF 1/2, se realizó una única transcripción reversa con *random primers* generando un ADNc a partir del cual se amplificaron las distintas regiones mediante PCR anidada. Para dicho ensayo se utilizó la enzima *RevertAid*^{TM} (*Fermentas life Science, EEUU*). La mezcla de retrotranscripción para cada muestra fue realizada a un volumen total de 10 µL, y colocada a 70 °C durante 5 minutos, seguida de una incubación en hielo durante otros 5 minutos. La mezcla constaba de 5 µL de ARN extraído previamente, 4 µL de agua estéril y 1 µL de *random primers* a 10 µM. Posteriormente, se realizó y agrego la mezcla de reacción, cuyo volumen final era de 10 µL. La cual contenía 4 µL de buffer de reacción a 5X, 2 µL de dNTP's a 10 µM, 3µL de agua estéril y 1 µL de transcriptasa reversa (1U/µL). Posteriormente los tubos con un volumen final de 20 µL, se incubaron 1 hora a 42 °C, seguido de otros 15 minutos a 70 °C.

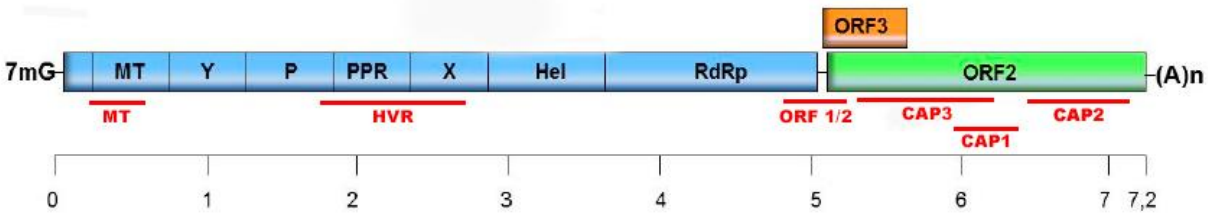

Figura 6. Regiones amplificadas en el genoma de HEV. Esquema del genoma viral de HEV, donde se marca con líneas rojas las regiones amplificadas (MT, HVR, ORF 1/2, CAP1, CAP2, CAP3). Modificado de Lhomme *et al.* 2016.[53]

Para el caso de las regiones CAP2, CAP3 y HVR, se realizaron retrotranscripciones con *primers* específicos para cada una de las regiones. Donde también se utilizó la enzima *RevertAid*^{TM} (*Fermentas life Science, EEUU*). La mezcla de retrotranscripción para cada región fue realizada a un volumen total de 11 µL constando de 5 µL de ARN extraído, 4 µL de agua estéril y 2 µL del *primer* reverso de la región implicada a 10 µM (Tabla 2). Luego se agregó la mezcla de reacción, cuyo volumen final era de 9 µL y constaba de 4 µL de *buffer* de reacción a 5X, 2 µL de dNTP's a 10 µM, 2µL de agua estéril y 1 µL de

transcriptasa reversa (1U/ µL). La mezcla final de cada ensayo contenía un volumen de 20 µL, la cual se incubó 1 hora a 42 °C para la retrotranscripción, seguido de 15 minutos a 70 °C para la inactivación de la enzima.

4.3.4 PCR de las regiones MT, Cápside grande, HVR y ORF-1/2

Una vez obtenidos los ADNc, se procedió a realizar un ensayo de PCR anidada para amplificar cada una de las regiones de interés. Se realizó el mismo protocolo indicado en la sección *4.1.2*, modificando la temperatura correspondiente a la etapa de hibridación de los *primers* en el ciclado de PCR, para que coincidiera con la Tm de los *primers* correspondientes. Para la región MT, se utilizó una temperatura 50 °C, para la región ORF1/2 una temperatura de 60 °C, para la región CAP2 una temperatura de 48 °C, mientras que para las regiones HVR, CAP1 y CAP3 se utilizó una temperatura de 58 °C. Para ambas rondas de amplificación se utilizaron *primer* internos y externos, de la región implicada en cada caso (Tabla 2).

4.3.5 Real time PCR cuantitativa

Se cuantificó mensualmente durante 5 meses seguido, la carga viral del paciente luego de iniciado el tratamiento con ribavirina y contando para ello con un solo ARN extraído del suero para cada uno de los meses. Se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real y utilizando la tecnología *SYBR® Green* (*Applied Biosystems™, EEUU),* donde se amplificó un fragmento genómico de 137 pb, que solapa entre el ORF2 y el ORF3 del genoma de HEV, haciendo uso del kit *SuperScript® III Platinum® SYBR® Green-One-Step qRT-PCR* (*Invitrogen™, Life Technologies, EEUU*) tomando de referencia el protocolo descripto por Inoue *et al.* (2006), con modificaciones[54]. Para realizar la curva estándar de cuantificación absoluta y extrapolar la Ct de cada muestra en ella, se utilizaron tres muestras de ARN estandarizadas con una concentración conocida de $4x10^7$, $4x10^6$ y $4x10^5$ copias/µL respectivamente. Estas muestras fueron realizadas mediante transcripción *in vitro* a partir de un plásmido clonado con el fragmento de interés y

cuantificadas con anterioridad por Cancela en su tesis de Maestría[55]. Esta PCR cuantitativa en tiempo real es capaz de amplificar y detectar hasta un mínimo de 10^2 copias/µL, resultado también visto por Cancela en su tesis de Maestría[55].

Siguiendo el protocolo establecido, a cada tubo de reacción se le agregó, 3 µL de la muestra de ARN, 12,5 µL de *buffer* 2X *SYBR® Green*, 8 µL de agua estéril, 0,5 µL de cada uno de los *primers* FRT y RRT a 10 µM, 0,5 µL de *Taq platinum® Superscript III* (*Invitrogen™, EEUU)* y 0,05 µL de ROX. El experimento se realizó en el equipo *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, EEUU)*, utilizando su *software* correspondiente. La reacción contó con una primera etapa de retrotranscripción, donde se incubó la muestra a 42 °C durante 30 minutos, seguido de una nueva incubación a 95 °C durante 10 minutos. Luego se iniciaron 40 ciclados de: 20 segundos a 95 °C, 20 segundos a 60 °C y 45 segundos a 72 °C, para la amplificación de las muestras.

4.3.6 Secuenciación

Luego de observar los fragmentos de tamaño esperado en el gel de electroforesis, se prosiguió con la purificación de las bandas a través del *kit Zymoclean® Gel DNA Recovery* (*Zymo Research™, EEUU*). Una vez purificados los fragmentos, fueron secuenciados por el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. Las secuencias obtenidas fueron cotejadas y editadas para su posterior análisis en el *software BioEdit* versión 7.0.5.3[56]. Luego fueron comparadas con secuencias de referencia de HEV disponibles en la base de datos *GenBank®* del *NCBI* (disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) utilizando el programa de alineamientos *BLAST* (*Basic Local Aligment Search Tool*, disponible en: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

4.3.7 Análisis filogenético

Una vez editadas las secuencias y cotejadas con la base de datos, se les realizó un análisis filogenético de las regiones MT, CAP3 y ORF1/2, utilizando el *software MEGA* versión 6.0.6[57]. Las respectivas filogenias fueron realizadas utilizando el método *Neighbor-Joining*, con el modelo de *Tamura-Nei* como modelo de sustitución nucleotídica y utilizando 1000 réplicas de *Bootstrap*.

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación de las distintas regiones del genoma de HEV. Las posiciones son tomadas en cuenta según la cepa de referencia de HEV-3: Sar-55 (M8058)

Región	Nombre	Secuencia (5'→3')	Polaridad	Posición(nt)	Producto	Referencia
MT	HES1	CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC	Directo	51-77	287 pb	Wang *et al.*, 1999.[58]
	HEA1	CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC	Reverso	397-419		
	HES2	CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG	Directo	50-70		
	HEA2	GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC	Reverso	313-336		
CAP1	3156	AATTATGCCTCAGTACTCGGAGTTG	Directo	5687-5708	348 pb	Meng *et al.*, 1997.[59]
	3157	CCCTTAGTCCTTGCTGACGCATTCTC	Reverso	6395-6417		
	3158	GTTAATGCTTCTGCATATCATGGCT	Directo	5972-5993		
	3159	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC	Reverso	6298-6319		
ORF 1/2	EXT1	TGGAAGAARCAYTCYGGTGAGCC	Directo	4535–4557	662 pb	Takahashi *et al.*, 2002.[60]
	EXT2	GGGGTTGGTTGGATGAATATAGGGGA	Reverso	5276–5301		
	INT1	TGGAAYACYGTCTGGAAYATGGC	Directo	4571–4593		
	INT2	GGAGTGCGAAGGGCTGAGAATC	Reverso	5257–5278		
CAP2	G2ES	CGCAACCTCACCCCTGGTAACAC	Directo	925-947	728 pb	Maila *et al.*, 2004[61]
	G2EA	CAGAAAGAAGGAGGGCACAAGC	Reverso	1991-2012		
	G2IS	CTCAGCAGGATAAGGGTATTGC	Directo	1256-1277		
	G2IA	CTATAACTCCCGAGTTTTACC	Reverso	1963–1983		
HVR	HVRFE	GGTAATAARACCTTCMGSACGWCGKTKGTTG	Directo	1737-1767	687 pb	Kabrane-Lazizi *et al.*, 2001.[62]
	HVRRE	CGGGAGCAAGTCTCCCGGTASGCWGCCTC	Reverso	2710-2682		
	HVRFI	CCCAGCGSCWTTCGCTGACCGG	Directo	2011-2029		
	HVRRI	CCCGGTASGCWGCCTCAAGCCTC	Reverso	2697-2675		
CAP3	CNSFe	CAGCCCTTCGCMCTCCCCTATATTCATC	Directo	5331-5358	958 pb	Mirazo *et al.*, 2013. [48]
	CNSRe	CMGTCGGCTCGCCATTGGCYGARAC	Reverso	6354-6335		
	CNSFi	CTGGAGCTCGCCCTCGRCAGCC	Directo	5346-5367		
	CNSRi	CCRGCCGACGAAATYAATTCTGTCGGS	Reverso	6306-6281		

4.4 Aislamiento viral en la línea celular A549.

4.4.1 Células

Para el aislamiento se utilizó la línea celular A549 (*ATCC® CCL-185™, EEUU*) de carcinoma de pulmón humano, a la cual se le realizó sucesivos pasajes celulares seriados, según el protocolo descrito previamente por Mirazo en su tesis doctoral[63].

4.4.2 Preparación del inóculo de HEV

La cepa viral de HEV seleccionada fue aislada del resuspendido de materia fecal al 10% en PBS. Previo al aislamiento, dicho material fue centrifugado a una velocidad de 13400 rpm durante 5 minutos, donde se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de un microfiltro de jeringa *ABLUO®* (*GVS™, Filter Technology, Reino Unido*), con tamaño de poro de 0,2 µm. Luego se recuperó 500 µL de suspensión viral.

4.4.3 Aislamiento en A549

Las células A549 fueron cultivadas en una placa de 24 pocillos (0,5 mL de volumen final por pocillo) con un medio *Dulbecco-Eagle F12* (DMEM F12) (*Invitrogen™, Life Technologies, EEUU*), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (*Invitrogen™, Life Technologies, EEUU*) y 100 µg/mL de estreptomicina (*Sigma-Aldrich™, EEUU*). Las mismas fueron conservadas en estufa a 37 °C con una atmosfera humidificada de 5% de CO_2. Previo a la inoculación del virus, se verificó mediante microscopio óptico invertido que la monocapa de células tuviera una confluencia aproximada del 70%, para lavarla con 1 ml de PBS 1X e infectarla agregando al pocillo 250 µL del inóculo diluido 1:10 (25 µL de inóculo viral puro + 225 µL de medio DMEM F12 sin suero). En paralelo se utilizó un control de células sin infectar, sembrando en el pocillo 250 µL de medio DMEM F12 sin suero. Se incubó en estufa a 37 °C durante 1 hora y 30 minutos, para luego retirar el inoculo, lavar con 1 mL de PBS, agregar 0,5

mL de medio DMEM F12 con 5% de SFB a cada pocillo y conservar la placa adecuadamente en estufa a 37 °C.

Al tercer día post-infección se repicaron las células por primera vez. Para ello, se lavó la monocapa con 1mL de PBS 1X y luego fueron levantadas mediante tripsinización, exponiendo a las células a una solución de tripsina 0,25% (*Invitrogen™, Life Technologies, EEUU*) entre 5 y 10 minutos. Posteriormente las células se diluyeron 1:4 en medio de crecimiento fresco (DMEM F12 con 10% de SFB), y se cultivaron otros 3 días en estufa a 37 °C, hasta el momento de realizarse el siguiente pasaje. Las células infectadas y el control sin infectar, fueron repicadas en serie hasta el octavo pasaje, momento en el cual ambas células fueron traspasadas totalmente a una botella de cultivo con volumen final de 5 mL (0,5 mL de células + 4,5 mL de medio DMEM F12 con 10% de SFB), para aumentar la superficie de crecimiento de la monocapa. En todo momento estos procesos fueron controlados bajo visualización de microscopía óptica, verificando que las células se mantuvieran viables.

4.4.4 PCR integrada al cultivo celular (ICC-PCR, Integrated Cell Culture-PCR)

En una primera instancia, se procedió a levantar las células infectadas y el control negativo, desde sus respectivas botellas de cultivo obtenidas en el aislamiento. Para ello se quitó el contenido de las mismas, se lavó con 3 mL de PBS y se tripsinizó ambas botellas con 2 mL de tripsina 0,25%. Se dejó reposar en estufa a 37 °C durante aproximadamente 10 minutos, para luego neutralizar cada botella con 2 mL de medio DMEM F12 sin suero. Se resuspendió el volumen total de ambas botellas y se pasó 1 mL a un eppendorf para conservar las células adecuadamente en freezer de -80 °C hasta el momento de ser utilizadas.

Posteriormente, se llevó a cabo una extracción de ARN total desde las células infectadas y el control negativo, utilizando el reactivo *Trizol®* (*Invitrogen™, Life Technologies, EEUU)*. En cada caso, se tomó 200 µL de células conservadas y se le colocó 1 mL de Trizol, aplicándole seguidamente 1 minuto de vortex y dejando reposar otros 5 minutos a temperatura ambiente. Se prosiguió con el resto del protocolo

tal y como se especifica en la sección *4.2.2*, y se conservaron los ARN extraídos a -80 °C hasta el momento de ser utilizados. Para verificar la presencia de ARN viral se realizó una retrotranscripción seguido de una PCR anidada para amplificar una región del genoma correspondiente al gen MT, siguiendo el protocolo descrito en *4.1.2*.

5. RESULTADOS

5.1 Detección de HEV mediante RT-PCR anidada

De las 26 muestras de suero provenientes del Hospital Central de las Fuerzas Armadas (HCFFAA) analizadas, solo una resultó positiva. Se observa en el gel de electroforesis una banda de 287 pb (Fig. 7), luego de la amplificación del fragmento correspondiente al gen MT en el ORF1 del genoma viral. Se confirmó así que la etiología de la hepatitis en este paciente fue causada por HEV.

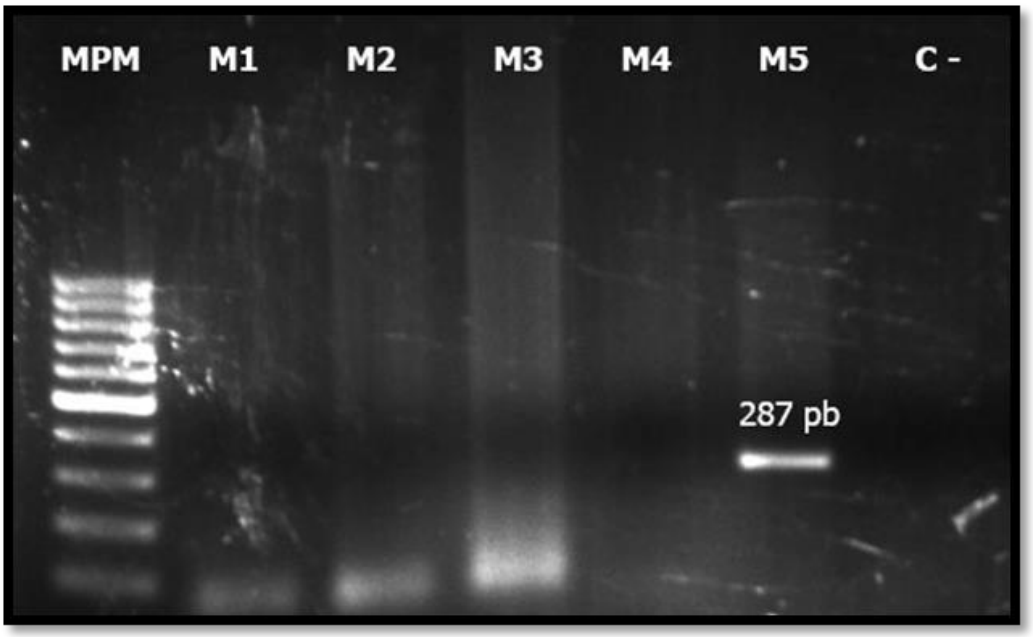

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb (GeneRuler™, Fermentas Life Sciences, EEUU). En el sexto carril se visualiza la banda de 287 pb correspondiente a la región amplificada mediante RT-nPCR en la única muestra positiva (M5). En el séptimo carril se ubica el control negativo (C-) y el resto de los carriles corresponden a muestras negativas (M1, M2, M3 y M4).

5.2 Estudio del caso problema

El único caso encontrado positivo para HEV, resultó ser un paciente masculino de 62 años receptor de trasplante hepático en el año 2014 en el Programa de Trasplante Hepático del Hospital de las Fuerzas Armadas (HCFFAA), el cual posteriormente en enero del 2016 se presentó en la clínica, con una elevación asintomática en los niveles de sus enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). La biopsia hepática en este punto, reveló una histología compatible con una hepatitis aguda. Se descarta la presencia de hepatitis viral A, B y C, Citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein Barr (EBV) como posibles agentes virales causantes de la etiología. Como asimismo, el rechazo agudo al órgano solido trasplantado o hepatotoxicidad. Estos estudios fueron realizados en el HCFFAA. En marzo de 2016, se reinició el tratamiento con esteroides debido a que el nivel de las enzimas hepáticas en el paciente no se normalizaba. Sin embargo, no se obtuvo respuesta alguna. Considerando que la oscilación de las enzimas hepáticas perduraba y que una segunda biopsia hepática mostraba una histología compatible con una etiología viral, por lo que se comenzó a sospechar de HEV como posible causante de la hepatitis. Cabe destacar, que estos datos fueron proporcionados por el servicio de hapatología del Programa de Trasplante Hepático del HCFFAA.

Una vez corroborada la hipótesis de HEV como agente viral causante de la enfermedad y diagnosticado el paciente con Hepatitis E, se llevó a cabo exitosamente la caracterización molecular de la cepa de HEV, como asimismo la profundización en el estudio del caso clínico.

5.2.1 Microscopia electrónica en materia fecal

A partir del ultracentrifugado de materia fecal resuspendida del paciente problema, se logró visualizar mediante microscopía electrónica de transmisión partículas virales con un diámetro aproximado de 40 nm (Fig. 8).

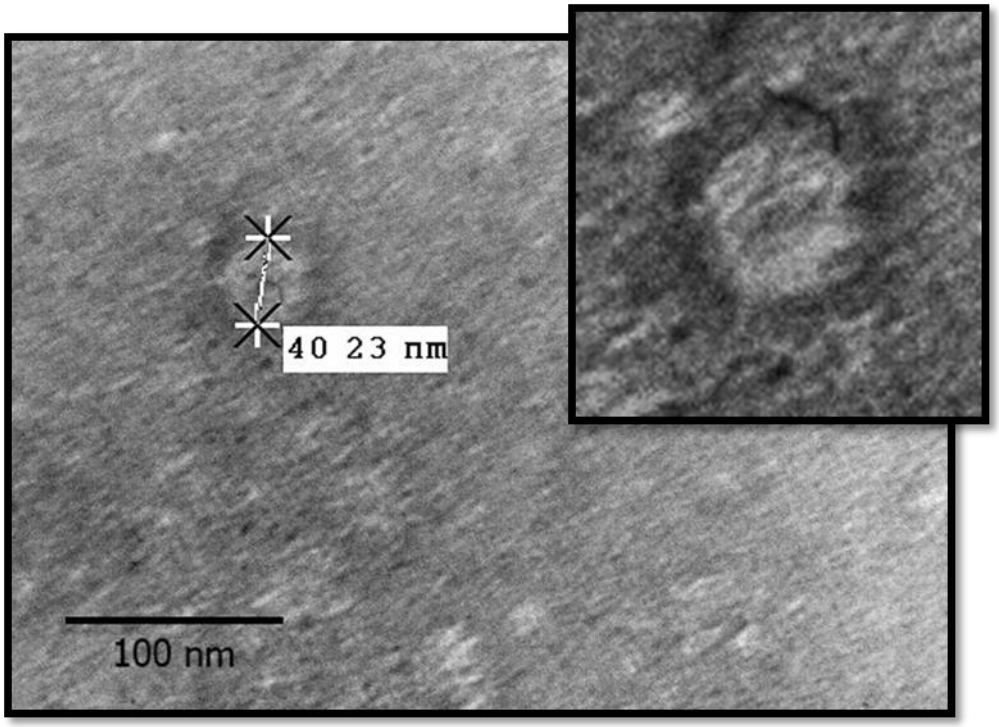

Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión a partir de materia fecal del paciente. A partir de un aumento de 150000X se visualiza una partícula viral de HEV, con un diámetro de 40 nm aproximadamente. En la esquina superior derecha, se observa de forma amplificada la imagen tomada de la partícula viral.

5.2.2 Amplificación de las múltiples regiones del genoma de HEV

La amplificación de las regiones del genoma de HEV mediante RT-nPCR, realizada con el fin de realizar la caracterización molecular de la cepa infectante, fue llevada a cabo con éxito, resultados que pueden corroborarse en la figura 9, correspondiente al gel de electroforesis realizado para visualizar el tamaño de bandas esperadas para cada región.

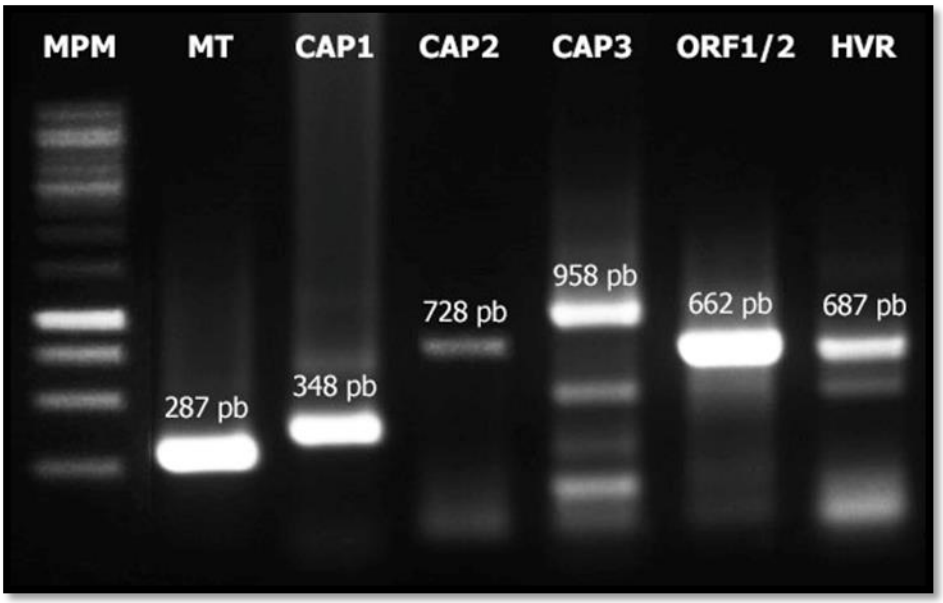

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 kb (GeneRuler™, Fermentas Life Sciences, EEUU). Carril 2: Producto de la PCR de la región MT (287 pb). Carril 3: Producto de la PCR de la región CAP1 (348 pb). Carril 4: Producto de la PCR de la región CAP2 (728 pb). Carril 5: Producto de la PCR de la región CAP3 (958 pb). Carril 6: Producto de la PCR de la región ORF1/2 (662 pb). Carril 7: Producto de la PCR de la región HVR (687 pb).

Se observa, en una primera instancia, el producto de PCR correspondiente al gen MT en el ORF1, cuyo fragmento se visualiza en la corrida electroforética con un tamaño de 287 pb. Asimismo, se logró amplificar correctamente las tres regiones correspondientes en el gen de la cápside (CAP1, CAP2, CAP3) en el ORF2, cuyos productos logran visualizarse con un tamaño de 348 pb, 728 pb y 958 pb, respectivamente. A su vez, logra visualizarse la correcta amplificación de la región que solapa entre el ORF1 y ORF2, con un tamaño de 662 pb. Asimismo, se observa el fragmento de 687 pb, correspondiente al fragmento amplificado de la región hipervariable (HVR).

En los carriles correspondientes a las regiones CAP3 y HVR, pueden observarse bandas adicionales con un tamaño que no es el esperado, probablemente de una amplificación inespecífica en la reacción de PCR. A pesar de esto, en todos los productos de PCR se logró visualizar y purificar correctamente los

fragmentos esperados, a través del kit de purificación de banda cortada a partir del gel. Para luego ser enviados a secuenciar con el fin de identificar los mismos y proseguir con la caracterización.

5.2.3 Caracterización molecular

La determinación del genotipo viral de la única muestra positiva encontrada en este trabajo, se realizó mediante la secuenciación y análisis de todas las regiones amplificadas (MT, CAP1, CAP2, CAP3, ORF1/2, HVR). A través del programa de alineamientos BLAST, se logró determinar en todos las secuencias que la cepa extraida presentó una alta identidad nucleotídica con HEV-3. Y que a se vez, la misma estaba muy relacionada con cepas de suinos y humanos aisladas previamente en Uruguay (91-93% de identidad nucleotídica).

5.2.4 Análisis filogenético

Luego de obtenidas las secuencias y de haber determinado el genotipo viral, se procedió a realizar el árbol filogenético de la región MT (Fig. 10), la región CAP3 (Fig. 11) y la región ORF1/2 (Fig. 12). En todos los análisis filogenéticos se observó que la cepa del paciente problema se agrupa con el resto de secuencias de HEV-3, dentro de un mismo cluster. Se observó además, que para las regiones MT y CAP3, las secuencias forman un cluster dentro de HEV-3, con cepas previamente identificadas en Uruguay. No así, para el análisis filogenético de la region ORF1/2, ya que no existen para esta región y para nuestro pais secuencias previamente registradas en la base de datos.

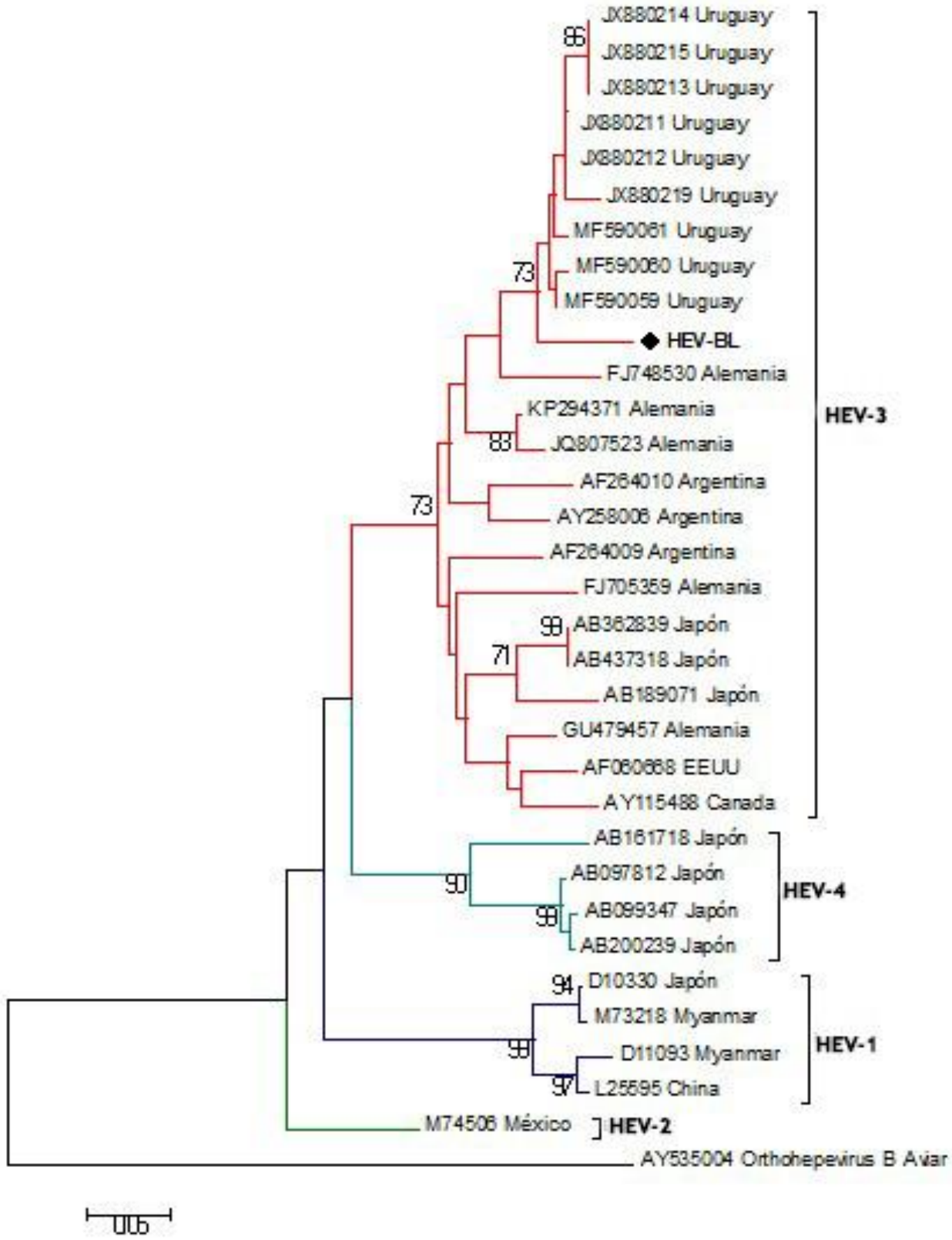

Figura 10. Análisis filogenético de la región MT. Árbol filogenético construido a partir de 287 pb correspondientes al gen de la metiltransferasa en el ORF1 del genoma de HEV. Realizado por el método de neighbor-joining, con 1000 réplicas de bootstrap y utilizando Tamura-Nei como modelo evolutivo. Se muestran solo aquellos valores de bootstrap que hayan superado un 70%. Se encuentra marcada de forma diferencial la cepa del paciente problema (HEV-BL).

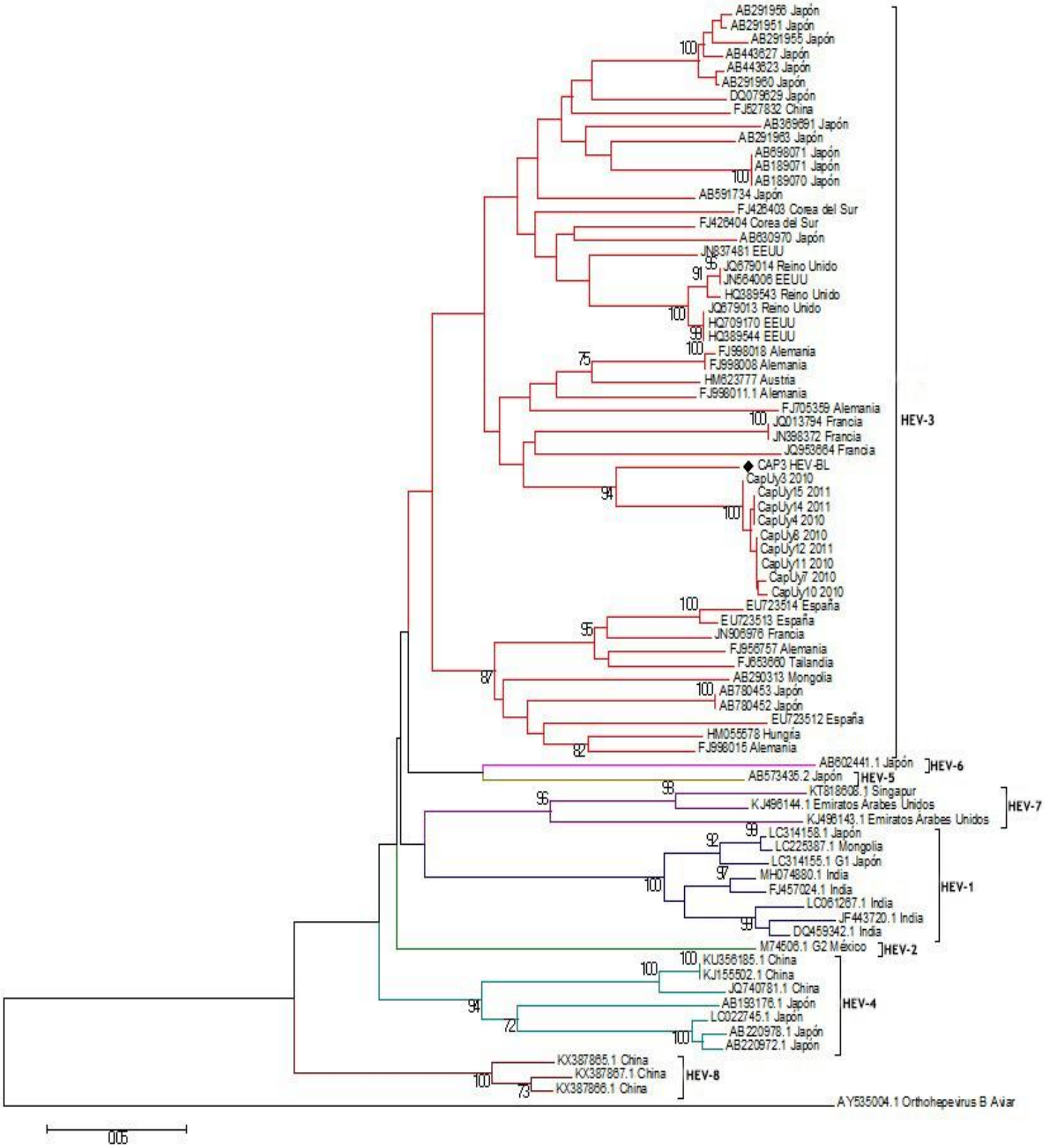

Figura 11. Análisis filogenético de la región CAP3. Árbol filogenético construido a partir de 958 pb correspondientes a una porción del gen de la cápside en el ORF2 del genoma viral. Realizado por el método de neighbor-joining, con 1000 réplicas de bootstrap y utilizando Tamura-Nei como modelo evolutivo. Se muestran solo aquellos valores de bootstrap que hayan superado un 70%, y se encuentra marcada de forma diferencial la cepa del paciente problema (CAP3 HEV-BL).

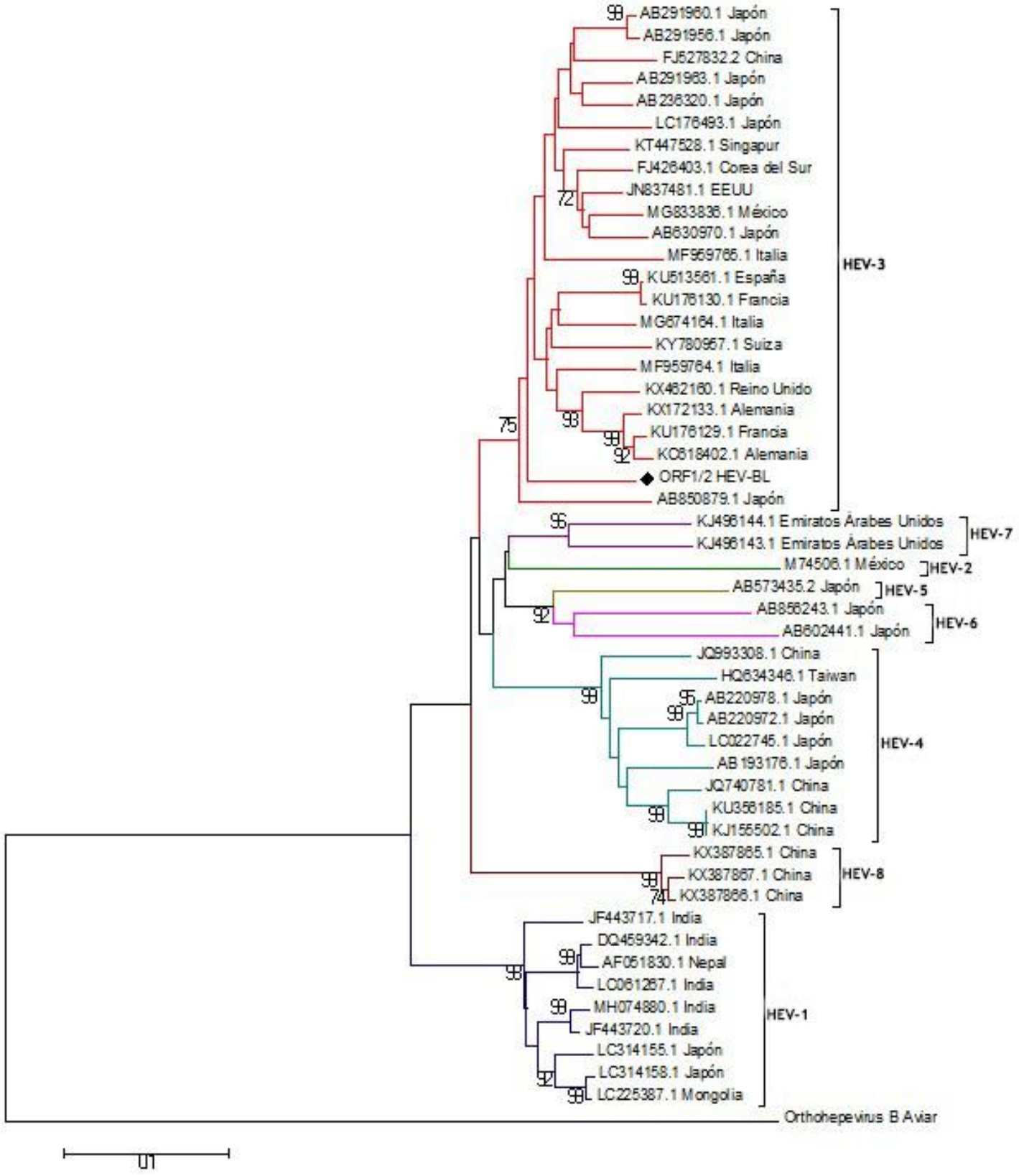

Figura 12. Análisis filogenético de la región ORF1/2. Árbol filogenético construido a partir de 662 pb correspondientes a una región ubicada entre el ORF1 y ORF2 del genoma viral. Realizado por el método de neighbor-joining, con 1000 réplicas de bootstrap y utilizando Tamura-Nei como modelo evolutivo. Se muestran solo aquellos valores de bootstrap que hayan superado un 70%, y se encuentra marcada de forma diferencial la cepa del paciente problema (ORF1/2 HEV-BL).

5.2.5 Seguimiento de la carga viral mediante real time PCR cuantitativa

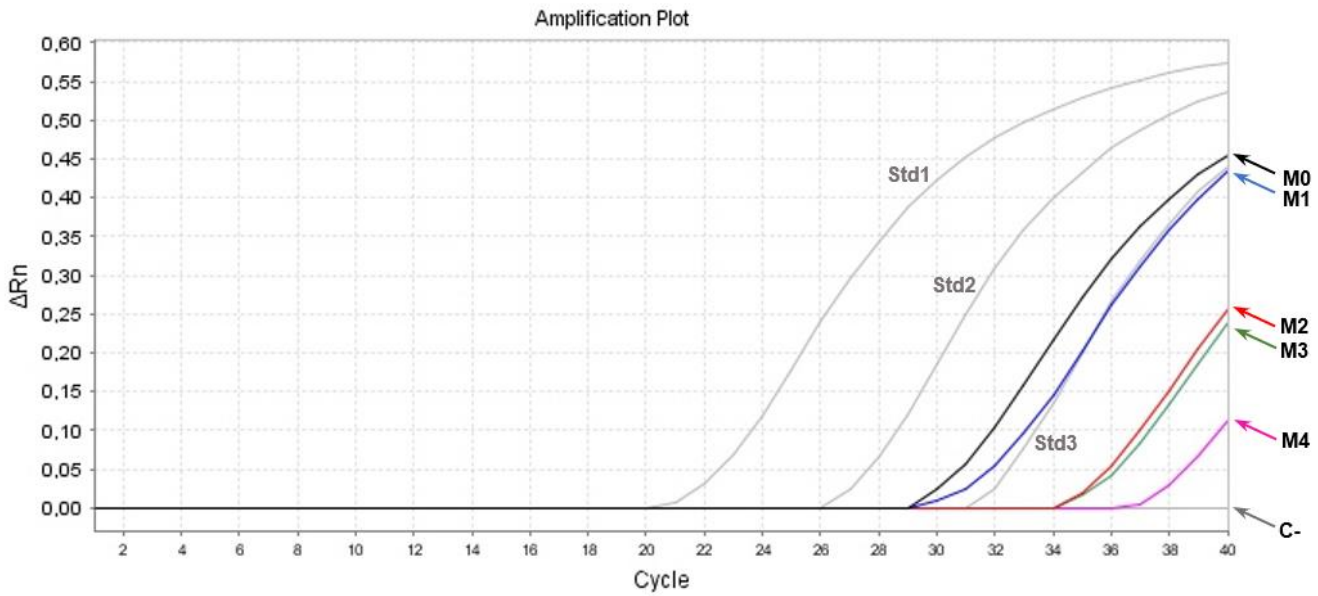

Figura 13. Cuantificación de la carga viral de HEV mediante Real Time PCR cuantitativa. Se amplifica un fragmento en la región de solapamiento entre ORF2 y ORF3 del genoma de HEV. Las muestras de suero del paciente fueron recolectadas mensualmente, comenzando por la primera (M0) previo al tratamiento con ribavirina (RBV) y siguiendo con las siguientes muestras mensuales (M1, M2, M3, M4), tomadas una vez comenzada la terapia. En gris se observan las curvas de los Standards (std1: $4x10^7$ copias/µL, std2: $4x10^6$ copias/µL, std3:$4x10^5$ copias/µL) y el control negativo (C-).

Una vez que el paciente es diagnosticado con Hepatitis E, se sospecha de una infección crónica por parte de HEV, por lo que se inicia el tratamiento con ribavirina durante aproximadamente 9 semanas. Con el fin de corroborar la eficacia de este tratamiento, se cuantificó mensualmente la carga viral del paciente en suero, mediante Real Time PCR cuantitativa (Fig. 13). Utilizando el protocolo especificado en la sección *4.2.6* de materiales y métodos.

La primera muestra de suero, fue tomada previo al inicio del tratamiento, y presentó 1,0 x 10^6 copias/µL. mientras que la muestra tomada a un mes de comenzado el tratamiento con el antiviral, presentó 8,1 x 10^5 copias/µL, siendo las únicas muestras con ARN de HEV detectables, ya que en los sueros correspondientes a los meses siguientes, se pudo observar una carga viral con valores de Ct que variaron entre 34 a 36, sin poderse cuantificar su carga viral con nuestra curva estandar (Fig. 13).

5.3 Aislamiento en A549

Con el fin de aislar en cultivo celular la cepa responsable de la Hepatitis E crónica en el paciente, se procedió a infectar la línea A549, las cuales no presentaron efecto citopático detectable a lo largo de los 8 pasajes celulares realizados.

5.3.1 Análisis del aislamiento por ICC-RT-nPCR

Para corroborar la presencia del genoma viral y la correcta infección, se realizó una RT-PCR anidada sobre el ARN extraído del cultivo celular infectado y del cultivo control sin infectar. Buscando amplificar un fragmento de 287 pb correspondiente al gen de la metiltransferasa en el genoma de HEV. Sin embargo, no se logró visualizar en el gel de electroforesis el producto de PCR detectable, tanto para el cultivo celular infectado como para su control sin infectar. Esta RT-nPCR se encuentra validada ya que el control positivo amplificó correctamente, visualizándose el fragmento de 287 pb en la electroforesis en gel. Mientras que, en el control negativo de la RT-nPCR, no se presenta producto de PCR, como era de esperar (Fig 14).

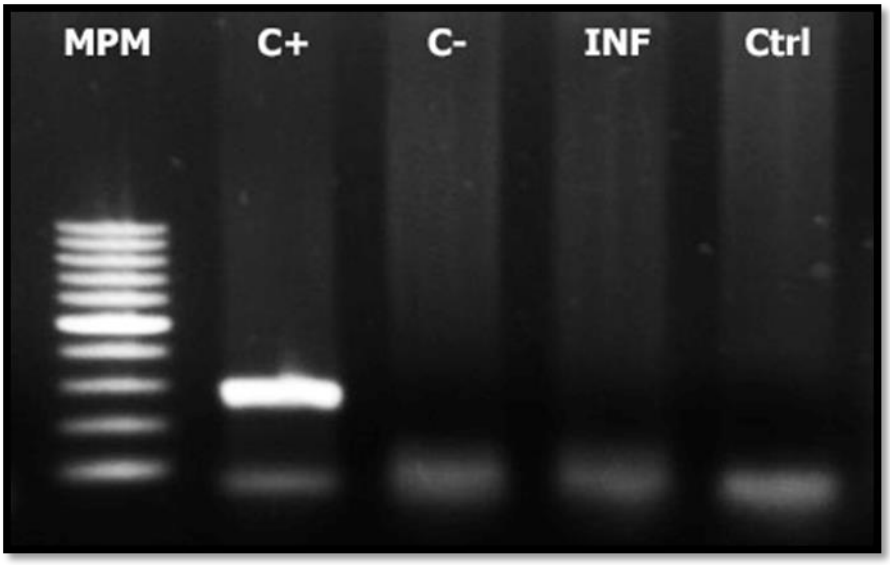

Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb (GeneRuler™, Fermentas Life Sciences, EEUU). Carril 2: Control positivo (C+) de la RT-nPCR. Carril 3: Control Negativo (C-) de la RT-nPCR. Carril 4: Producto de PCR a partir de células A549 infectadas con HEV (INF). Carril 5: Control de células A549 sin infectar (Ctrl).

6. DISCUSIÓN

La hepatitis E, es una enfermedad de creciente importancia en la salud pública, especialmente en países en desarrollo y siendo una de las mayores causas de hepatitis e ictericia en países desarrollados[6]. La enfermedad es prevalente en una amplia gama de especies animales, siendo el cerdo doméstico y el jabalí salvaje, los mayores reservorios de HEV[64]. La infección en humanos ya se encuentra registrada en muchos países de Sudamérica, incluido Uruguay, y por ello es determinante la realización de estudios profundos para analizar y entender la epidemiología del virus, la transmisión y complicaciones en el desarrollo de su enfermedad.

En el presente trabajo se actualiza la epidemiología molecular de HEV en nuestro país respecto a la tesis Doctoral de Mirazo[63] y se describe el primer caso autóctono de Hepatitis E crónica en el Uruguay, en un paciente con trasplante hepático. Donde si bien la infección por HEV fue detectada durante al menos tres meses, probablemente el virus fue la causa de la alteración hepática identificada en enero de 2016, cuando el paciente se presenta en la clínica. Sin embargo, la ausencia de muestras de ese período impide la confirmación de esta hipótesis. La cepa de HEV extraída del paciente, logró ser identificada correctamente y clasificada dentro de HEV-3. La misma se relaciona con cepas del mismo genotipo, pero de origen europeo, al igual que anteriores reportes en el pais[49, 51].

Debido a que la hepatitis E es principalmente una enfermedad autolimitada, la mayoría de los pacientes eliminan el virus espontáneamente recuperándose en unas pocas semanas. Sin embargo, los pacientes inmunocomprometidos corren el riesgo de desarrollar una infección persistente por HEV y hepatitis E crónica. Por otro lado, el diagnóstico clínico de la infección crónica es desafiante, ya que estas infecciones son en gran parte asintomáticas y pueden diagnosticarse erróneamente como daño o rechazo hepático inducido por fármacos. El caso presentado aquí constituye un ejemplo de la dificultad de identificar y diagnosticar la infección por HEV en pacientes trasplantados e inmunocomprometidos.

En pacientes inmunocomprometidos y/o trasplantados, HEV puede causar hepatitis crónica con una rápida progresión a la cirrosis, debido a que la respuesta de anticuerpos anti-HEV puede estar ausente o retrasada en estos pacientes. Por lo tanto se debería incluir a HEV en el diagnóstico diferencial en caso de una elevación inexplicable en el nivel de las enzimas hepáticas. El tratamiento en el caso de una infección crónica puede realizarse con peg-IFN y ribavirina. Teniendo en cuenta los efectos secundarios de peg-IFN y su potencial para inducir inmunidad alogénica, el tratamiento con ribavirina es la primera opción para la hepatitis E crónica en pacientes trasplantados. Sin embargo, siempre es necesario un seguimiento adecuado para evaluar el resultado a largo plazo para los pacientes inmunocomprometidos con infección crónica por HEV[65].

El paciente aquí estudiado, mostró una buena evolución luego de los 3 meses con la monoterapia de ribavirina. Logrando un *clearance* viral al mes de terapia y una respuesta virológica sostenida (SVR) durante 24 semanas luego de la misma. Concomitantemente, se alcanzó una normalización en los niveles de las enzimas hepáticas, demostrando la efectividad del tratamiento con ribavirina, cuando HEV es el agente etiológico de la hepatitis. En anteriores estudios, se describe que la suministración de ribavirina durante 3 meses a pacientes con Hepatitis E crónica, resulta una terapia efectiva[66]. Aquí, pudimos corroborar a través de la cuantificación y de la detección de ARN de HEV por *Real Time* PCR cuantitativa en el suero del paciente, que dicho periodo de tratamiento realizado en la clínica del HCFFAA fue el adecuado.

Cabe resaltar, que la amplificación de las regiones MT, CAP1, CAP2, CAP3, ORF1/2 y HVR del genoma viral en la muestra de materia fecal del paciente con hepatitis E crónica, fue exitosa. A pesar de que las regiones CAP3 y HVR, requirieron varias repeticiones del ensayo de RT-nPCR, para poder lograr un producto de PCR detectable. Esto puede ser debido a la variabilidad genética que tienen estas regiones en el genoma de HEV. En el caso de la HVR, puede variar su longitud entre las cepas y genotipos del virus, además de que muestra heterogeneidades de secuencia y puede tolerar pequeñas deleciones e inserciones[67]. Previamente, algunas inserciones en la región HVR se han asociado particularmente a

aislados de pacientes con hepatitis E crónica, los cuales provocarían un aumento en la replicación viral[67]. Por lo tanto según la bibliografia, los eventos de deleción, inserción o recombinación que ocurren en el dominio HVR pueden estar asociados con la patogénesis de la cepa de HEV y con el resultado clínico como el que aquí se presenta[68]. Sin embargo, deberían realizarse estudios funcionales sobre esta región para poder corroborar esta hipótesis.

Por otra parte, se logró visualizar correctamente una partícula viral de HEV en el resuspendido de materia fecal del paciente. La morfología es la descripta anteriormente en la bibliografía, a pesar de que la medida tomada en la imagen excede el tamaño de diámetro esperado[69]. Esto se lo podemos atribuir al proceso de fijación de la muestra previo a realizar la microscopía, el cual puede deformar las partículas virales, sumado a que a esa magnificación de imagen la medida no es exacta. Esta observación se suma a la presencia de genoma de HEV, detectado en los estudios moleculares. Sin embargo, para corroborar la identidad de dicha particula como HEV, deberiamos realizar una inmunomicroscopía electrónica de transmisión (IMET). A su vez, la infectividad viral de las partículas presentes en la materia fecal se intentó corroborar a través del aislamiento en una línea celular susceptible, ya que los ensayos moleculares y la microscopía electrónica de transmisión no permite afirmar la presencia de virus infeccioso.

Se ha visto que la línea celular A549 resulta un sistema eficiente para la replicación de HEV[70]. Es de destacar que las células A549 no son hepatocitos sino una línea celular derivada de cáncer de pulmón humano. Sin embargo, se demostró que el HEV se distribuye no solo en el hígado, sino también en el pulmón, riñón, bazo e incluso colon en cerdos infectados[71], por lo que no es sorprendente que resulte un sistema eficiente para el aislamiento de HEV. Más allá de lo anterior mencionado, no se logró detectar la presencia de ácidos nucleicos de HEV en la línea celular A549 infectada, mediante la amplificación por RT-nPCR. Por lo que no estaríamos en condiciones de afirmar que logramos aislar correctamente la cepa crónica de HEV. Sin embargo, también puede ser que el número de pasajes realizados no haya sido el suficiente como para tener una cantidad detectable del genoma viral en el cultivo celular infectado. A su

vez, es probable que el inóculo con el cual se infectó la monocapa celular haya tenido una carga viral muy baja. Esta hipótesis es poco probable ya que el mismo partió de materia fecal, la cual ha mostrado tener altos títulos virales en comparación con el suero[70].

Para verificar si la cantidad de virus en el cultivo infectado no fue el suficiente para ser detectado mediante PCR convencional, se podría realizar una *Real Time* PCR cuantitativa, cuya eficiencia para detectar cargas virales bajas es mayor. Asimismo, podría realizarse una microscopia electrónica de transmisión sobre el cultivo celular infectado, para observar la presencia de partículas virales dentro de las células. A su vez, mediante microscopia electrónica, podrían visualizarse los cambios ultraestructurales que se producen en las células infectadas en comparación con las células del control sin infectar. Entre estos se ha reportado el aumento en el número de lisosomas como indicador de la apoptosis celular y del daño a la membrana celular, producto de la replicación del virus[72].

En Uruguay se ha reportado HEV desde hace aproximadamente una década, sin embargo, jamás se había detectado una infección crónica por parte de este virus. Aquí se presenta el primer caso de hepatitis crónica causada por HEV en el país, y la profundización de su caso clínico en cuestión. Se logró detectar partículas virales en las heces del paciente mediante microscopia electrónica, como también la detección molecular del virus mediante RT-nPCR, tanto en suero como en su materia fecal. Se caracterizó satisfactoriamente la cepa viral a través de la amplificación de múltiples regiones de su genoma y el análisis filogenético de las mismas. Y a pesar de no poder corroborar el correcto aislamiento de la cepa crónica de HEV en la línea celular A549, se comenzó a optimizar el mismo con el fin de lograr replicar al virus *in vitro*.

Desde el primer caso de hepatitis E reportado en Uruguay en el año 2009[47], hasta la fecha, se ha observado que las cepas de HEV que circulan en el país son muy parecidas entre sí. Este es un dato de gran importancia, ya que no solo reafirma el carácter autóctono de los casos, sino que indica que el virus ya se ha establecido en Uruguay, por lo que no sería de extrañar la aparición de futuros casos, sugiriendo

así una creciente relevancia de esta enfermedad en la salud pública y una inminente necesidad de reforzar su control epidemiológico en nuestro país.

HEV es un patógeno emergente de creciente incidencia y preocupación en la salud pública. A pesar de ello, esta enfermedad continúa siendo subdiagnosticada en la región, lo que presenta una dificultad para esclarecer tanto la epidemiología como la patogénesis de este virus. Por ello debería tenerse en cuenta a HEV como potencial agente etiológico cuando exista una alteración de enzimas hepáticas sin explicación en pacientes con trasplante o inmunodeprimidos. Siendo inminente la inclusión de este virus en el enfoque paraclínico y diagnostico diferencial en estos casos.

7. PERSPECTIVAS

Las muestras analizadas pertenecieron a pacientes del HCFFAA con hepatitis aguda, hasta ese momento sin etiología definida. Por lo que plantamos como perspectiva a futuro, incrementar la cantidad de muestras a analizar de este centro de salud como de otros. Ya que usualmente no se toma en cuenta a la Hepatitis E como una causal en caso de presentarse síntomas, dando tiempo a que la enfermedad se autoresuelva y se subestime la incidencia de HEV en el sistema de salud. Por otra parte, planteamos la posibilidad de incluir a este virus en el *screening* de trasplantes y transfusiones, ya que actualmente el mismo no se encuentra incluido en los bancos de órganos y sangre, a pesar de que la transmisión parenteral a pacientes transfundidos y/o trasplantados, como el que aquí se presenta, resulta cada vez más común en el mundo.

Debido a que no se logró corroborar el correcto aislamiento de la cepa crónica del paciente estudiado, se planea seguir intentando el mismo en la línea celular A549 u otra que se reporte susceptible, pero con un mayor número de pasajes celulares. Para luego poder comparar este virus con la cepa de HEV aguda, viendo sus diferencias genómicas, la composición de sus cuasiespecies y cómo afecta esto en su capacidad replicativa *in vitro*. Para poder lograr entender así con más profundidad la patogénesis de la Hepatitis E crónica.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **OMS, 2017**. Hepatitis E. Centro de prensa. Nota descriptiva, julio de 2017. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/es/ Fecha de consulta: 28/3/2018.
2. **PérezGracia MT, SuayGarcía B, MateosLindemann ML.** Hepatitis E and pregnancy: Current state. Rev Med Virol. **2017**; e1929.
3. **Bazerbachi F, Haffar S, Garg SK, Lake JR.** Extra-hepatic manifestations associated with hepatitis E virus infection: a comprehensive review of the literature. Gastroenterology Report. **2016**; 4(1):1-15.
4. **Kamar N, Izopet J, Dalton HR**. Chronic Hepatitis E Virus Infection and Treatment. Journal of Clinical and Experimental Hepatology. **2013**; 3(2):134-140.
5. **Nan Y, Zhang Y-J**. Molecular Biology and Infection of Hepatitis E Virus. Frontiers in Microbiology. **2016**; 7:1419.
6. **Capai L, Charrel R, Falchi A**. Hepatitis E in High-Income Countries: What Do We Know? And What Are the Knowledge Gaps? Viruses. **2018;** 10(6):285.
7. **Purdy MA, Khudyakov YE.** Evolutionary history and population dynamics of hepatitis E virus. PLoS One. **2010**; 5:e14376.
8. **Aggarwal R.** Hepatitis E: Epidemiology and Natural History. Journal of Clinical and Experimental Hepatology. **2013**; 3(2):125-133.
9. **Khuroo MS.** Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. Am J Med. **1980**; 68:818–824.
10. **Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS**. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology. **1983**; 20:23–31.
11. **Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson S.U, Harrison TJ, Meng X-J, Okamoto H, Van der Poel WHM, Purdy MA.** Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. J Gen Virol. **2014**; 95, 2223–2232.

12. **Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N.** Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. Viruses. **2016**; 8(10):270.
13. **Smith DB, Ijaz S, Tedder R, Hogema B, Zaaijer H, Izopet J, Bradley-Stewart A, Gunson R, Harvala H, Kokki I, Simmonds P.** Variability and pathogenicity of Hepatitis E virus genotype 3 variants. J Gen Virol. **2015**; 96:3255-3264.
14. **Lee G-H, Tan B-H, Teo EC-Y, Lim S-G, Dan Y-Y, Wee A, Aw PPK, Zhu Y, Hibberd ML, Tan C-K, Purdy MA, Teo C-G.** Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Livertransplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk, Gastroenterology. **2015**; 150(2): 355-357e3.
15. **Sridhar S, Teng JLL, Chiu T-H, Lau SKP, Woo PCY**. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. Haybaeck J, ed. International Journal of Molecular Sciences. **2017**; 18(4): 869.
16. **Von Wulffen M, Westhölter D, Lütgehetmann M, Pischke S.** Hepatitis E: Still Waters Run Deep. Journal of Clinical and Translational Hepatology. **2018**; 6(1):40-47.
17. **Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, Dalton HR.** Hepatitis E virus infection. Nat. Rev. Dis. Primers. **2017**; 3:17086.
18. **Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS**. Transmission of Hepatitis E Virus in Developing Countries. Izopet J, ed. Viruses. **2016**; 8(9):253.
19. **Dalton HR & Izopet J.** Transmission and Epidemiology of Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infections. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, **2018**.
20. **Riveiro-Barciela M, Mínguez B, Gironés R, Rodríguez-Frías F, Quer J, Buti M.** Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. J Clin Gastroenterol. **2015**; 49 : 165-168.
21. **Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M.** Origin and dispersal of Hepatitis E virus. Emerging Microbes & Infections. **2018**; 7:11.

22. **Emerson SU, Purcell RH.** Hepatitis E Virus. Reviews in Medical Virology. **2003**; 13:145–154.

23. **Cao D, Meng X-J**. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. Emerging Microbes & Infections. **2012**; 1(8): e17-.

24. **Parvez MK.** The hepatitis E virus nonstructural polyprotein. Fut. Microbiol. **2017;** 12(10): 915–924.

25. **Panda SK, Varma SPK.** Hepatitis E: Molecular Virology and Pathogenesis. Journal of Clinical and Experimental Hepatology. **2013**; 3(2):114-124.

26. **Lei Q, Li L, Zhang S, Li T, Zhang X, Ding X, & Qin B.** HEV ORF3 downregulates TLR7 to inhibit the generation of type I interferon via impairment of multiple signaling pathways. Scientific Reports. **2018**; 8:8585.

27. **Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, Shalimar, Nayak B, Ranjith Kumar CT, Surjit M.** Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. Meng X-J, ed. PLoS Pathogens. **2016**; 12(4):e1005521.

28. **Yugo DM, Meng X-J.** Hepatitis E Virus: Foodborne, Waterborne and Zoonotic Transmission. International Journal of Environmental Research and Public Health. **2013**; 10(10): 4507-4533.

29. **Brassard J, Gagné M-J, Généreux M, Côté C.** Detection of Human Food-Borne and Zoonotic Viruses on Irrigated, Field-Grown Strawberries. Applied and Environmental Microbiology. **2012**; 78(10):3763-3766.

30. **Gao S, Li D, Zha E, Zhou T, Wang S, Yue X.** Surveillance of Hepatitis E Virus Contamination in Shellfish in China. Dorevitch S, ed. International Journal of Environmental Research and Public Health. **2015**; 12(2): 2026-2036.

31. **Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma J and Murthy N.** Hepatitis E in pregnancy. International Journal of Gynecology & Obstetrics, **2004**; 85: 240-244.

32. **Prasad GS, Prasad S, Bhupali A, Patil AN, Parashar K.** A Study of Hepatitis E in Pregnancy: Maternal and Fetal Outcome. Journal of Obstetrics and Gynaecology of India. **2016**; 66 (Suppl1): 18-23.

33. I**zopet J, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Kamar N**, **Abravanel F**. HEV and transfusion-recipient risk. Transfus Clin Biol. **2017**; 24(3): 176-181.

34. **Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A.** Hepatitis E virus: advances and challenges. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. **2018**; 15(2): 96-110.

35. **Guerra JA de AA, Kampa KC, Morsoletto DGB, Junior AP, Ivantes CAP**. Hepatitis E: A Literature Review. Journal of Clinical and Translational Hepatology. **2017**; 5(4):376-383.

36. **Hartl J, Wehmeyer MH, Pischke S.** Acute Hepatitis E: Two Sides of the Same Coin. Izopet J, ed. Viruses. **2016**; 8(11):299.

37. **Chaudhry SA, Verma N, Koren G.** Hepatitis E infection during pregnancy. Canadian Family Physician. **2015**; 61(7):607-608.

38. **Krain LJ, Atwell JE, Nelson KE, Labrique AB.** Fetal and Neonatal Health Consequences of Vertically Transmitted Hepatitis E Virus Infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **2014**; 90(2):365-370.

39. **Fujiwara, S., Yokokawa, Y., Morino, K., Hayasaka, K., Kawabata, M., & Shimizu, T.** Chronic hepatitis E: a review of the literature. Journal of Viral Hepatitis. **2013**; 21(2), 78–89.

40. **Geng Y, Zhang H, Huang, W, J Harrison T, Geng K, Li Z, & Wang Y.** Persistent Hepatitis E Virus Genotype 4 Infection in a Child With Acute Lymphoblastic Leukemia. Hepatitis Monthly. **2014**; 14(1): e15618.

41. **Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs, BC, & Van der Eijk, AA.** Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? Journal of Hepatology. **2017**; 66(5), 1082–1095.

42. **Xin S, Xiao L.** Clinical manifestations of hepatitis E. Adv Exp Med Biol. **2016**; 948:175–189.

43. **Zhao C, Wang Y.** Laboratory diagnosis of HEV infection. Advances in Experimental Medicine and Biology. **2016**; 948:191–209.

44. **Krzowska-Firych JM, Lucas Ch, Lucas G, Tomasiewicz K.** Hepatitis E – A new era in understanding. Ann Agric Env Med. **2018**; 25(2): 250–254.

45. **Hui W, Wei L, Li Z, Guo X.** Treatment of hepatitis E. Adv Exp Med Biol. **2016**; 948:211–221.

46. **Fierro NA, Realpe M, Meraz-Medina T, Roman S, Panduro A**. Hepatitis E virus: An ancient hidden enemy in Latin America. World Journal of Gastroenterology. **2016**; 22(7): 2271-2283.

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

48. **Mirazo S, Ramos N, Russi JC, Arbiza J.** Genetic heterogeneity and subtyping of human hepatitis E virus isolates from Uruguay. Virus Res. **2013**; 173, 364–370.

49. **Mirazo S, Gardinali NR, Cecilia D, Verger L, Ottonelli F, Ramos N, Castro G, Pinto MA, Ré V, Pisano B, Lozano A, de Oliveira JM, Arbiza J.** Serological and virological survey of hepatitis E virus (HEV) in animal reservoirs from Uruguay reveals elevated prevalences and a very close phylogenetic relationship between swine and human strains. Vet Microbiol. **2018**; 213: 21-27.

50. **Mirazo S, Mainardi V, Ramos N, Gerona S, Rocca A, Arbiza J.** Indigenous hepatitis E virus genotype 1 infection, Uruguay. Emerg. Infect Dis. **2014**; 20 (1), 171–173.

51. **Mirazo S, Mir D, Bello G, Ramos N, Musto H, Arbiza J.** New insights into the hepatitis E virus genotype 3 phylodynamics and evolutionary history. Infect. Genet. Evol. **2016**; 43, 267–273.

52. **Amo AN, Aprea AN, Petruccelli MA.** Detection of viral particles in feces of young dogs and their relationship with clinical signs. Rev. Microbiol. **1999**; 30 (3):237-241.

53. **Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J.** Hepatitis E Pathogenesis. Viruses. **2016**;8(8): 212.

54. **Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, Tsuda F, Okamoto H.** Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. J Virol Methods. **2006**; 137(2): 325–333.

55. **Cancela F, 2018.** Aproximación al estudio de la replicación in vitro del Virus de la Hepatitis E (HEV) a través de análisis proteómicos y transcriptómicos. Universidad de la Republica (UdelaR). Facultad de Ciencias.

56. **Hall TA.** BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. **1999**; 41: 95-98.

57. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. **2013**; 30(12): 2725-9.

58. **Wang Y, Ling R, Erker JC, Zhang H, Li H, Desai S, Mushahwar IK, Harrison TJ.** A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. J Gen Virol. **1999**. 80(1): 169-77.

59. **Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU.** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA. **1997**; 94(18): 9860-5.

60. **Takahashi M, Nishizawa T, Yoshikawa A, Sato S, Isoda N, Ido K, Sugano K, Okamoto H.** Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. J. Gen. Virol. **2002**; 83(1): 1931–1940.

61. **Maila HT, Bowyer SM, Swanepoel R.** Identification of a New Strain of Hepatitis E Virus from an Outbreak in Namibia in 1995. J Gen Virol. **2004**; 85(1):89-95.

62. **Kabrane-Lazizi Y, Zhang M, Purcell RH, Miller KD, Davey RT, Emerson SU.** Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. J Gen Virol. **2001**; 82(7): 1687-93.

63. **Mirazo S, 2014.** Caracterización molecular y variabilidad genética del virus de la hepatitis E. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

64. **Syed SF, Zhao Q, Umar M, Alagawany M, Ujjan IA, Soomro F, Bangulzai N, Baloch AH, Abd El-Hack M, Zhou E-M, Arain MA**. Past, present and future of hepatitis E virus infection: Zoonotic perspectives. Microbial Pathogenesis. **2018**; 119: 103–108.

65. **De Niet A, Zaaijer HL, ten Berge I, Weegink CJ, Reesink HW, Beuers U.** Chronic Hepatitis E after solid organ transplantation. Neth J Med. **2012**; 70: 261–266.

66. **Kamar N, Mallet V, Izopet J.** Ribavirin for chronic Hepatitis E virus infection. N Engl J Med. **2014**; 370: 2447–2448.

67. **van Tong H, Hoan NX, Wang B, Wedemeyer H, Bock CT, Velavan TP.** Hepatitis E Virus Mutations: Functional and Clinical Relevance. EBioMedicine. **2016**; 11: 31-42.

68. **Debing Y, Ramiere C, Dallmeier K, Piorkowski G, Trabaud MA, Lebosse F.** Hepatitis E virus mutations associated with ribavirin treatment failure result in altered viral fitness and ribavirin sensitivity. Journal of Hepatology. **2016**; 65: 499–508.

69. **Arbeitskreis Blut, Untergruppe «Bewertung Blutassoziierter Krankheitserreger».** Hepatitis E Virus. Transfus Med Hemother. **2009**; 36(1): 40-47.

70. **Okamoto H.** Culture systems for hepatitis E virus. J Gastroenterol. 2012; 48(2): 147-58.

71. **Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, Meng, XJ.** Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. J Clin Microbiol. **2001**; 39(9): 3040-6.

72. **Shen Q, Pu Y, Fu X, Xie Y, Bian X, Yang S, Yang Y, Cui L, Wang X, Wang H, Zhang W.** Changes in the cellular proteins of A549 infected with hepatitis E virus by proteomics analysis. BMC Vet Res. **2014**; 10:188.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mi tutor **Dr. Santiago Mirazo**, por abrirme las puertas del laboratorio, brindarme su sabiduría, darme su paciencia y guiarme en la realización de esta tesis.

Agradecer al **Dr. Juan Arbiza**, por permitirme realizar la pasantía de fin de carrera en la Sección Virología de Facultad de Ciencias (UdelaR).

Agradezco a los miembros del tribunal **Fernando Lopez** y **Matías Victoria Montero,** por sus correcciones y sugerencias, las cuales me fueron de gran aprendizaje.

Agradezco a los integrantes del **Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión,** y en especial a Marcie, por la ayuda, tiempo y conocimientos brindados en los experimentos allí realizados.

Agradezco a mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Virología: **Flor.C, Flor.O, Lu, Cata, David, Felipe, Gastón, Nati.D, Irene, Ana y Marcie.** Por la ayuda otorgada en el laboratorio, y el hermoso grupo humano y de trabajo que formamos.

Quiero agradecer también a los demás integrantes de la Sección Virología: **Nati Ramos, Sandra, Adriana, Mabel, Jimena y Anita.** Por integrarme al laboratorio y estar siempre ahí para darme sus consejos y su ayuda en la mesada.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros de generación de **La Royal Sociality**, por los momentos vividos en el transcurso de la carrera y sus consejos brindados en el correr de esta tesis.

Agradezco a mis amigos de la vida de **La Brigada**, por el apoyo anímico brindado y por los consejos otorgados, que me han servido para seguir adelante.

Por último, pero más importante, agradecerle a mi **familia**, por darme la oportunidad de formarme en lo que me gusta y ser el sustento durante toda la carrera.

Mamá y Papá: Agradecerles especialmente a ustedes por apoyarme siempre en estudiar lo que me gusta, sin ustedes no habria llegado hasta acá. No hay palabras para decirles lo mucho que los quiero.