



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS



SECCIÓN
VIROLOGÍA
FCIEN | UDELAR

Tesina de Grado.
Licenciatura en Bioquímica.

TORQUE TENO VIRUS HUMANO EN URUGUAY: DETECCIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA.

Florencia Cancela D'Angelo

Orientador: Dr. Juan Arbiza
Co-orientadora: Lic. Natalia Ramos

Sección Virología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo

Marzo, 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá, mi Papá y mi Abuela, desde lo más profundo de mi ser, no existen palabras suficientes con las que pueda expresar el valioso pilar que representan en mi vida, el invaluable amor y comprensión que me han sabido demostrar a lo largo de los años, con sus consejos y sus infaltables palabras de aliento cuando más lo necesitaba. Es precisamente por estas razones que nada de esto hubiera sido posible sin ustedes a mi lado. A mi abuelo, que aunque no estuvo físicamente en mis logros, crecí de su mano con su cariño y valores, por lo que siempre ocupará un lugar especial en mi corazón.

A Juan, por haberme brindado la oportunidad de realizar mi pasantía y formación en la Sección Virología bajo su orientación.

A Natalia, de forma especial y sincera porque su infinito apoyo, enseñanzas, confianza y dedicación han sido un aporte incommensurable no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora.

A todos los integrantes del laboratorio. A Mabel, Sandra, Ana, Adriana, Santiago, Cecilia, Darío, Lucía, Virginia, Andrés, Patricia, Vanessa y Luciana, por compartir juntos el día a día y hacerme sentir parte de un equipo humano y cariñoso.

A mis amigos y compañeros por las lindas experiencias compartidas.

"This virus fascinated me due to its ubiquitous nature and its remarkable heterogeneity."

Harald zur Hausen, Premio Nobel de Medicina.

"I am fully convinced that viruses that cause so pervasive, persistent and highly productive infections as the Anelloviruses should not be too easily dismissed as a potential cause of damage to human health."

David Thorley-Lawson, PhD.

Entrevista-The Scientist Magazine-

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Virosis Emergentes	7
1.2 Descubriendo un "nuevo virus"	7
1.3 Características de TTVH.....	8
1.3.1 Morfología	8
1.3.2 Genoma	9
1.3.3 Marcos abiertos de lectura	11
1.3.4 Proteínas.....	13
1.3.5 Replicación Viral	14
1.3.6 Variabilidad Genética	15
1.4 Taxonomía de TTVH: la necesidad de una nueva familia viral.....	16
1.4.1 Torque Teno Mini Virus.....	17
1.4.2 Torque Teno Midi Virus.....	17
1.4.3 Torque Teno Virus de animales.....	18
1.5 TTVH: En busca de una enfermedad	19
1.5.1 Tropismo Celular	19
1.5.2 Transmisión de TTVH	19
1.5.3 Epidemiología viral.....	20
1.5.3.1 Distribución mundial y prevalencia de TTVH	20
1.5.3.2 Patologías asociadas a la infección por TTVH	21
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 General.....	24
3.2 Específicos	24

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Muestras.....	25
4.2 Extracción de ADN genómico.....	28
4.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	28
4.3.1 Detección de ADN viral.....	28
4.3.2 Caracterización molecular de las cepas.....	30
4.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	31
4.5 Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN viral.....	32
4.6 Análisis filogenético.....	32
4.7 Clonación.....	32
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Optimización de técnica y detección de TTVH por primera vez en Uruguay.....	35
5.2 Frecuencia de infección y co-infección.....	37
5.3 Optimización de técnica y caracterización de las cepas.....	39
5.3.1 Análisis de secuencias.....	41
5.3.1.1 Presencia de co-infección con cepas de TTVH.....	41
5.3.1.2 Estudio filogenético de TTVH.....	41
5.4 Obtención de stock de control positivo.....	44
6. DISCUSIÓN.....	45
7. CONCLUSIONES.....	50
8. PERSPECTIVAS.....	51
9. REFERENCIAS.....	52
ANEXOS.....	66
ANEXO I: Cromatogramas obtenidos para la detección de TTVH.....	66
ANEXO II: Cromatogramas que presentan co-infección con cepas de TTVH.....	67
ANEXO III: Cromatogramas obtenidos para la caracterización de las cepas.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNss	ADN simple hebra
ALT	Alanina AminoTransferasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAV	Virus de la Anemia de Pollo
COS-1	Células de riñón de mono
CsCl	Cloruro de cesio
GFP	Green Fluorescent Protein
GTR+G	General Time Reversible más Gamma
HBV	Hepatitis B
HCV	Hepatitis C
HEK 293	Células embriónicas de riñón humano
HIV-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HPV	Papillomavirus Humano
HVR	Región hipervariable
Huh7	Células de hepatocarcinoma humano
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía Viral
IMM	Miopatías inflamatorias idiopáticas
LES	Lupus eritematoso sistémico
miRNA	micro Ácido ribonucleico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbor Joining
nm	Nanómetros
nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periféricas.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV	Circovirus Porcino
RDA	Análisis diferencial representacional
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SEIC	Servicio de Enfermedades Infecto Contagiosas
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
SISPA	Amplificación secuencia independiente
TTMDV	Torque Teno Midi Virus
TTMV	Torque Teno Mini Virus
TTsuV	Torque Teno Virus Porcino
TTVH	Torque Teno Virus Humano
UTR A	Región no traducida 3' al tracto GC
UTR B	Región no traducida 5' al tracto GC
VLPs	Virus-like particles

RESUMEN

El Torque Teno Virus Humano (TTVH) perteneciente a la familia Anelloviridae, es el primer virus ADN monohebra circular descubierto que infecta humanos, identificado por primera vez en 1997 en un paciente Japonés con Hepatitis post-transfusional de etiología desconocida. Es un virus pequeño de aproximadamente 30 nm, no envuelto con simetría icosaédrica, que posee un genoma de polaridad negativa de 3.7-3.8 Kb de longitud. A pesar de ser un virus ADN, presenta una muy elevada variabilidad genética. Asimismo, se ha demostrado que ocurre frecuentemente infección persistente a largo plazo y co-infección con distintos genotipos o genogrupos en un mismo individuo, identificándose hasta el momento más de 38 genotipos que se clasifican en cinco genogrupos virales distintos.

Si bien no se conoce con exactitud su potencial patogénico, existe una población de riesgo conformada por pacientes con cuadro clínico de Hepatitis y/o infectados con HIV-1, en la cual TTVH ha sido detectado con mayor frecuencia y mayor carga viral a nivel mundial.

Los TTVs no se encuentran solamente restringidos a humanos, sino que hay evidencia que demuestra una gran distribución en animales, pertenecientes a otros géneros dentro de la familia Anelloviridae.

Aunque la posibilidad de transmisión zoonótica se desconoce hasta el momento, se ha detectado Torque Teno Virus Porcino en los últimos años en la Sección Virología, en cerdos de diferentes criaderos del país. Justamente, estos resultados llevaron a plantear la necesidad de investigar la presencia de Anellovirus en humanos ya que se desconoce su circulación en Uruguay.

En el presente trabajo, se determinó la frecuencia de infección de TTVH por primera vez en el país en una población de riesgo conformada por 85 sueros de pacientes previamente diagnosticados para HBV, HCV y/o HIV-1, así como para pacientes con Hepatitis de etiología desconocida. Para cumplir con este propósito, fue implementada y optimizada una Nested-PCR de detección, mediante la amplificación de un fragmento de 110 pb de la región conservada UTR A. Se obtuvo una frecuencia de infección total para TTVH del 79% (67/85), a partir del cual, se desprenden los datos detallados de co-infección de TTVH con los otros virus presentes, siendo del 24% para los infectados con Hepatitis no A-G, 24% para HCV, 17% para HIV-1/HBV, 14% para HCV/HIV-1, 13% para HBV, 4% para HIV-1, 2% para HCV/HBV y 2% para HBV/HCV/HIV-1.

En segundo lugar, con motivos de caracterizar genéticamente las cepas circulantes detectadas, se realizó una Seminested-PCR que produce un amplicón de 377 pb de la UTR B, una región con mayor variabilidad, obteniéndose un 63% (42/67) de amplificación. Sin embargo, 22 de estos fragmentos no pudieron ser analizados, ya que presentaron co-infección con varias cepas de TTVH, coincidiendo con lo reportado en la literatura.

A partir de las secuencias obtenidas, se construyó un árbol filogenético y se observó que tres muestras uruguayas agrupan en el grupo dos, mientras que las demás cepas nacionales forman dos clusters no pertenecientes a ninguno de los cinco genogrupos conocidos, posiblemente, esto indica la existencia de nuevos grupos filogenéticos, que solamente podrán ser confirmados por medio de análisis de genomas completos.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de matriz de identidad para las 20 cepas de 377 pb, demostrando poseer un amplio rango de homología desde 27,0% a 99,3%.

Finalmente, se clonó un fragmento de 377 pb para contar con un stock de control positivo en el país.

Ciertamente, estos altos valores de prevalencia hallados en población no sana, especialmente para los casos de Hepatitis no A-G, junto con el hecho de ser una virosis emergente, revisten especial importancia para el país desde el punto de vista epidemiológico.

Eventualmente, puede ser importante su diagnóstico a nivel clínico, ya que existe la posibilidad de que TTVH emerja como un patógeno para la población humana en un futuro no muy lejano.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virosis emergentes.

El término virus emergente se aplica a nuevos virus descubiertos, a agentes causantes de nuevas enfermedades en una población, o a virus que son la causa de patologías que han incrementado notablemente en incidencia o tienen potencial para hacerlo. Asimismo, las infecciones emergentes pueden surgir como manifestaciones de expansión de rango de huésped con un consecuente aumento en el número de individuos afectados (Flint., 2004).

Existen diversas explicaciones sobre el surgimiento de estos virus: a partir de mutaciones genómicas en virus ya existentes desarrollando por lo tanto adaptación, por exposición de población no inmunizada al virus o cambios en las condiciones biológicas del huésped. Además, las actividades humanas ofrecen posibilidades adicionales para su expansión, como por ejemplo, alta densidad poblacional, desplazamiento constante, falta de medidas sanitarias, contaminación acuática, reutilización de jeringas y patrones sexuales (Flint., 2004).

Precisamente, este es probablemente el caso de los Anellovirus, donde han sido recientemente detectados, tras una larga trayectoria de haber co-existido y co-evolucionado con nosotros por miles de años (Thom et al., 2003).

Conjuntamente, el impacto producido por virus emergentes puede ser muy importante desde el punto de vista clínico, ya que la trayectoria de la evolución es impredecible (como se ha observado en casos a lo largo de la historia) demostrando que no hay razón para creer que una vez que la relación estable hospedador-virus se encuentra establecida, esta sea permanente.

1.2. Descubriendo un "nuevo virus".

Alrededor de los años 90, aún existía una leve posibilidad de infección con Hepatitis en procedimientos transfusionales posteriores a intervenciones quirúrgicas.

En la actualidad, se puede encontrar un gran número de pacientes con cuadro clínico de Hepatitis pero sin marcadores específicos para la misma. Por lo cual, muchos casos de Hepatitis aguda, crónica y fulminante se las clasificó como no A-G, ya que no se atribuyen a ninguna de las Hepatitis A, B, C, D, E, F o G reportadas, responsabilizando así a otros agentes virales posiblemente capaces de inducir Hepatitis (Nishizawa et al., 1997).

Justamente, Nishizawa et al. (1997) reportaron la presencia de una posible cepa viral desconocida en muestras de suero, extraídas a un paciente japonés de 58 años con Hepatitis post-transfusional de etiología desconocida.

A través de un análisis diferencial representacional (RDA), propuesto por Lisitsyn et al. (1993), se obtuvo un clon viral llamado N22 de aproximadamente 500 pares de bases (pb), el cual no demostró ninguna coincidencia con las secuencias depositadas en las bases de datos. Subsiguientemente, se descubrió que este clon provenía de un virus ADN.

Esta nueva cepa viral fue detectada durante un nivel elevado de la enzima Alanina Aminotransferasa (ALT) en el suero del individuo, siendo la misma un indicador de daño hepático (Nishizawa et al., 1997).

En un principio, se decidió nombrar TT al virus debido a las iniciales del paciente (Nishizawa et al., 1997), siendo coincidentemente asociado a “virus transfusión-transmitido” (Zuckermann et al., 1999). Posteriormente, se lo decidió nombrar Torque Teno Virus, proveniente del latín, donde “torque” significa collar y “tenuis” fino (Biagini et al., 2004) debido a sus características genómicas.

1.3. Características de TTVH.

1.3.1. Morfología.

Por medio de un ensayo de filtrabilidad, se reportó que la partícula viral posee entre 30-32 nanómetros (nm) de diámetro (Itoh et al., 2000) y una cápside icosaédrica T= 1 (número de triangulación) (Mueller et al., 2008). En segundo lugar, se observó una densidad de flotación de entre 1,31 y 1,34 g/ml en gradiente de densidad de Cloruro de Cesio (CsCl) (Mushahwar et al., 1999). Debido a que la densidad en gradiente de sacarosa de TTVH sometido a detergentes no se vio afectada, se concluyó que se trataba de un virus desnudo (Okamoto et al., 1998 b).

A modo de profundizar sus características estructurales, destacablemente solamente en tres estudios se identificaron exitosamente partículas virales de TTVH: primeramente, fue el realizado por Itoh et al. (2000) donde descubrieron en suero de pacientes infectados con HIV, la existencia de virus-like particles (VLPs) de TTVH circulando como inmunocomplejos unidos a IgG, detectándose por microscopía electrónica (Figura 1 y 2), mientras que, en materia fecal recuperada de estos mismos individuos, TTVH circula como partículas libres (Itoh et al., 2000).

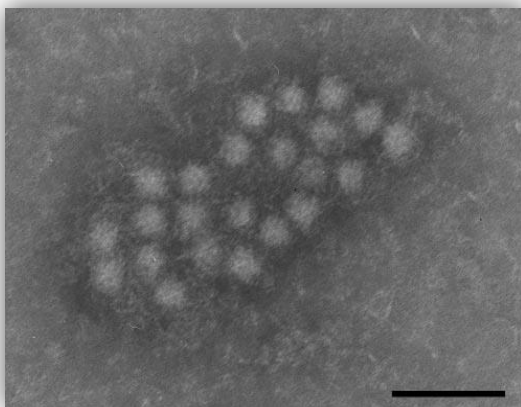


Figura 1. Micrografía electrónica de agregados de partículas de TTVH en muestra de suero HIV positivo. La escala representa 100 nm (Itoh et al., 2000).

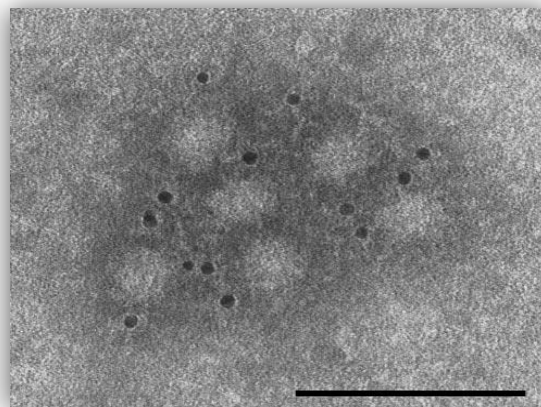


Figura 2. Microscopía electrónica inmunogold de partículas de TTVH asociadas en muestra de suero infectado con HIV. Los puntos negros constituyen inmunoglobulinas IgG conjugadas con oro coloidal. Escala: 100 nm (Itoh et al., 2000).

En segundo lugar, otro grupo de investigadores identificaron partículas virales de TTVH en líneas celulares derivadas de linfoma y leucemia (zur Hausen et al., 2005). Además, en un tercer estudio se observó la producción de partículas virales de TTVH en una línea celular derivada de linfoma de Hodking, luego de ser transfectadas con un clon infectivo del virus (Leppik et al., 2007).

A pesar de estos trascendentes resultados reportados, no existe hasta el momento un sistema eficiente de aislamiento viral para TTVH (Bendinelli et al., 2001).

1.3.2. Genoma.

El Torque Teno Virus posee un genoma ADN simple hebra, circular, de polaridad negativa con una longitud de entre 3,7-3,8 Kb (Erker et al., 1999; Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999; Hijikata et al., 1999b; Hallett et al., 2000; Heller et al., 2001; Peng et al., 2002), el cual consiste en una región codificante de 2,6 Kb y una región no codificante o no traducida (UTR) de 1,2 Kb, conteniendo esta última una zona rica en GC, un promotor y un potenciador transcripcional (Kamada et al., 2004; Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999; Suzuki et al., 2004). Adicionalmente, la región UTR se divide en dos zonas: una localizada en posición 3' a la zona rica en GC (UTR A) y otra en posición 5' con respecto al tracto GC (UTR B) (Okamoto et al., 1999b). La región codificante está definida por un TATA-box upstream y una secuencia poli-(A) downstream, en donde también se localizan marcos de lectura abiertos solapados (ORFs) (Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999; Miyata et al., 1999) (Figura 3). Si bien existe una gran variabilidad genética entre las cepas, las posiciones de los ORFs entre distintos TTVH son conservadas (Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999b; Heller et al., 2001).

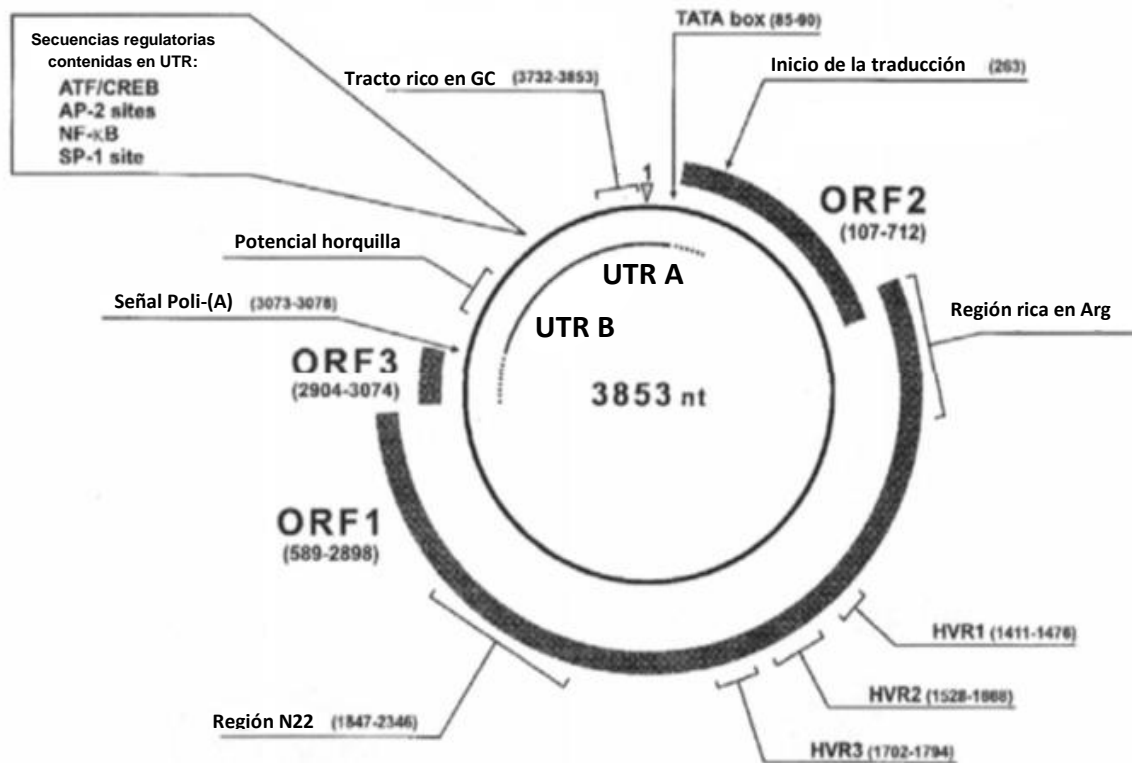


Figura 3. Organización genómica de TTVH, mostrando su ADNss circular de polaridad negativa. Las posiciones nucleotídicas están basadas en la cepa TA278.

Las barras negras representan los ORF 1, ORF 2 y ORF 3. Se observa además la UTR A y B con sus secuencias reguladoras, las potenciales horquillas contenidas en la UTR son conservadas entre las cepas. La región rica en GC contiene también varias estructuras en forma de horquilla, las cuales sin embargo varían considerablemente su forma entre las cepas de TTVH. Adicionalmente, se indican HVR1, HVR2 y HVR3 correspondientes a zonas hipervariables en la ORF 1. (Tomado y adaptado de Bendinelli et al., 2001).

1.3.3. Marcos abiertos de lectura (ORFs).

Inicialmente, cuando fueron analizados genomas completos de TTVH, se consideraron solamente dos ORFs, a pesar de desconocer su capacidad de ser transcritos (Okamoto et al., 1998b; Erker et al., 1999; Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999). No obstante, Kamahora et al. (2000) fueron los primeros en descubrir la producción de seis ARNm de tres tamaños distintos, 3.0, 1.2, 1.0 Kb, tras transfectar un clon infectivo de TTVH en células de riñón de mono (COS-1), encontrándose entre los transcritos, productos de rearrreglos intragenómicos y de splicing alternativo (Leppik et al., 2007), como ilustra la Figura 4. La nomenclatura de estos marcos es variable según las publicaciones.

Existen dos transcritos correspondiente a 3.0 Kb de longitud, dónde encontramos a ORF 1 y a ORF 2 en toda su extensión (Kamahora et al., 2000).

Los dos mensajeros de 1.2 Kb son, por un lado, un splicing dentro del marco 1, llamado ORF 1/1 y por otro lado, un producto de splicing dentro del marco 2, ORF 2/2, comúnmente conocido como ORF 3 (Kamahora et al., 2000).

Los dos últimos transcritos de 1.0 Kb abarcan, un producto de splicing entre ORF 2 y ORF 3, llamado ORF 2/3 y otro mensajero resultado del splicing entre ORF 1 y ORF 2, ORF 1/2 (Kamahora et al., 2000).

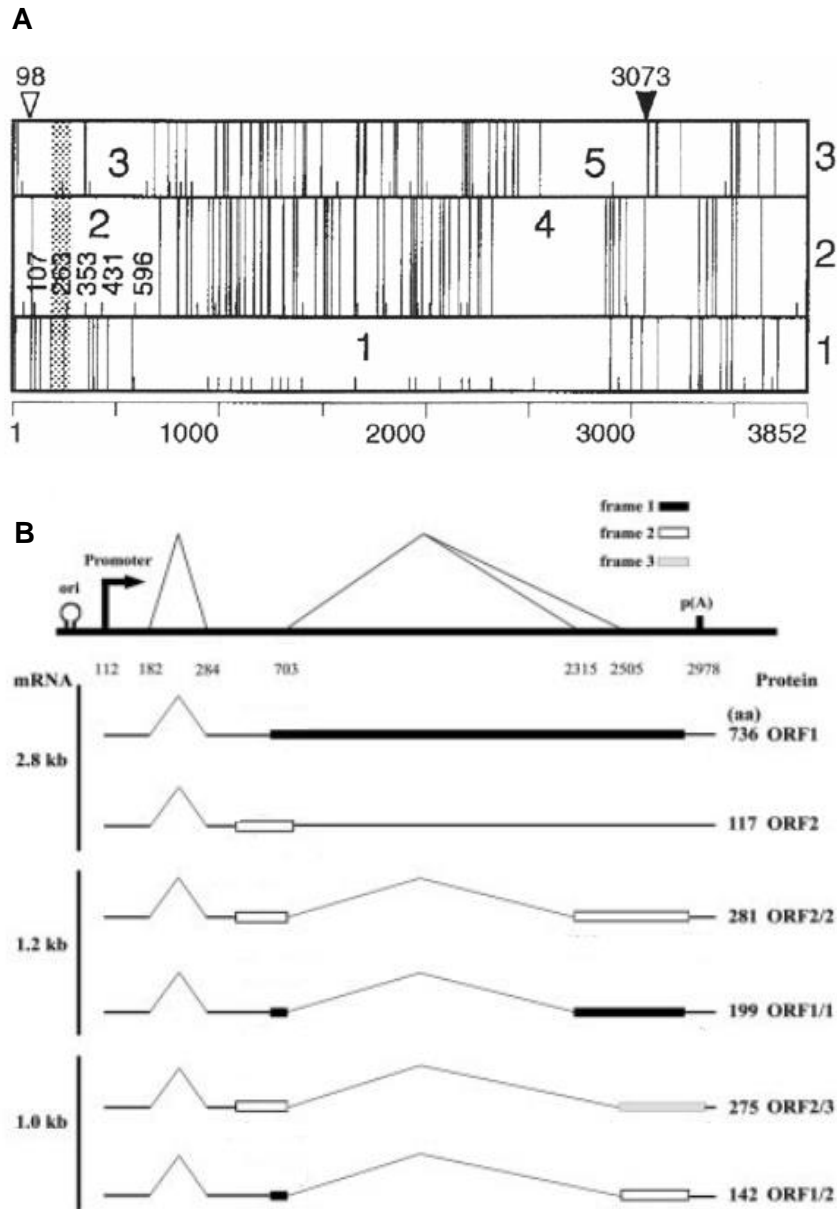


Figura 4. Representación esquemática de un clon de genoma completo de TTVH y sus ARNm.

En el panel superior (A) se muestran tres marcos de lectura, donde el triángulo blanco indica la posición del sitio cap y el triángulo negro indica la señal poli-(A). Las líneas verticales cortas y largas representan ATGs y codones stop, respectivamente. Los números indican los ORFs. El área sombreada a lo largo de los tres marcos muestra el primer sitio de splicing común a todos los mensajeros.

En el panel inferior (B) se indican los marcos y los mensajeros de 3.0, 1.2 y 1.0 Kb junto con los seis ORFs, las líneas finas representan intrones, las gruesas ARNm y los rectángulos áreas traducidas. También, se observan la cantidad de aminoácidos que posee cada proteína producida (A: extraído de Kamahora et al., 2000. B: adaptado de Qiu et al., 2005).

1.3.4. Proteínas.

Se ha demostrado que TTVH expresa seis proteínas por medio de traducción alternativa de los transcritos:

ORF 1, el marco abierto de lectura más largo de todos, produce la proteína de cápside (Takahashi et al., 1998). La longitud de esta proteína varía entre 719-770 aminoácidos (aa) (Erker et al., 1999; Ukita et al., 2000; Tanaka et al., 2000b; Heller et al., 2001). Este producto de ORF 1 cuenta además, con dos motivos asociados a la replicación viral llamados motivos Rep cercanos a la región carboxilo terminal, de los cuales, por lo menos uno de ellos es conservado entre la mayoría de las cepas de TTVH (Erker et al., 1999; Mushahwar et al., 1999; Tanaka et al., 2001; Luo et al., 2002).

Por último, esta proteína tiene sitios de glicosilación variantes entre cepas (Tanaka et al., 2000b), que pueden probablemente tener efecto sobre la función proteica y/o la antigenicidad (Hijikata et al., 1999b; Bendinelli et al., 2001).

ORF 2, codifica para una proteína de 200 aa con un motivo aminoácido conservado (Hijikata et al., 1999, Peng et al., 2002) correspondiente a la proteína tirosina fosfatasa (Peters et al., 2002) y que se descubrió que tiene efectos regulatorios en la inmunidad innata y adaptativa (Zheng et al., 2007).

ORF 2/2, expresa una proteína de 280 aa, con un dominio rico en serina precedido por aa básicos en la región C-terminal (Tanaka et al., 2001; Peng et al., 2002).

ORF 2/3, produce una proteína que presenta similitud con factores de transcripción (Kamahora et al., 2000).

Las funciones de estas dos últimas proteínas permanecen aún en estudios y de las dos restantes (ORF 1/1 y ORF 1/2) se desconoce función alguna.

Hasta el momento, solamente ha sido posible sintetizar los transcritos de ARNm y expresar sus proteínas en líneas celulares como COS-1, células Huh7 (células de hepatocarcinoma humano) y células HEK 293 (células embrionarias de riñón humano) (Mueller et al., 2008). De igual manera, se expresaron proteínas de TTVH pero en células de bacteria e insecto (Kakkola et al., 2008).

Asimismo, Qui et al. (2005) realizaron el único ensayo exitoso hasta el momento de localización subcelular de las proteínas expresadas tras transfección en células HEK 293. Las proteínas fueron marcadas con GFP (Green Fluorescent Protein) y analizadas por microscopía confocal. A modo de conclusión, se determinó que las dos proteínas producidas por ORF 1 y ORF 2 presentaron localización predominantemente citoplasmática. Sin embargo, también se observó que ORF 1 posee un motivo de residuos de Arginina que actúa como una señal de localización nuclear, consistente con su función en la replicación viral. Las proteínas expresadas por ORF 2/2 y ORF 2/3 se encontraron casi exclusivamente en el núcleo, mientras que los productos de ORF 1/1 y ORF 1/2, se hallaron igualmente distribuidos a lo largo de la célula (Qiu et al., 2005). Quizás el conocer la ubicación de cada proteína en la célula, pueda contribuir en un futuro a elucidar su rol.

1.3.5. Replicación viral.

Basándose en semejanzas con otros virus de genoma circular, se propuso que TTVH replica por el mecanismo de círculo rodante (Mushahwar et al., 1999). Hasta el momento, no se conocen detalles sobre el ciclo viral como la entrada o el egreso (Bendinelli et al., 2001).

La replicación por círculo rodante es un mecanismo que sintetiza múltiples copias de moléculas de ADN circular de forma rápida y unidireccional (Brock et al., 2004) (Figura 5).

En primer lugar, gracias a las enzimas del hospedero se debe generar un intermediario replicativo, llamado forma replicativa (FR), consistente en ADN circular bicatenario (Brock et al., 2004).

Una vez que se ha formado FR, la proteína con motivos Rep (codificada por ORF 1) se une a los sitios de inicio de la replicación y crea un corte en una cadena, el extremo 3' expuesto se utiliza como primer para la síntesis de una nueva hebra (Brock et al., 2004).

Empleando la cadena sin cortar como molde, la replicación avanza por medio de la ADN polimerasa III del hospedero a lo largo del ADN circular desplazando la hebra cortada como ADN uncatenario lineal, facilitado por una helicasa codificada por la célula (Brock et al., 2004).

Luego de finalizada la replicación, la proteína Rep introduce otro corte en la hebra lineal para liberarla. Por medio de la ADN pol III y ADN ligasa se repara el sitio de origen, permaneciendo la FR para una próxima ronda replicativa (Brock et al., 2004).

Finalmente, la ADN ligasa une la hebra monocatenaria liberada, obteniéndose genoma circular (Brock et al., 2004).

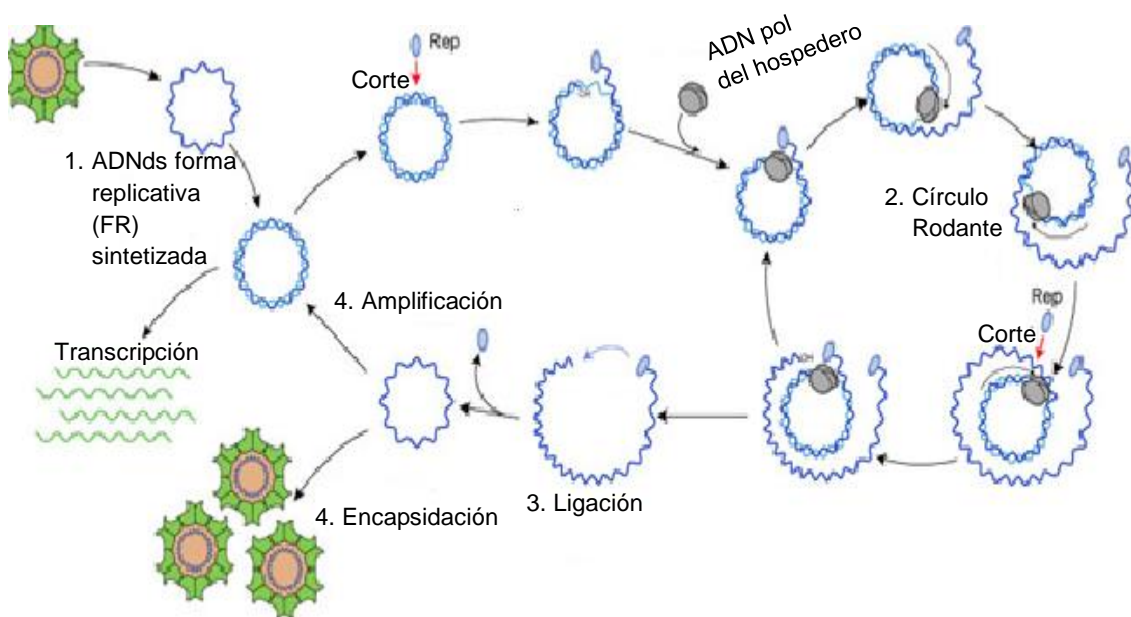


Figura 5. Ilustración esquemática del ciclo replicativo de los Anellovirus por el mecanismo del círculo rodante. (Extraído y adaptado de ViralZone http://viralzone.expasy.org/all_by_species/1941.html)

1.3.6. Variabilidad genética.

A pesar de que TTVH es un virus ADN, presenta una heterogeneidad de secuencia nucleotídica entre los genotipos superior al 30 % (Tanaka et al., 1998a,b; Viazov et al., 1998a; Okamoto et al., 1998b; Simmonds et al., 1998; Takayama et al., 1999b; Muljono et al., 2001) y una alta divergencia a nivel aminoacídico entre cepas desde el 47 % al 70 % (Biagini et al., 1999; Luo et al., 2002).

Curiosamente, la divergencia en el área codificante es mayor a nivel de aminoácidos que a nivel nucleotídico, una situación que usualmente es lo opuesto (Tanaka et al., 2000b). Justamente, esto se debe a la existencia de regiones hipervariables (HVRs), que son exclusivas de ORF 1, dónde se localizan la mayoría de los cambios aminoacídicos no-conservativos, conteniendo múltiples inserciones de codones o deleciones (Jelcic et al., 2004).

Con respecto al área no codificante, la UTR B resulta ser variable (Kamada et al., 2004, Okamoto et al., 1999b), mientras que la región UTR A es bastante conservada entre las cepas, por lo que generalmente se recurre a ella para la detección de TTVH (Okamoto et al., 1999b; Ukita et al., 2000; Bendinelli et al., 2001; de Villiers et al., 2002; Hino et al., 2007; Rocchi et al., 2009).

Asimismo, se ha observado muy comúnmente co-infección de diferentes genotipos o genogrupos en un mismo individuo (Ball et al., 1999; Biagini et al., 1999; Chan et al., 2001a; Forns et al., 1999; Gallian et al., 1999; Mushahwar et al., 1999; Prescott et al., 1999; Okamoto et al., 1999b; Takayama et al., 1999b; Niel et al., 2000; Jelcic et al., 2004), esto se cree que es debido a que sólo una pequeña fracción de TTVH poseen todos los componentes requeridos para una infección exitosa, por lo que la co-infección con varias cepas aportaría los elementos faltantes (Khudyakov et al., 2000; Luo et al., 2002).

La razón exacta de esta variabilidad no es conocida, pero se cree que pueda ser debido a recombinaciones, generación de mutantes, una larga trayectoria de infección humana y/o falta de competición entre las cepas. (Khudyakov et al., 2000). Incluso, en un intento de explicar la causa de esta amplia variabilidad, se sugirió que TTVH circula como cuasiespecies, una particularidad única para un virus ADN (Jelcic et al., 2004).

Precisamente, debido a todas estas razones, es que la única técnica utilizada para su detección y para la mayoría de los estudios, sigue siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), demostrando además, ser dificultosa ante la imposibilidad de amplificar amplias y distintas regiones debido a su enorme tasa de variabilidad, acotando por lo tanto su investigación en otros aspectos (Bendinelli et al., 2001).

1.4. Taxonomía de TTVH: la necesidad de una nueva familia viral.

Debido a los descubrimientos detallados a continuación y a las diferencias en las características fisicoquímicas y genómicas de TTVH con todos los virus conocidos, fue que en 2005 el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) decidió crear para ellos una nueva familia viral, *Anelloviridae* (Ninomiya et al., 2007).

En las primeras investigaciones que se llevaban a cabo para dar a conocer las características genómicas del virus, se reportó que éste poseía ADN lineal. Por lo tanto, se lo clasificó en la familia *Parvoviridae*, aunque TTVH no presentaba secuencia aminoacídica con semejanza significativa a dicha familia (Okamoto et al., 1998b). Además, los miembros de la familia *Parvoviridae* poseen secuencias palindrómicas que forman horquillas en ambos extremos de su secuencia nucleotídica, pero aún no se habían podido analizar los extremos 5' y 3' de Torque Teno Virus, ya que el intento de realizar una PCR invertida (la cual consiste en cebadores que divergen desde un punto) había resultado fallida, ante una sospecha de que pudiera tratarse de genoma circular (Okamoto et al., 1998b).

Un año después, la naturaleza circular del genoma de TTVH fue revelada debido a una finalmente exitosa PCR invertida, dando como resultado las secuencias de la región 5' y 3', así como aportando una nueva región rica en GC, lo que contribuyó a dilucidar su genoma completo (Mushahwar et al., 1999) y posteriormente, permitió dar lugar a una clasificación diferente.

Según el ICTV, no existían virus humanos ADNss circular, las únicas familias conocidas en las que se podía encontrar genoma circular eran *Circoviridae*, *Geminiviridae* (infecta plantas), *Inoviridae* y *Microviridae* (infectan bacterias). A partir de los cuáles, hasta ese momento se creía que los únicos virus que infectaban vertebrados eran los pertenecientes a la familia *Circoviridae*.

Durante muchos años, se consideró a TTVH el primer circovirus humano (Miyata et al., 1999, Takahashi et al., 2000), particularmente, debido a que la nueva región descubierta de TTVH presentó un alto grado de homología con un pequeño fragmento del genoma del Virus de la Anemia de Pollo (CAV) (Miyata et al., 1999).

Pese a este resultado, no se obtuvieron similitudes significativas en otras regiones del genoma (Miyata et al., 1999). Lo que es más, TTVH produce tres especies de mensajeros, a diferencia de CAV (Kamahora et al., 2000).

Asimismo, Torque Teno Virus no transcribe ARNm en la orientación genómica, a diferencia de PCV (Circovirus Porcino) que posee un genoma ambisense (Kamahora et al., 2000).

Paralelamente, estudios posteriores demostraron sorprendentemente la existencia de otros virus humanos estrechamente vinculados a TTVH, a los cuáles nombraron Torque Teno Mini Virus (TTMV) y Torque Teno Midi Virus (TTMDV), encontrándose también, otros virus similares en distintos animales (Takahashi et al., 2000).

Precisamente, el hallazgo de estas varias especies emparentadas fue lo que en particular impulsó la creación de la nueva familia *Anelloviridae* (Ninomiya et al., 2007).

1.4.1. Torque Teno Mini Virus.

En el año 2000, se descubrió accidentalmente el anteriormente mencionado TTMV por PCR con cebadores específicos de TTVH en el suero de un donante de sangre Japonés, pero generando un amplicón mucho más pequeño del esperado (Takahashi et al., 2000).

El genoma posee las mismas características que TTVH, circular monohebra de polaridad negativa. Sin embargo, dicho genoma es de menor longitud que TTVH, de entre 2,8 y 2,9 kb (Takahashi et al., 2000; Jones et al., 2005; Ninomiya et al., 2007) con un alto grado de divergencia aminoacídica y nucleotídica (Takahashi et al., 2000). La organización genómica de TTMV es muy similar a TTVH en su región GC así como para el área codificante (Takahashi et al., 2000; Biagini et al., 2001b).

Este virus se encuentra distribuido ampliamente a nivel mundial, con una gran prevalencia (Biagini 2001b, Niel et al., 2001).

1.4.2. Torque Teno Midi Virus.

En 2005, se aplicó un método de amplificación secuencia independiente (SISPA) en pacientes con infección viral aguda de etiología desconocida (Ninomiya et al., 2007). Esta metodología es especialmente utilizada en situaciones dónde la secuencia nucleotídica es desconocida y se encuentra en cantidades limitadas, volviendo dificultosa su recuperación por técnicas de clonado estándar (Ambrose et al., 2006).

Se obtuvieron para estos individuos genomas completos circulares ADN de 3,2 Kb (Jones et al., 2005), los mismos fueron clasificados en la familia *Anelloviridae* basándose en la presencia de regiones homologas a TTVH y TTMV en el marco de lectura de mayor tamaño así como en la región no traducida (Ninomiya et al., 2007).

Se decidió llamar a estas cepas TTMDV al tratarse un virus "intermedio" entre TTVH y TTMV en términos de longitud de genoma. Al mismo tiempo, se propuso que TTMDV podría ser producto de una delección de TTVH (Ninomiya et al., 2007).

Finalmente, se concluyó que la nueva familia viral *Anelloviridae* se encuentra compuesta por once géneros, de los cuáles tres de ellos poseen virus que infectan humanos. Siendo estos géneros Alphatorquevirus, Betatorquevirus y Gammatorquevirus, conformados por TTVH, TTMV y TTMDV respectivamente (Tyagi et al., 2013, ICTV).

Conjuntamente, TTVH ha demostrado una gran divergencia de secuencia entre las diferentes cepas, dando lugar a al menos 38 genotipos diferentes que se clasifican en cinco genogrupos virales o grupos filogenéticos distintos (Muljono et al., 2001; Okamoto et al., 2001b; Tyagi et al., 2013) como muestra la Figura 6.

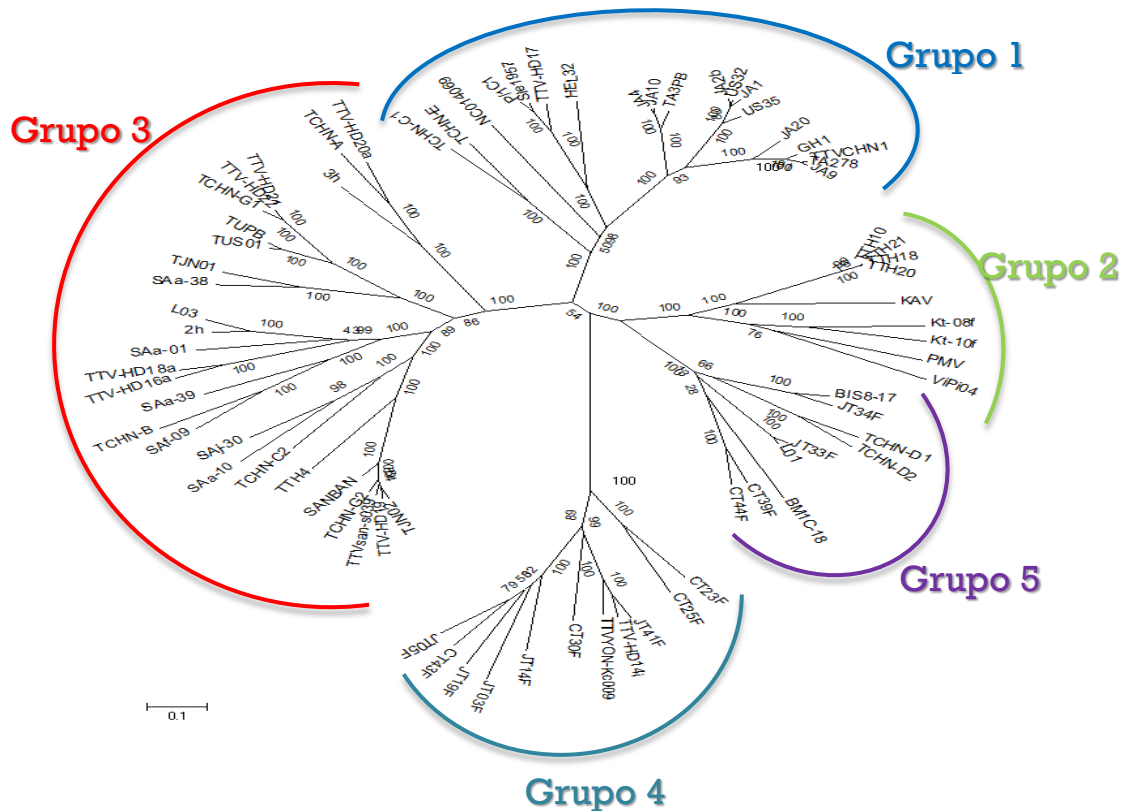


Figura 6. Arbol Filogenético basado en genomas completos de TTVH.

Construido con algoritmo Máxima verosimilitud en Mega 5.2. Valores de Bootstrap en 100 replicas. La escala representa un 10% de divergencia genética. (GenBank Accession No. según Hussain et al., 2012).

1.4.3. Torque Teno Virus de animales.

Los Torque Teno Virus no se encuentran solamente restringidos a humanos, sino que hay evidencia que demuestra una gran distribución en animales y mascotas domésticas, todos especie-específicos pertenecientes a distintos géneros (Abe et al., 2000; Cong et al., 2000; Okamoto et al., 2000a; Romeo et al., 2000; Thom et al., 2003).

Por ejemplo, entre ellos infecta a simios con una alta prevalencia. La organización genómica de TTVs de simios es muy similar a TTVH (Inami et al., 2000b; Okamoto et al., 2000b).

Además, se ha encontrado en otros mamíferos como perros, gatos y tupaias (Okamoto et al., 2001b; Okamoto et al., 2002; Biagini et al., 2007).

Torque Teno Virus Porcino (TTsuVs) es el que representa considerable interés por su posible impacto en el sector productivo, debido a su eventual riesgo en potenciar el desarrollo de ciertas enfermedades del cerdo producidas por otros virus, al detectarse particularmente en aquellos que presentan el síndrome de desmedro multisistémico postdestete (Kekarainen et al., 2006).

1.5. TTVH: En busca de una enfermedad.

1.5.1. Tropismo Celular.

Paralelamente, se ha identificado ADN de Torque Teno Virus en varios órganos, células y fluidos corporales, incluyendo todos los tipos de células mononucleares periféricas (PMBC), hígado, saliva, orina, heces, hisopados de garganta, bilis, hisopados cervicales, semen, leche materna, cabello, piel, médula ósea, músculo, glándula tiroidea, ganglio linfático, pulmones, páncreas, riñones, fluido cerebroespinal, tracto gastrointestinal y cerebro (Okamoto et al., 1998b; Yamamoto et al., 1998; Ishikawa et al., 1999; Okamoto et al., 1999a; Okamura et al., 1999; Ross et al., 1999; Ukita et al., 1999; Deng et al., 2000; Gallian et al., 2000; Gerner et al., 2000; Inami et al., 2000a; Jiang et al., 2000; Lopez-Alcorocho et al., 2000; Martinez et al., 2000; Matsubara et al., 2000; Osiowy et al., 2000; Rodriguez-Inigo et al., 2000; Schröter et al., 2000; Chan et al., 2001a; Fornai et al., 2001; Iso et al., 2001; Maggi et al., 2001a; Matsubara et al., 2001; Okamoto et al., 2001a; Suzuki et al., 2001; Yu et al., 2002; Zhong et al., 2002; Ohto et al., 2002; Maggi et al., 2003a; Pollicino et al., 2003; Sospedra et al., 2005).

Además de encontrarse en tejidos normales, TTVH ha sido identificado en tejidos tumorales (de Villiers et al., 2002; Sospedra et al., 2005).

A la vez, se ha localizado en el núcleo y el citoplasma de los hepatocitos en pacientes con daño hepático, siendo estas células las principales candidatas para la replicación de TTVH (Cheng et al., 2000; Jiang et al., 2000).

También, debido a que las secuencias de TTVH halladas en suero sanguíneo fueron diferentes a las encontradas en PMBC, se ha sugerido que ciertos genotipos puedan tener preferencias por determinado tipo de células (Chan et al., 2001a; Okamoto et al., 1999a; Okamoto et al., 2000d).

1.5.2. Transmisión de TTVH.

Desde un principio, se ha demostrado que la prevalencia de ADN de TTVH es mayor en pacientes que han recibido múltiples transfusiones sanguíneas y en consumidores de drogas inyectables (Simmonds et al., 1998; Viazov et al., 1998b; Forns et al., 1999; Prati et al., 1999; Maeda et al., 2000), confirmando justamente, que el virus es transmitido por sangre (Takahashi et al., 2000). Sin embargo, luego se observó que esta no es la principal ruta de transmisión, ya que no explica su alta prevalencia en pacientes enfermos a nivel mundial (MacDonald et al., 1999; Yazici et al., 2002).

La presencia de elevados títulos virales de ADN de Torque Teno Virus en heces de individuos virémicos, ha indicado la circulación del mismo por vía fecal-oral. (Okamoto et al., 1998a; Ross et al., 1999; Ukita et al., 1999).

Simultáneamente, se ha detectado TTVH en ambientes acuáticos y en aguas residuales (Vaidya et al., 2002; Haramoto et al., 2005b), siendo estas últimas, típicas vías para un virus muy prevalente.

Asimismo, en el Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro se emitieron posters informativos de distribución pública para concientizar sobre la alta presencia de TTVH en agua potable debido a la desembocadura de heces de ríos y al tratarse de un virus no envuelto puede resistir condiciones ambientales adversas y los métodos actuales de purificación de agua.

También, se ha propuesto otra posible ruta de transmisión vía el tracto respiratorio y por aerosoles, ya que se ha identificado en saliva (Deng et al., 2000; Gallian et al., 2000), hisopados de garganta (Ishikawa et al., 1999) y aspirados nasofaríngeos (Chung et al., 2007).

Además, la transmisión sexual ha probado ser una vía importante de dispersión viral en la población adulta, habiéndose hallado TTVH en hisopados cervicales (Calcaterra et al., 2001; Chan et al., 2001c; Fornai et al., 2001) y semen (Inami et al., 2000a; Martinez et al., 2000).

Por último, se ha sugerido una transmisión vertical de madres virémicas a hijos al detectarse TTVH en sangre de recién nacidos, en sangre del cordón umbilical y líquido amniótico (Saback et al., 1999; Gerner et al., 2000; Morrica et al., 2000; Matsubara et al., 2001, Bagaglio et al., 2002), así como también en leche materna (Gerner et al., 2000; Schröter et al., 2000; Iso et al., 2001; Matsubara et al., 2001; Ohto et al., 2002).

Paralelamente, a pesar de haberse identificado Anellovirus que infectan diferentes especies animales, la posibilidad de transmisión zoonótica hasta el momento se desconoce.

1.5.3. Epidemiología viral.

1.5.3.1. Distribución mundial y prevalencia de TTVH.

Desde su descubrimiento, diversos trabajos han reportado que existe una población de riesgo en la cual TTVH ha sido detectado con mayor frecuencia y mayor carga viral. Precisamente, presenta una mayor prevalencia en pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV-1) y en individuos con cuadros clínicos de Hepatitis (Charlton et al., 1998; Abe et al., 1999; Nasser et al., 2009) como muestra la Tabla 1.

Además, se ha demostrado que el virus se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial en dicha población de riesgo, (Abe et al., 1999; Okamoto et al., 1999b; Prescott et al., 1999; Viazov et al., 1998a) sugiriéndose adicionalmente que su prevalencia aumenta con la edad (Hsieh et al., 1999; Saback et al., 1999; Umemura et al., 2001a; Zhong et al., 2001a).

Al mismo tiempo, se ha propuesto la existencia de predominancia geográfica de ciertos genotipos (Prescott et al., 1999; Umemura et al., 2003; Vasconcelos et al., 2003), aludiendo a que algunos genogrupos son más comunes que otros (Maggi et al., 2005a; Maggi et al., 2006).

Tabla 1. Prevalencia de TTVH en pacientes con diferentes enfermedades hepáticas y HIV-1.

Enfermedad	Pacientes (%)	País
Hepatitis fulminante	19	Inglaterra (Simmonds et al., 1998)
Hepatitis fulminante	27	USA (Charlton et al., 1998)
Hepatitis fulminante	47	Japón (Okamoto et al., 1998b)
Hepatitis fulminante	39,5	España (G-Barcons et al., 1999)
Hepatitis fulminante	16	Alemania (Schöter et al., 1999)
Hepatitis aguda	71	Brasil (Niel et al., 1999)
Hepatitis aguda	41	Taiwan (Kao et al., 1999)
Hepatitis crónica	25	Inglaterra (Naumonov et al., 1998)
Carcinoma hepático	25	Corea (Nakano et al., 1999)
Carcinoma hepático	29,9	España (G-Barcons et al., 1999)
Cirrosis	63	Taiwan (Hsieh et al., 1999)
Cirrosis	52	Tailandia (Tanaka et al., 1998a)
Hepatitis B	29	Brasil (Devalle y Niel., 2004)
Hepatitis B	89,7	Pakistán (Hussain et al., 2012)
Hepatitis C	90	Pakistán (Hussain et al., 2012)
HIV-1	71	Brasil (Devalle y Niel., 2004)

1.5.3.2. Patologías asociadas a la infección por TTVH.

Debido al descubrimiento de TTVH en un paciente con Hepatitis clínica, (Nishizawa et al., 1997) muchas investigaciones han demostrado desde un principio, una estrecha asociación entre la prevalencia de TTVH y Hepatitis aguda, crónica y fulminante de etiología desconocida, así como también se ha relacionado con hepatocarcinoma, Hepatitis post transfusionales y cirrosis, proponiéndolo como una causa de desórdenes hepáticos de este tipo, siendo estos sus principales potenciales patogénicos (Nishizawa et al., 1997; Charlton et al., 1998; Tanaka et al., 1998a; Ikeda et al., 1999; Kanda et al., 1999; Okamura et al., 2000).

A la vez, co-infecciones de Torque Teno Virus con otros virus hepáticos, especialmente Hepatitis C y Hepatitis B, han sido ampliamente estudiadas, demostrándose, que una mayor carga viral de TTVH puede ser un factor importante para el desarrollo de hepatocarcinoma en pacientes con Hepatitis C (Tokita et al., 2002).

Precisamente, en Italia en 2007, se reportó un caso único hasta el momento, dónde un paciente con aneurisma en arteria hepática fue sometido de urgencia a un transplante de hígado, siendo el mismo 100 % compatible con el paciente y negativo para todos los virus hepatotrópicos analizados. Sin embargo, días luego de la cirugía, se registraron niveles de transaminasas muy elevados junto con lesiones en los lóbulos hepáticos. Se repitieron los análisis de detección viral, bacterial y parasitaria, con la excepción que el único virus hallado fue TTVH (Piaggio, et al 2007).

Asimismo, se ha relacionado en gran medida a pacientes inmunocomprometidos, ya que se indicó que el título viral de TTVH aumenta considerablemente en pacientes con HIV que están progresando a SIDA, correlacionándose con un bajo conteo celular de

linfocitos T CD4⁺. (Christensen et al., 2000; Shibayama et al., 2001; Touinssi et al., 2001; Madsen et al., 2002; Sagir et al., 2005a; Thom et al., 2007; Nasser et al., 2009).

En menor medida, se ha sugerido que TTVH posee un rol en enfermedades respiratorias agudas en niños, pues se ha observado mayor carga viral en hisopados nasales, especialmente en individuos con enfermedades del tracto respiratorio más severas, como broncopneumonia (Maggi et al., 2003b). También, se ha propuesto que contribuye a la patogénesis del asma (Pifferi et al., 2005).

Se ha reportado a su vez, co-infección de TTVH con el Papillomavirus Humano (HPV) en células cervicales, probando ser más prevalente en mujeres con múltiples infecciones con HPV (Calcaterra et al., 2001).

En paralelo, se halló evidencia de una carga viral aún mayor en tejido gástrico de pacientes con gastritis y con la bacteria *Helicobacter pylori* (Maggi et al., 2003a).

Conjuntamente, varios estudios sostienen una relación de TTVH con cáncer, habiéndose detectado en varios tipos de linfomas. Postulándose, que de alguna manera modula las células T que infecta y entonces tiene algún rol en la patogénesis de los linfomas (Garbuglia et al., 2003). Se propuso para ello, una hipótesis interesante, en la cual se sugiere que la infección persistente de TTVH incrementa el riesgo de translocaciones específicas, teniendo un efecto en el desarrollo de leucemias y linfomas en niños (zur Hausen et al., 2005).

Por otro lado, muchos desordenes autoinmunes aún carecen de un agente causante definido, por lo que TTVH también ha sido estudiado al respecto. Gergely et al. (2005a) notaron que los péptidos producidos por ORF 1 y ORF 2 de TTVH, son similares a la proteína nuclear codificada por los retrovirus endógenos humanos, contra la cual se generan comúnmente auto-anticuerpos en el lupus eritematoso sistémico (LES), mostrando que en estos pacientes, además de poseer alta carga viral de TTVH, tenían anticuerpos contra los péptidos.

También, se ha detectado TTVH en pacientes con artritis reumatoidea (Hirata et al., 1998; Gergely et al., 2005a) y con miopatías inflamatorias idiopáticas (IMM) (Gergely et al., 2005a).

Interesantemente, muchos estudios han manifestado reducción de niveles de TTVH durante tratamiento con Interferón, indicando supresión pero no erradicación viral (Akahane et al., 1999; Chayama et al., 1999; Watanabe et al., 2000; Maggi et al., 2001c; Tokita et al., 2001; Ali et al., 2002; Umemura et al., 2002a; Kao et al., 2003).

Por lo tanto, la viremia de TTVH se ha demostrado que persiste durante muchos años como la mayoría de los Anellovirus, evadiendo la respuesta inmune por hipermutación de las regiones hipervariables de la ORF 1, (Jelcic et al., 2004) así como circulando como cuasi-especies (Nishizawa et al., 1999; Umemura et al., 2002b). Otro mecanismo descubierto para generar infección a largo plazo, es por medio de la proteína codificada por ORF 2, que suprime la vía NF- κ B e inhibe los genes involucrados en la inflamación viral, modulando la respuesta inmune (Zheng et al., 2007). Recientemente, se descubrió que los Anellovirus son los primeros virus ADN monohebra en producir miRNAs antagonizando la respuesta antiviral del hospedador (Kincaid et al, 2013).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

¿Por qué estudiar TTVH?

En primer lugar, en los últimos años en la Sección Virología, se ha comenzado a estudiar diferentes virosis emergentes de porcinos y se ha detectado por primera vez en el Uruguay la circulación de Torque Teno Virus Porcino en muestras de cerdos de diferentes criaderos del país.

Justamente, estos resultados llevaron a plantear la necesidad de investigar la presencia de Anellovirus en humanos ya que no sólo se desconoce su circulación en el país, sino que también su situación epidemiológica a nivel regional es realmente escasa.

Debido a que se trata de un virus muy ubicuo y con una alta prevalencia mundial, es esperable que en Uruguay se detecte su presencia.

De la misma manera, es aún más interesante realizar estudios de frecuencia de infección y co-infección en muestras de nuestro país que pertenecen a una población de riesgo, conformada por pacientes previamente diagnosticados para Hepatitis de etiología desconocida y HCV, HBV y/o HIV-1, para los cuales se ha detectado mayor carga viral en otras regiones.

Asimismo, es notable la falta de información sobre el tema, por lo que dicha tesina ofrece la posibilidad de contribuir a expandir su conocimiento, investigando por ejemplo, si existe un genogrupo predominante en la región o presencia de co-infección y si su frecuencia se ve influida por la enfermedad preexistente del paciente.

Eventualmente, investigaciones más profundas pueden llevar a elucidar su perfil epidemiológico y sus consecuencias a corto y largo plazo, ya que su gran diversidad genética representa un factor importante para la aparición de nuevas variantes virales, que mantienen la posibilidad de que pueda emerger como un patógeno para la población humana, siendo potencialmente importante en un futuro su diagnóstico a nivel clínico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

- ◆ El presente trabajo pretende optimizar e implementar técnicas de detección y caracterización molecular que permitan identificar por primera vez la presencia de cepas circulantes de TTVH en Uruguay.

3.2. Objetivos específicos.

- ◆ Desarrollar una técnica de detección molecular optimizada en el laboratorio que permita identificar la presencia del virus.
- ◆ Detectar ADN viral correspondiente a cepas circulantes de TTVH en 85 muestras de suero sanguíneo.
- ◆ Determinar la frecuencia de infección de TTVH en la población de riesgo a analizar y observar, cuando corresponda, frecuencia de co-infección con HCV, HBV y HIV.
- ◆ Poner a punto una técnica de caracterización molecular que permita realizar un análisis de variabilidad genética de las cepas identificadas y establecer relaciones filogenéticas con otras cepas existentes.
- ◆ Clonar un producto de amplificación a modo de conservar en stock un control positivo de TTVH en el país.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Muestras.

Las muestras analizadas corresponden a un material de archivo de los períodos 2012, 2013 y 2014 existentes en la seroteca del laboratorio de Virología.

Como se ha detallado anteriormente, el estudio se realizó en estas muestras debido a que representan una población de riesgo, en la cual TTVH es detectado en mayor frecuencia.

En total se procesaron 85 sueros sanguíneos humanos (Tabla 2), de los cuales, 72 de ellos son provenientes de pacientes del año 2012 del Servicio de Enfermedades Infecto Contagiosas-Instituto de Higiene (SEIC), previamente diagnosticadas para: HIV-1 (presentando carga viral elevada y conteo de linfocitos CD4+ bajo), HBV (a través de serología por presencia de antígeno de superficie de Hepatitis B) y HCV. Además, se analizaron 13 muestras correspondientes a 2013-2014 que provenían en su mayoría de niños del Hospital Central de las Fuerzas Armadas, con cuadro clínico de Hepatitis de etiología desconocida como Hepatitis aguda, cuyo agente etiológico no pudo ser determinado, presentando valores muy elevados para todas las enzimas transaminasas hepáticas.

Con el objetivo de diferenciar las muestras, a las pertenecientes del Instituto de Higiene se les asignó un código que consiste en la abreviatura SEIC a continuación de un número. Por otro lado, las muestras del Hospital Militar fueron designadas con las letras FA seguidas de un número y dos de ellas fueron nombradas P y A.

Tabla 2. Ficha técnica de las muestras analizadas.

Código	Edad	Género	HIV	HCV	HBV
SEIC 1	39	M	+	+	-
SEIC 3	45	F	+	+	+
SEIC 4	53	M	-	-	-
SEIC 5	31	F	+	+	+
SEIC 6	38	M	-	+	+
SEIC 7	50	M	-	+	-
SEIC 8	34	M	+	-	-
SEIC 9	43	F	-	-	+
SEIC 10		M	+	+	-
SEIC 11	45	M	+	+	-
SEIC 12	43	M	-	+	+
SEIC 13	54	M	-	+	-
SEIC 14	40	M	+	+	-
SEIC 15	37	M	-	+	-
SEIC 16	55	F	-	-	+
SEIC 17	37	M	-	-	+
SEIC 18					
SEIC 19	31	F	-	+	-
SEIC 20	38	M	-	+	-
SEIC 21	31	F	-	-	+
SEIC 22					
SEIC 23	40	M	+	-	+
SEIC 24	34	F	+	-	+
SEIC 26	42	F			
SEIC 27	41	M	-	+	-
SEIC 28	44	M			
SEIC 29	63	M			
SEIC 30	42	M			
SEIC 31	38	M	+	-	+
SEIC 32	28	M	-	-	+
SEIC 33	34	F	-	+	-
SEIC 34	54	M	-	+	-
SEIC 35	42	M	-	-	+
SEIC 36	31	F	-	+	-
SEIC 37	46	M	-	+	-
SEIC 38	59	M	-	+	-
SEIC 39	49	F	-	+	-
SEIC 40	43	M	-	-	+
SEIC 41	43	F	-	+	+
SEIC 42	32	M			
SEIC 43	41	F	-	+	-
SEIC 44	38	M	-	+	-
SEIC 46	27	M	+	-	+
SEIC 47	37	F	+	-	+
SEIC 48	41	M	+	-	+

SEIC 49	25	F	+	-	+
SEIC 50	35	M	-	+	-
SEIC 51					
SEIC 53					
SEIC 60					
SEIC 61					
SEIC 62					
SEIC 63	62	M	+	-	+
SEIC 64					
SEIC 65	50	M	+	+	-
SEIC 66		M	+	-	-
SEIC 67	36	F	+	+	-
SEIC 68		M	+	-	-
SEIC 69		M	+	-	-
SEIC 70	34	M			
SEIC 71	36	M	+	-	+
SEIC 72	50	M	+	+	-
SEIC 73	54	M	-	+	+
SEIC 74	55	M	+	+	-
SEIC 75	57	M			
SEIC 77			+	-	+
SEIC 78			+	+	-
SEIC 79	44	F	+	+	-
SEIC 80	46	M	+	+	+
SEIC 81	46	M	+	+	-
SEIC 82			+	-	+

Código	Edad	Género	Cuadro clínico
FA 1	Niño	M	Hep. etiología desconocida
FA 2	Adulto	F	Hepatitis Aguda
FA 3	19	F	Hepatitis Aguda
FA 4	16	F	Hepatitis Aguda
FA 5	70	M	Hepatitis Aguda
FA 6	Niño	M	Hepatitis Aguda
FA 8	4	M	Hepatitis Aguda
FA 9	17		Hepatitis Aguda
FA 10	18 meses	M	Ictericia y falla hepática
FA 11	Adulto	F	Hepatitis Aguda
FA 12	Adulto	F	Hep. etiología desconocida
P	Adulto	M	Hepatitis Aguda
A	Adulto	M	Hep. etiología desconocida

4.2. Extracción de ADN genómico.

Este procedimiento fue realizado en cabinas de Bioseguridad Nivel 2 debido a las características de las muestras.

Se realizó, para cada una de ellas, la extracción de ADN viral a partir de 200 µL de suero sanguíneo por medio del Kit comercial (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen), de acuerdo a las instrucciones suministradas por el fabricante, eluyéndo finalmente las columnas Mini spin QIAmp con 50 µL de UltraPure™ DNase/Rnase-Free Distilled Water, Invitrogen®.

En último lugar, el ADN obtenido se almacenó a -20°C hasta su análisis para preservar la integridad del genoma viral extraído.

4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se amplificaron dos regiones del genoma de TTVH, UTR A y UTR B, para su respectiva detección y caracterización molecular por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En primera instancia, no se utilizaron controles positivos de ningún tipo en las distintas PCRs realizadas debido a que no se contaba con ellos, hasta el momento en que se logró obtener la detección del primer positivo. Adicionalmente, en todas las reacciones se realizó un control negativo, utilizándose agua estéril libre de nucleasas en lugar de ADN.

4.3.1 Detección de ADN viral.

Para efectuar el screening de Torque Teno Virus en las muestras se procedió a realizar numerosos intentos en poner a punto variadas técnicas de PCR convencional. Para ello, se utilizaron las metodologías propuestas por Vasilyev et al. (2009), Massau et al. (2012) y Biagini et al. (2006), probando ser inefectivas y con resultados irreproducibles.

Finalmente, tras una larga búsqueda bibliográfica fue posible optimizar una técnica de Nested-PCR (Okamoto et al., 1999b) definiendo las características como, volumen de ADN, dilución a realizar, temperatura de annealing de los cebadores y condiciones de ciclado.

Se utilizaron cuatro oligonucleótidos específicos para la detección de TTVH, NG 133/NG 147 para la primer ronda de amplificación y NG 134/NG 132 para la segunda (Tabla 3), sintetizados comercialmente por Macrogen, Corea.

Estos cebadores amplifican la región UTR A desde el nucleótido 114 a 223, representando ser una zona altamente conservada entre cepas, obteniéndose, según un extenso número de autores, la mayor tasa de detección posible (Miyata et al., 1999; Okamoto et al., 199b; Bendinelli et al., 2001; Kamada et al., 2004; Suzuki et al., 2004).

El fragmento producido en la primera ronda es de 143 pb y en la segunda es de 110 pb (Tabla 3).

Tabla 3. Detalles de cebadores empleados en la detección (Okamoto et al., 1999b).

Nombre primer	Polaridad	Posición nucleotídica	Localización: UTR A Secuencia nucleotídica	Fragmento esperado	Tm (°C)
NG 133	Sentido	91-115	5'-GTA AGT GCA CTT CCG AAT GGC TGA G-3'	143 pb	60
NG 147	Antisentido	211-233	5'-GCC AGT CCC GAG CCC GAA TTG CC-3'		
NG 134	Sentido	114-136	5'-AGT TTT CCA CGC CCG TCC GCA GC-3'	110 pb	60
NG 132	Antisentido	204-223	5'-AGC CCG AAT TGC CCC TTG AC-3'		

Nota: Las posiciones nucleotídicas son de acuerdo a la cepa de referencia TA278 N° acceso NCBI AB008394.1 (Okamoto et al., 1999b).

Primera ronda de amplificación.

A partir del ADN viral extraído se llevó a cabo la amplificación en un volumen final de 25 μ L: utilizándose 0,15 μ L de la enzima Taq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, se agregó a la reacción 1,5 μ L de ADN, 2,5 μ L de Taq Buffer 10 X con KCl (Thermo Scientific®), 2 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0,5 μ L de dNTPs mix 10 mM, 0,5 μ L de cada primer 50 μ M especificado previamente en Tabla 3 y agua estéril cantidad necesaria. En la Tabla 4 se detallan las concentraciones finales en la reacción.

La mezcla de reacción fue posteriormente sometida a una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, realizándose 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72 °C por 40 segundos. Seguido de un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos en un termociclador applied biosystems® AB-Veriti® 96-well, (Thermo Scientific®).

Segunda ronda de amplificación.

Una vez culminada la primera etapa, se elaboró una nueva mezcla de reacción en el mismo volumen final de 25 μ L.

Consecutivamente, se procedió a realizar una dilución 1/5 del producto de amplificación obtenido en la primer ronda, en un volumen total de 10 μ L. Se añadieron 2,5 μ L de la dilución a la mezcla compuesta por los componentes descritos en la Tabla 4, en el mismo volumen y concentración final que para la primera ronda.

A continuación, se llevó a cabo el ciclado de la misma manera que para la primera etapa, con la única excepción de que se redujo el número de ciclos a 25.

Tabla 4. Valores de concentración de cada uno de los reactivos stock y en la reacción final.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final
Taq Buffer	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	2,0 mM
dNTPs Mix	10 mM	0,2 mM
Primer c/u	50 µM	1,0 µM
Taq Polimerasa	5 U/ µL	0,03 U/ µL

4.3.2. Caracterización molecular de las cepas.

Con motivos de elucidar la distribución de TTVH entre los cinco genogrupos existentes simultáneamente, se realizaron múltiples pruebas para intentar poner a punto una técnica de Multiplex PCR (Devalle y Niel., 2004), con cebadores universales que amplificarían la mayoría del genoma y cebadores antisentido específicos para cada grupo amplificando productos de distintos tamaños en pares de bases.

También, se pretendió amplificar por reacción en cadena de la polimerasa convencional y Seminested, la extremadamente variable región N22 perteneciente a la ORF 1 (Okamoto et al., 1999b).

Asimismo, se decidió amplificar una región relativamente variable, dónde se implementó y fue puesta a punto una Seminested-PCR para otra zona en la región no codificante, modificada de la original Nested-PCR propuesta por Okamoto et al. (1999b).

Fueron empleados tres oligonucleótidos específicos para TTVH, NG 148/NG 065 para la primer ronda y NG 149/NG 065 para la segunda (Tabla 5), elaborados comercialmente por Macrogen, Corea. Estos cebadores amplifican la región UTR B, desde el nucleótido 3362 al 3739, dicha zona a pesar de pertenecer a la región no codificante, posee mayor divergencia de secuencia, por lo que fue utilizada para la caracterización de las cepas.

En la primera etapa se obtiene un fragmento de 403 pb y en la segunda un fragmento de amplificación de 377 pb.

Tabla 5. Detalles de cebadores empleados en la detección (Okamoto et al., 1999b).

Nombre primer	Polaridad	Posición nucleotídica	Localización: UTR B Secuencia nucleotídica	Fragmento esperado	Tm (°C)
NG 148	Sentido	3337-3360	5'-CGA AAG TGA GTG GGG CCA GAC TTC-3'	403 pb	60
NG 065	Antisentido	3713-3739	5'-GCC GAC GGT TTT TTG GCG CCT TTT TTC- 3'		
NG 149	Sentido	3362-3385	5'-CCA TAA GGC CTT TAT CTT CTT GCC-3'	377 pb	60
NG 065	Antisentido	3713-3739	5'-GCC GAC GGT TTT TTG GCG CCT TTT TTC-3'		

Nota: Las posiciones nucleotídicas son de acuerdo a la cepa de referencia TA278 N° acceso NCBI AB008394.1 (Okamoto et al., 1998b).

Primera Ronda de amplificación.

Se llevó a cabo la reacción en un volumen final de 50 μL : utilizándose 0,3 μL de la enzima Taq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, se añadió a la mezcla 3 μL de ADN (Massau et al., 2012), 5 μL de Taq Buffer 10 X con KCl (Thermo Scientific®) 4 μL de MgCl_2 25 mM, 1 μL de dNTPs mix 10 mM, 1 μL de cada primer 50 μM especificado previamente en Tabla 5 y agua estéril cantidad necesaria. En la Tabla 4 se detallan las concentraciones finales en la reacción.

La reacción fue inicialmente desnaturalizada a 94 °C por 5 minutos, realizándose 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto. Seguido de un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos en un termociclador applied biosystems® AB-Veriti® 96-well.

Segunda ronda de amplificación.

Luego de finalizada la primera etapa, se elaboró una nueva mezcla de reacción en el mismo volumen final de 50 μL .

Seguidamente, se realizó una dilución 1/5 del producto de amplificación obtenido en la primera ronda, en un volumen total de 10 μL . Se añadieron 5 μL de la dilución a la mezcla compuesta por los componentes descritos en la Tabla 4, en el mismo volumen y concentración final que la primera etapa.

A continuación, se llevó a cabo el ciclado de la misma manera que para la primera parte con la única excepción de que se redujo el número de ciclos a 25.

4.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de PCR obtenidos fueron examinados por medio de electroforesis en geles de agarosa.

Para el caso de la Nested-PCR de detección, se sembraron 7 μL de amplificación junto al buffer de carga 6X, Thermo Scientific® (Azul de bromofenol, Xilencianol, Tris-HCl, glicerol y EDTA), en geles 2% preparados en buffer TAE 1X (Tris, ácido acético, EDTA pH=8,4) y conteniendo agente intercalante SYBR® Safe 10000X (Invitrogen®).

Con respecto a la Semಿನested-PCR de caracterización molecular, se sembraron 10 μL de producto en geles 1,5% preparados como se describe anteriormente.

En todos los casos se corrió un marcador de peso molecular 100 pb GeneRuler™ Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®).

Los productos corridos en la electroforesis fueron visualizados y fotografiados con transiluminador bajo luz ultravioleta, sincronizado al programa bioinformático procesador de imágenes Carestream.

4.5. Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN viral.

Una vez obtenidos los amplicones del tamaño esperado para la PCR de detección y de caracterización, se procedió a la purificación de ellos por banda de gel, con el Kit comercial QIAquick Gel extraction (Qiagen) o directamente del producto de PCR por medio del Servicio de Macrogen, Corea.

Finalmente, se midió la concentración en ng/ μ L y la relación de absorbancias 260/280 nm en un NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific y se conservó a -20 °C.

El total de los fragmentos purificados fue secuenciado por el Servicio Secuenciador Automático ABI 3730xl de Macrogen, Corea.

4.6. Análisis filogenético.

Luego de obtenidas las secuencias, se confirmó la correspondencia de las mismas con TTVH a través de la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) perteneciente a NCBI (National Center for Biotechnology Information), la cual permite hallar a través de un algoritmo heurístico regiones similares entre la secuencia nucleotídica en cuestión y las disponibles en Genbank, calculando a su vez valores estadísticos como el porcentaje de identidad.

Posteriormente, se recurrió al análisis y edición de las secuencias empleando el software BioEdit v. 7.0.5., evaluando el grado de homología de secuencia entre los aislados a través de una matriz de identidad.

Al mismo tiempo, se realizó la caracterización de las cepas y para ello se construyó un árbol filogenético por el método estadístico de Máxima Verosimilitud, utilizando el soporte estadístico de los clados mediante remuestreo a través del test de filogenia bootstrap en 1000 réplicas empleando el software MEGA v. 5.2 "Molecular Evolutionary Genetic Analysis". Para la construcción del árbol, se evaluó con el programa el modelo ADN más adecuado en particular para el set de datos, siendo este, el algoritmo General Time Reversible (GTR) más distribución gamma (G).

Por otra parte, también se aplicó el método estadístico Neighbor Joining (NJ) para la construcción del árbol, sin embargo, no resultó ser adecuado.

4.7. Clonación.

Se efectuó la clonación para un producto de amplificación seleccionado perteneciente a la PCR de caracterización, previamente purificado por gel de agarosa.

Este procedimiento fue realizado con el motivo de almacenar un stock de control positivo para TTVH con cepas Uruguayas al ser su primer estudio en el país.

Para ello, se utilizó el CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific®) y bacterias competentes *Escherichia Coli* cepa DH5- α .

El Kit contiene el vector pJET 1.2/blunt de 2974 pb (Figura 7), una molécula de ADN bicatenario circular abierta en un sitio de múltiple clonado con extremos romos, reconociendo varias enzimas de restricción para la posterior liberación del inserto.

El vector cuenta con el gen β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina exclusivamente a las bacterias que hayan adquirido el plásmido. El mismo posee además, un gen letal *eco47IR* cuyo producto es mortal para la bacteria en que se exprese, impidiendo el crecimiento de colonias que hayan incorporado el vector sin inserto.

Por lo tanto, para que se desarrollen colonias es necesario que se traten de bacterias recombinantes que posean no solo el vector sino también el producto de amplificación, ya que el inserto interrumpe el gen letal y su producto no es funcional.

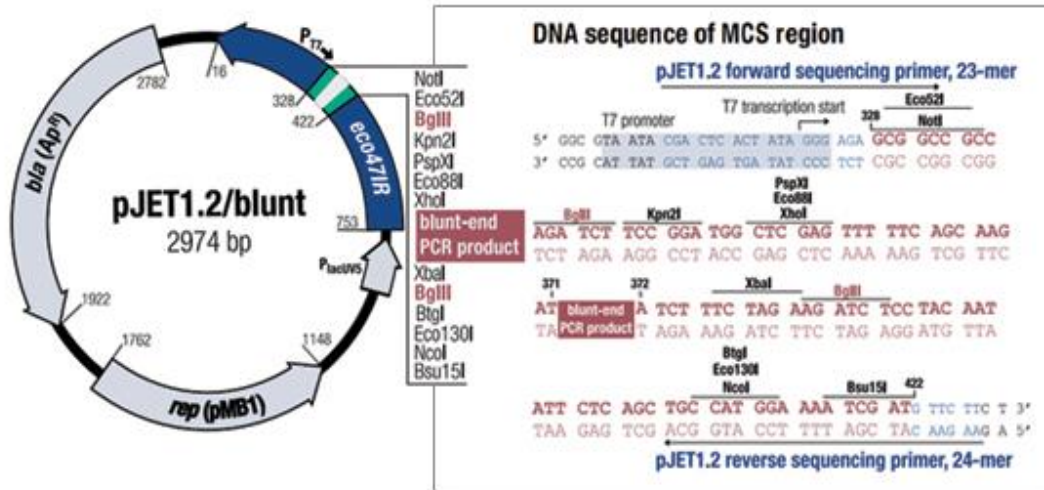


Figura 7. Vector de clonación pJET 1.2/blunt. En la imagen se representan los distintos sitios presentes en el vector, la región *rep* (pMB1) perteneciente al replicón responsable de la replicación, un sitio de inicio de replicación, un promotor T7, el gen letal *eco47IR* y el gen β -lactamasa *bla*(Ap^R). A la derecha del vector se indica la secuencia del mismo, destacándose el sitio de múltiple clonado, el sitio de inserción del inserto y de hibridación para los cebadores forward y reverse incluidos en el Kit. (Extraído del manual CloneJET™ PCR Cloning Kit).

Reacción de Blunting

En primer lugar, debido a las características de la *Taq Polimerasa*, esta produce amplicones que presentan una base Adenina protuberante en los extremos, por lo que fue necesario realizar una reacción de Blunting en el producto de PCR purificado, produciendo un fragmento con extremos romos que podrá ser incorporado fácilmente al vector. Para eso se realizó una mezcla de reacción con 10 μ L de buffer de reacción 2X, 2,4 μ L de producto de PCR de concentración conocida, 1 μ L de enzima DNA Blunting proporcionada por el Kit y 4,2 μ L de agua miliQ.

Luego, se incubó la mezcla a 70°C por 5 minutos y se colocó en hielo.

Reacción de Ligación

A continuación, se añadió 1 μ L del vector pJET 1.2/blunt 50ng/ μ L y 1 μ L de enzima T4 ligasa 5U/ μ L a la mezcla de blunting, incubándose por 30 minutos a temperatura ambiente.

Transformación

En la siguiente etapa, se alicuotaron 25 μL de bacterias *E.Coli* DH5- α competentes junto a la mezcla de ligación, conservando en hielo por 30 minutos y sometiéndose luego a un choque térmico a 42°C por 30 segundos para permitir la incorporación del plásmido y luego hielo por 5 minutos.

Posteriormente, se incubó esta mezcla de transformación con 425 μL de medio SOC comercial en agitador a 200 rpm 37°C por 1 hora.

Crecimiento de colonias

Consecutivamente, se plaqueó 250 μL de la mezcla de transformación en una placa de Petri previamente preparada y se permitió el crecimiento de las colonias durante 24 horas a 37°C.

Luego de ese tiempo, se seleccionaron seis colonias crecidas para picar e incubarse en un tubo Falcon junto a 3 ml LB líquido y 3 μL de ampicilina a 37°C durante toda la noche en agitador a 200 rpm.

Además, se dividió otra placa de Petri en seis cuadrantes, dónde se estrió en cada uno las mismas colonias picadas previamente, dejándose crecer 24 hs a 37°C.

Pasado este plazo, si se observa turbiedad en el tubo Falcon así como crecimiento en la placa estriada es debido a que son efectivamente bacterias recombinantes, por lo que entonces se procede al rastreo de estas colonias por medio de PCR Colony para comprobar la presencia del inserto en los vectores.

PCR Colony

Esta técnica se basa en tomar con un tip las colonias crecidas en las estrías para cada cuadrante y disolverlas por separado en agua estéril miliRo. Posteriormente, se hirvieron los tubos por 5 minutos a 98°C con el objetivo de lisar las bacterias y así liberar el plásmido, formándose un pellet notorio con las bacterias.

Se llevó a cabo el segundo round de la PCR de caracterización con las siguientes modificaciones, se realizó con 2 μL del sobrenadante del plásmido obtenido y el tiempo de extensión final del ciclado fue reducido a 45 segundos, en un volumen final de 25 μL . A parte de estas excepciones se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Para efectivamente evidenciar la presencia del inserto en los vectores, se efectuó una corrida electroforética de cada reacción de PCR Colony, de la misma manera que se especificó previamente.

Luego de demostrada la presencia del inserto, se procedió a la extracción del ADN plasmídico exclusivamente en el cultivo crecido que fue positivo por PCR Colony.

Extracción de ADN plasmídico.

Este procedimiento fue realizado por medio del Kit comercial (Zyppy™ Plasmid Miniprep).

Por último, se eluyó el ADN unido a la columna con 30 μL de agua estéril miliRo y se midió la concentración en ng/ μL y la relación de absorbancias 260/280 nm en un NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific.

Finalmente, se conservó un stock de control positivo de TTVH a -20°C.

Además, se almacenó en un tubo eppendorf 1,2 ml del cultivo crecido de LB líquido junto a glicerol en un 15% del volumen total, en freezer a -80°C.

5. RESULTADOS

5.1. Optimización de técnica y detección de TTVH por primera vez en Uruguay.

Previo a los inicios de esta investigación, se desconocía la circulación de Anellovirus en humanos en nuestro país, por lo que los resultados a continuación resultan ser muy novedosos y un gran hallazgo debido a la naturaleza compleja del virus.

Inicialmente, a partir del ADN genómico extraído, se detectaron los primeros positivos por medio de la metodología propuesta por Vasilyev et al. (2009), para la región UTR A, sin embargo, la misma carecía de sensibilidad y reproducibilidad, por lo que no fue posible su puesta a punto.

Posteriormente, se llevó exitosamente a cabo la optimización de la Nested-PCR también en la UTR A, ya que presenta un mayor grado de conservación entre distintas cepas, estableciendo el ciclado a utilizar según lo reportado por Okamoto et al. (1999b) y definiendo el volumen a considerar para la segunda reacción de amplificación.

Para ello, se realizaron segundas rondas a partir de 1 μ L de producto puro de la primera amplificación y con diluciones 1/5 y 1/10 (Figura 8). Se observaron amplicones para las tres condiciones, aumentando la intensidad de la banda a mayor dilución. Si bien no se vio inhibida la reacción a partir del producto puro, a modo de poder amplificar muestras que posean tanto carga viral alta como baja, se decidió considerar una condición intermedia, solamente la dilución 1/5 para todos las segundas rondas.

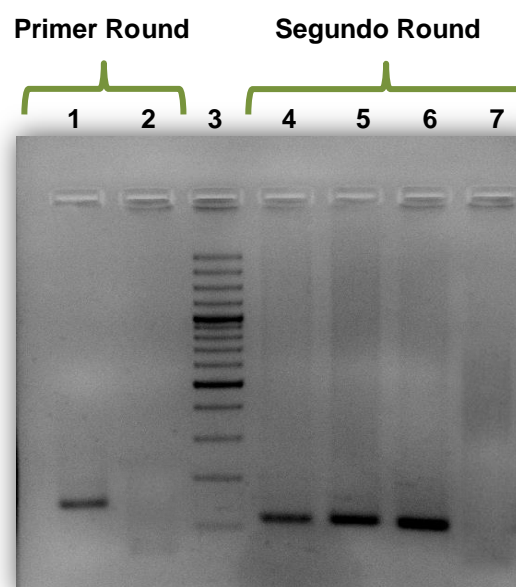


Figura 8. Puesta a punto de la técnica de detección. Electroforesis en gel de agarosa 2%, para el primer y segundo round de Nested-PCR amplificando la UTR A. Carril 1: SEIC 40 1° Round; Carril 2: Control negativo; Carril 3: Marcador de peso molecular 100 pb (GeneRuler™ Plus DNA Ladder, Thermo Scientific)®; Carril 4: SEIC 40 producto puro; Carril 5: SEIC 40 dilución 1/5, Carril 6: SEIC 40 dilución 1/10; Carril 7: Control negativo.

Una vez optimizada la técnica de detección, se realizó la Nested-PCR, lográndose visualizar en la primera ronda un fragmento de 143 pb solo para algunas de las positivas y en la segunda ronda bandas intensas de 110 pb para la totalidad de positivas, en geles de agarosa 2%. (Figura 9).

Subsiguientemente, se comprobó por secuencia la presencia de TTVH, adquiriéndose los cromatogramas ilustrados en el Anexo I.

El análisis de homología en la herramienta BLAST proyectó como era esperado un alto grado de similitud con regiones no codificantes de genomas completos de TTVH, demostrando enfáticamente que nos encontramos en presencia del virus (Figura 10).

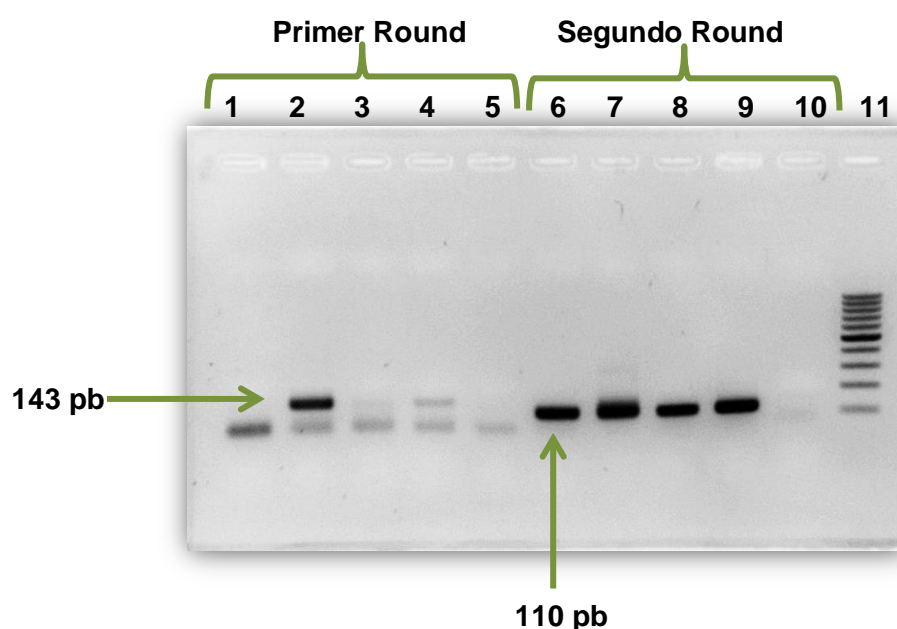


Figura 9. Detección de TTVH. Electroforesis en gel de agarosa 2% amplificando la región UTR A, produciendo un fragmento de 143 pb en el 1º round para los carriles del 1 al 5 y de 110 pb en el 2º round para los carriles del 6 al 10, indicados por flechas verdes respectivamente.

Carril 1: SEIC 44; Carril 2: SEIC 46; Carril 3: SEIC 47; Carril 4: SEIC 48; Carril 5: Control negativo, para 1º round, carriles 6 al 10 idem para 2º round, carril 11: Marcador de peso molecular 100 pb (GeneRuler™ Plus DNA Ladder, Thermo Scientific)®.

Description	País de origen	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Torque teno virus isolate T520 non-coding region genomic sequence	Alemania	250	250	99%	4e-63	99%	GU722347.1
Torque teno virus isolate 3h, complete genome	Brasil	244	244	99%	2e-61	99%	AY823989.1
Torque teno virus 16 DNA, complete genome, isolate: TUS01	Japón	233	233	99%	4e-58	97%	AB017613.1
Torque teno virus complete genome, isolate HD13c qsB21.51	Alemania	228	228	99%	2e-56	96%	FR848327.1
Torque teno virus complete genome, isolate HD13b qsB20.58	Alemania	228	228	99%	2e-56	96%	FR848326.1
Torque teno virus complete genome, isolate HD13a qsB20.33	Venezuela	228	228	99%	2e-56	96%	FR848325.1
TT virus isolate Amaz7012 non-coding region genomic sequence	Alemania	228	228	97%	2e-56	97%	AY590620.1
Torque teno virus, isolate tth4, complete genome	Alemania	228	228	99%	2e-56	96%	AJ620226.1
Torque teno virus, isolate tth31, complete genome	Alemania	228	228	99%	2e-56	96%	AJ620225.1
Torque teno virus, isolate tth25, complete genome	Alemania	228	228	99%	2e-56	96%	AJ620222.1
Torque teno virus, isolate tth17, complete genome	Alemania	228	228	99%	2e-56	96%	AJ620221.1
Torque teno virus, isolate tth16, complete genome	Alemania	228	228	99%	2e-56	96%	AJ620220.1

Figura 10. Resultados de homología por medio de la herramienta BLASTN perteneciente a la base de datos NCBI. En ella se detallan la descripción de la cepa, país de origen, porcentaje de identidad y número de acceso, con respecto a la muestra SEIC 40 positiva para TTVH, a modo de ejemplo.

Estas secuencias fueron utilizadas con el único fin de detección, ya que al ser conservadas no permiten genotipificación alguna, comprobándose mediante la construcción de distintos árboles (datos no mostrados).

5.1.2 Frecuencia de infección y co-infección.

Se analizaron las 85 muestras, obteniéndose resultados positivos para TTVH en 67 de ellas, corroborándose a partir de las secuencias su respectiva identidad con la base de datos NCBI a través de la opción MEGABLAST.

Se reportó por lo tanto por primera vez en Uruguay la presencia de TTVH, reflejando además una muy alta frecuencia de infección total del 79% en la población de riesgo, coincidiendo con los resultados hallados en otros países (Viazov et al., 1998a; Prescott et al., 1998; Abe et al., 1999; Okamoto et al., 1999b; Devalle y Niel., 2004; Niel et al., 1999; Huang et al., 2001; Zhong et al., 2001a; Erensoy et al., 2002; Yazici et al., 2002).

Asimismo, con motivos de observar una tendencia relacionando a TTVH con cada enfermedad en particular en la población de riesgo evaluada, se analizó en detalle la frecuencia de co-infección de Torque Teno Virus con cada virus diagnosticado en los pacientes (HIV-1, Hepatitis C, Hepatitis B) y Hepatitis de etiología desconocida y las posibles co-infecciones existentes entre ellos (Figura 11B).

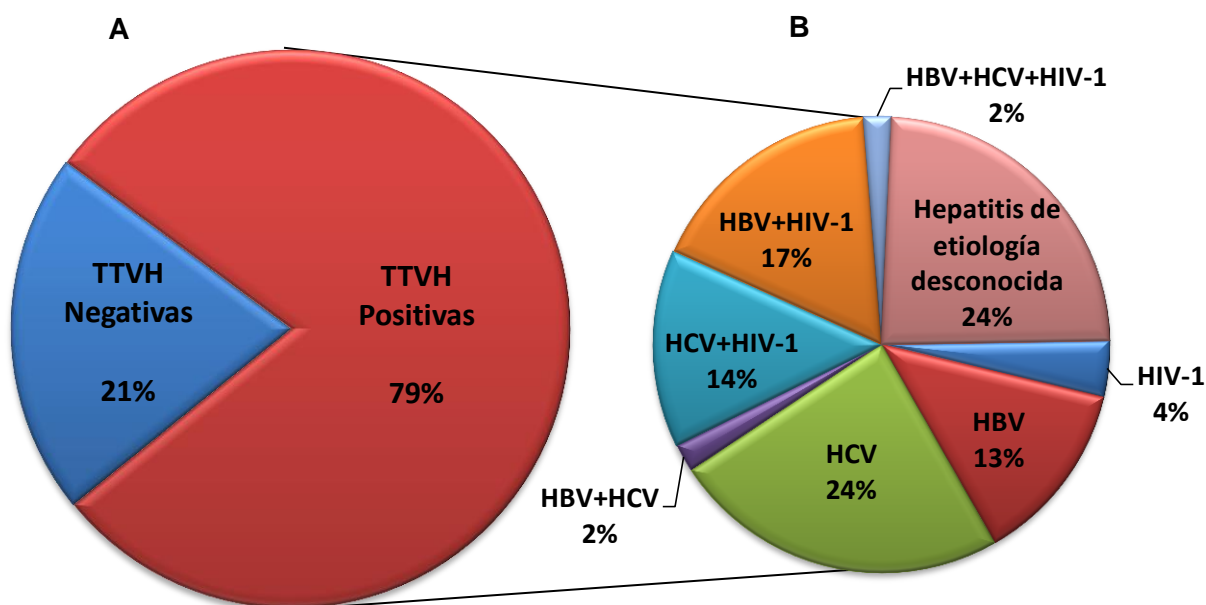


Figura 11. Gráficas sobre frecuencia de infección y co-infección de TTVH.

A, Se muestra el porcentaje de positivos y negativos para TTVH en el total de las muestras analizadas.

B, Se representa la relación en porcentajes de las diferentes frecuencias de co-infección entre TTVH, HBV, HCV, HIV-1 y Hepatitis de etiología desconocida.

A partir del porcentaje total de positivos para TTVH del 79%, se realizó el desglose de los datos desde la ficha técnica de los pacientes, como se detalla en la Figura 11B.

En los casos de individuos presentando co-infección con los tres virus HBV, HCV y HIV-1, se obtuvo un porcentaje de positivos para TTVH del 2%.

Notablemente, se observó el mismo porcentaje para los infectados por HBV y HCV.

Con respecto a las muestras conteniendo HCV y HIV-1, ocurre un aumento en la frecuencia de co-infección con TTVH, pasando a ser del 14%.

También, se constató un incremento con respecto a los infectados por HBV y HIV-1, siendo un 17% TTVH positivos.

Considerando a las enfermedades individualmente, se alcanzó un valor del 4% de muestras de HIV-1 conteniendo TTVH.

Paralelamente, se obtuvo un 13% de infección por TTVH correspondiente a las muestras con HBV, siendo adicionalmente, la totalidad de ellas positivas para TTVH. Se observó además, que un 24% de TTVH positivos corresponden a los individuos que presentan HCV.

Por último, se observó el mismo porcentaje (24%) de TTVH positivos para las muestras con Hepatitis de etiología desconocida. Cabe destacar, además, que se detectó la presencia de TTVH en la totalidad de estas muestras analizadas de Hepatitis no A-G.

Por otra parte, se contó con un bajo número de muestras sin datos clínicos que no fueron consideradas para el análisis de la frecuencia de co-infección.

Indudablemente, se obtuvo un alto índice de frecuencia de TTVH para la población de riesgo estudiada.

5.2. Optimización de técnica y caracterización de las cepas.

Para llevar a cabo la caracterización molecular de las cepas positivas, se realizó una Seminested-PCR que amplifica una gran región de la UTR B, la cual posee un mayor grado de variabilidad en comparación a la UTR A, permitiendo el análisis filogenético de sus secuencias. Esta técnica fue solamente aplicada a las muestras que demostraron ser positivas para TTVH según la PCR de detección.

Primeramente, como parte del procedimiento de la puesta a punto de la metodología, se estableció el ciclado según Okamoto et al. (1999b) y se evaluó el volumen adecuado de producto de la primera ronda de PCR a ser utilizado para la segunda amplificación, considerándose para ello el producto puro, una dilución 1/5 y una dilución 1/10. Consecutivamente, se observó solamente amplificación para ambas diluciones, inhibiéndose la reacción a partir del producto puro (Figura 12), debido posiblemente a una elevada carga viral para dicha muestra. Por lo tanto, se resolvió realizar la Seminested considerando exclusivamente 1/5 de dilución a modo de poder visualizar amplificación tanto en las muestras con carga viral alta como baja.

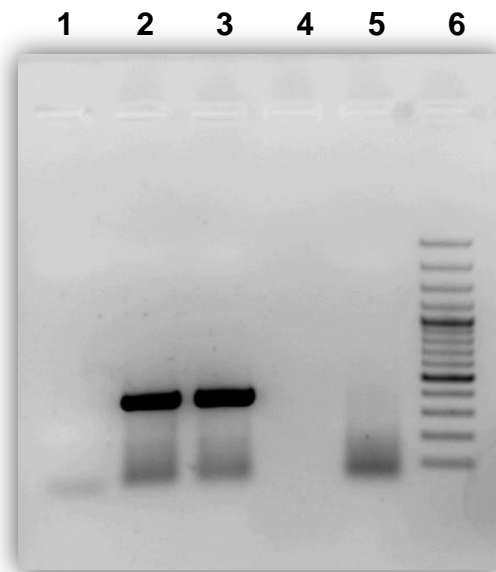


Figura 12. Puesta a punto de la técnica de caracterización. Electroforesis en gel de agarosa 1,5%, mostrándose solamente el segundo round para la UTR B.

Carril 1: SEIC 40 producto puro; Carril 2: SEIC 40 dilución 1/5; Carril 3: SEIC 40 dilución 1/10; Carril 4: Libre; Carril 5: Control negativo; Carril 6: Marcador de peso molecular 100 pb (GeneRuler™ Plus DNA Ladder, Thermo Scientific)®.

No se logró visualizar bandas de 403 pb para el primer round de la amplificación, pero si se observaron intensos productos para el segundo round correspondiente al tamaño esperado de 377 pb en gel de agarosa 1,5% (Figura 13).

Este método no amplifica la totalidad de las muestras positivas detectadas pero sí la mayoría, se obtuvieron por lo tanto amplicones para 42 muestras de las 67 detectadas, con una tasa de positivos para esta técnica de caracterización del 63%.

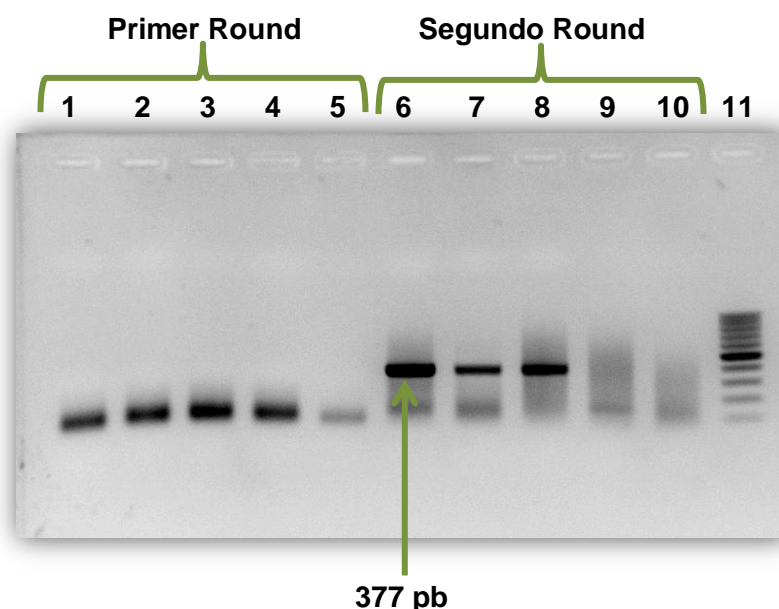


Figura 13. Caracterización de TTVH. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% amplificando la región UTR B, produciendo un fragmento de 403 pb en el 1º round no visible para los carriles del 1 al 5 y 377 pb en el 2º round para los carriles del 6 al 10, indicados por la flecha verde. Carril 1: SEIC 44; Carril 2: SEIC 46; Carril 3: SEIC 47; Carril 4: SEIC 48; Carril 5: Control negativo, para 1º round, carriles 6 al 10 idem para 2º round, carril 11: Marcador de peso molecular 100 pb (GeneRuler™ Plus DNA Ladder, Thermo Scientific®).

Asimismo, con la finalidad de obtener más información sobre otras regiones del genoma con una muy elevada tasa de heterogeneidad, se intentó poner a punto una Seminested-PCR (Okamoto et al., 1999b) para la región codificante N22 de la ORF 1, pero justamente respaldando la variabilidad nucleotídica del virus, no fue posible amplificarla.

Igualmente, se realizaron repetidos ensayos para poner a punto una Multiplex PCR (Devalle y Niel., 2004), que permitiera la identificación simultánea de las cepas en los cinco genogrupos existentes, también sin efecto alguno.

A continuación, se resume en la Tabla 6 los resultados obtenidos en total por todas las técnicas realizadas.

Tabla 6. Resultados obtenidos por los distintos métodos aplicados, dónde se detalla la región que amplifica y los cebadores utilizados.

Técnica empleada	Región de amplificación	Set de Cebadores	Positivos (%)	Función
Nested-PCR	UTR A	NG 133/NG 147; NG 134/NG 132	79	Detección
Seminested-PCR	UTR B	NG 148/NG 065; NG 149/NG 065	63	Caracterización
Seminested-PCR	N22	NG 059/NG 063; NG061/ NG 063	0	Caracterización
Multiplex PCR	Amplio rango del genoma	T1S/T1A; T2S/T2G1A/T2G2A, T2G3A/T2G4A/T2G5A	0	Caracterización

5.2.1. Análisis de secuencias.

5.2.1.1 Presencia de co-infección con cepas de TTVH.

En primer lugar, es importante destacar, que solamente fue posible realizar los posteriores análisis de secuencias para 20 muestras de las 42 obtenidas por la técnica de Seminested-PCR, debido a que 22 de ellas presentaban co-infección a lo largo de todo el fragmento obtenido (Ver Anexo II), volviendo dificultosa la edición y caracterización de las mismas, sin embargo, fue posible confirmar que se trataban de TTVH según la base de datos de Genbank.

Justamente, este resultado coincide ampliamente con lo documentado en la literatura, donde se ha demostrado que ocurre frecuentemente co-infección con múltiples genotipos o genogrupos de TTVH en un mismo individuo (Ball et al., 1999; Biagini et al., 1999; Chan et al., 2001a; Forns et al., 1999; Gallian et al., 1999; Mushahwar et al., 1999; Prescott et al., 1999; Okamoto et al., 1999b; Takayama et al., 1999b; Niel et al., 2000; Jelcic et al., 2004). Además, también se ha reportado muy comúnmente la presencia de co-infecciones de TTVH con TTMV y TTMDV (Niel et al., 2001; Moen et al., 2002a; Vasconcelos et al., 2003; Biagini et al., 2006a; Biagini et al., 2006b; Ninomiya et al., 2007a).

5.2.1.2. Estudio filogenético de TTVH.

A continuación, los productos de amplificación de 377 pb (Ver Anexo III) fueron editados en el programa BioEdit v. 7.0.5 y alineados en MEGA 5.2 para la realización posterior de un árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud con un valor de bootstrap en 1000 réplicas, utilizando el algoritmo de mejor ajuste para el conjunto de datos, siendo el GTR+G el más adecuado para el árbol. Se utilizaron cepas de referencia para cada uno de los cinco genogrupos (Figura 14).

Las relaciones filogenéticas establecidas mediante la construcción de este árbol, revisten un gran logro, ya que la mayoría de los divulgados en la literatura utilizan el algoritmo NJ y no presentan un soporte estadístico en ninguno de sus nodos (Viazov et al., 1998; Okamoto et al., 1999b; Hallet et al., 2000; Heller et al., 2001; Okamoto 2001; Peng et al., 2002), con excepción de los que involucran genomas completos (Hussain et al., 2012).

Precisamente, a modo de comparación, se construyeron árboles con el método estadístico NJ (datos no mostrados). No obstante, no se logró ningún tipo de agrupamiento para las cepas nacionales, ni una correcta división en los cinco genogrupos para las secuencias de referencia. Asimismo, los valores obtenidos de bootstrap fueron muy inferiores al 50%, demostrando por lo tanto, que este virus requiere de un método con un soporte estadístico mayor.

Se puede apreciar para este árbol obtenido además de los cinco grupos filogenéticos establecidos, la presencia de dos agrupamientos estrechamente vinculados formados por las cepas Uruguayas, no pertenecientes a ningún genogrupo en particular, incluyendo entre ellos a la cepa TTVH FA2 perteneciente a Hepatitis aguda de etiología desconocida. Sin embargo, tres muestras integran el cluster del grupo 2 junto a cepas Alemanas.

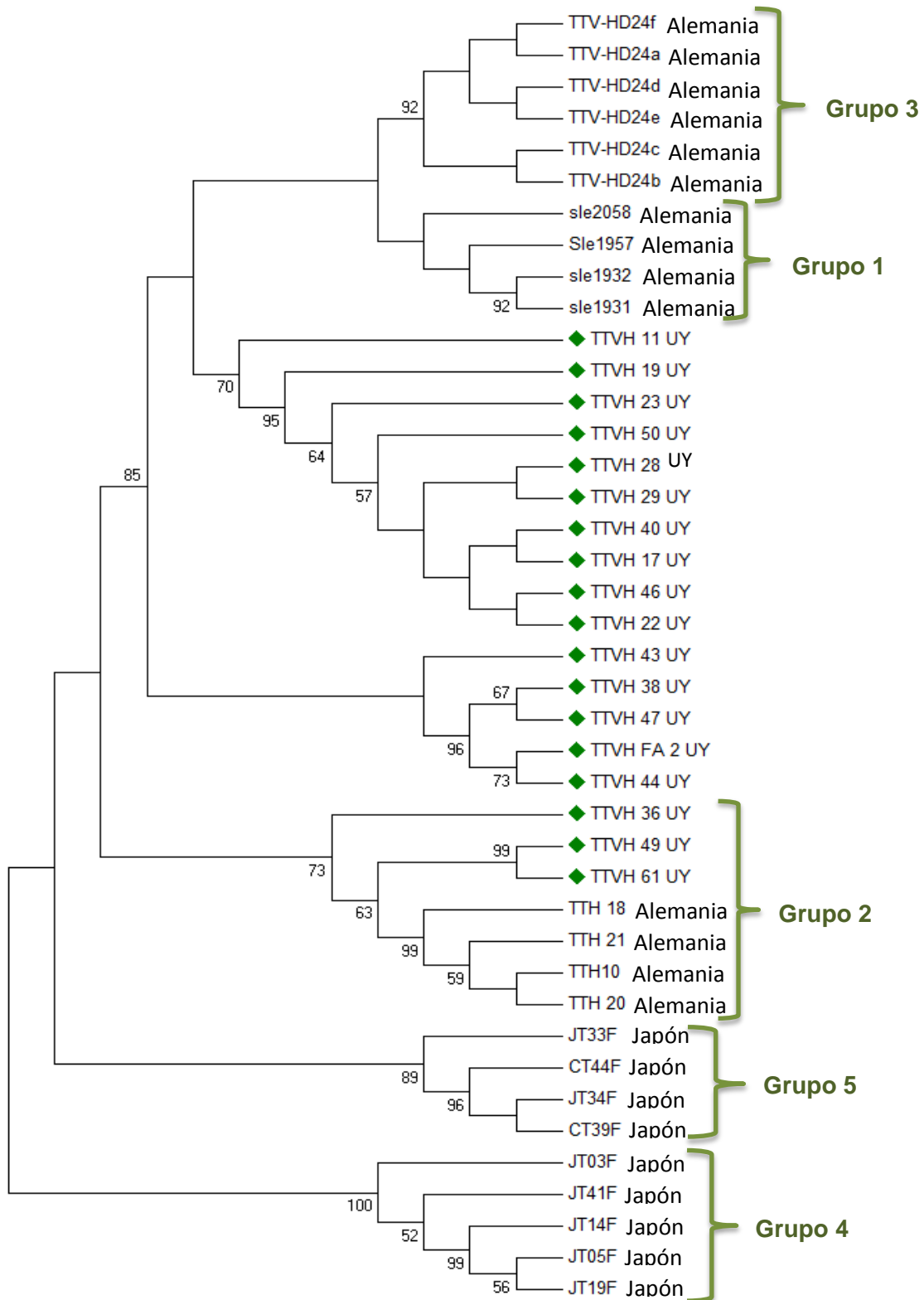


Figura 14. Cladograma obtenido por Máxima Verosimilitud basado en el alineamiento de un fragmento de 377 pb de la región UTR B.

Se muestran los valores de bootstrap obtenidos para los nodos con un apoyo estadístico mayor al 50%. Se detallan los nombres y el país de origen de los aislamientos de referencia para los cinco genogrupos. Además, se representan las cepas Uruguayas mediante un rombo verde y el sufijo UY.

Con el objetivo de analizar aún más en profundidad su secuencia genética, se realizó una matriz de identidad a través del software BioEdit v. 7.0.5 para así comparar el grado de homogeneidad nucleotídica (Figura 15). En la matriz se consideran las 20 cepas Uruguayas (identificadas dentro de un recuadro azul) y una secuencia de referencia de cada genogrupo (enmarcadas en un recuadro rojo), las cuales fueron nombradas G1 (Slc2058), G2 (TTH20), G3 (TTV-HD24f), G4 (JT05F) y G5 (JT33F).

El análisis reveló que la identidad nucleotídica entre las cepas nacionales corresponde a un amplio rango de homología desde 27,0% a 99,3%. A pesar de estos valores extremos, la gran mayoría de los fragmentos se encuentran con una similitud intermedia de promedialmente el 50%, lo cual coincide con lo reportado ya que se ha planteado que existe una divergencia nucleotídica superior al 30% entre una cepa y otra (Tanaka et al., 1998a,b; Viazov et al., 1998a; Okamoto et al., 1998b; Simmonds et al., 1998; Takayama et al.,1999b; Muljono et al., 2001).

Paralelamente, comparando exclusivamente las secuencias de referencia entre sí, se observó una similaridad entre el grupo uno al cinco desde 30,5% a 94,0%.

Las mayores diferencias observadas en la tabla, surgen de la comparación de las muestras uruguayas con las del grupo 4 y 5.

Contrariamente, son los grupos 1 y 3 los que poseen una mayor homología con las cepas, coincidiendo con lo representado en el árbol filogenético, dónde se observa que los dos grandes clusters uruguayos se subdividen a partir de estos dos genogrupos. Asimismo, las tres muestras que se agrupan en el grupo 2 (TTVH 36, TTVH 49 y TTVH 61) muestran efectivamente una marcada homología para ese grupo.

Seq-	40	28	29	36	38	43	FA2	44	46	47	49	50	71	80	11	17	19	22	23	61	G 1	G 2	G 3	G 4	G 5
40	ID	0,779	0,919	0,616	0,784	0,748	0,776	0,792	0,862	0,765	0,639	0,925	0,631	0,466	0,443	0,527	0,838	0,524	0,828	0,630	0,768	0,587	0,781	0,299	0,392
28	0,779	ID	0,778	0,460	0,617	0,568	0,573	0,582	0,654	0,557	0,441	0,721	0,453	0,586	0,518	0,617	0,690	0,613	0,705	0,432	0,636	0,463	0,643	0,371	0,468
29	0,919	0,778	ID	0,613	0,774	0,773	0,773	0,741	0,853	0,715	0,642	0,913	0,614	0,464	0,410	0,485	0,769	0,482	0,760	0,633	0,798	0,613	0,807	0,303	0,387
36	0,616	0,460	0,613	ID	0,637	0,614	0,601	0,617	0,579	0,610	0,667	0,589	0,395	0,314	0,283	0,292	0,549	0,292	0,539	0,667	0,612	0,636	0,604	0,334	0,374
38	0,784	0,617	0,774	0,637	ID	0,766	0,882	0,904	0,691	0,886	0,626	0,740	0,574	0,458	0,401	0,410	0,661	0,410	0,640	0,629	0,752	0,617	0,752	0,266	0,392
43	0,748	0,568	0,773	0,614	0,766	ID	0,772	0,739	0,706	0,719	0,637	0,754	0,564	0,474	0,355	0,379	0,630	0,379	0,609	0,637	0,734	0,631	0,738	0,311	0,418
FA2	0,776	0,573	0,773	0,601	0,882	0,772	ID	0,961	0,783	0,929	0,712	0,815	0,630	0,417	0,418	0,438	0,695	0,435	0,686	0,712	0,736	0,608	0,737	0,242	0,350
44	0,792	0,582	0,741	0,617	0,904	0,739	0,961	ID	0,758	0,966	0,688	0,786	0,627	0,423	0,434	0,454	0,721	0,451	0,708	0,688	0,721	0,593	0,719	0,243	0,354
46	0,862	0,654	0,853	0,579	0,691	0,706	0,783	0,758	ID	0,771	0,750	0,903	0,628	0,370	0,477	0,567	0,902	0,564	0,882	0,740	0,697	0,530	0,710	0,240	0,304
47	0,765	0,557	0,715	0,610	0,886	0,719	0,929	0,966	0,771	ID	0,699	0,759	0,609	0,399	0,445	0,462	0,733	0,458	0,720	0,699	0,700	0,570	0,697	0,229	0,331
49	0,639	0,441	0,642	0,667	0,626	0,637	0,712	0,688	0,750	0,699	ID	0,675	0,645	0,270	0,326	0,375	0,660	0,371	0,642	0,989	0,562	0,654	0,575	0,250	0,340
50	0,925	0,721	0,913	0,589	0,740	0,754	0,815	0,786	0,903	0,759	0,675	ID	0,647	0,431	0,435	0,519	0,820	0,516	0,810	0,665	0,756	0,585	0,769	0,276	0,361
71	0,631	0,453	0,614	0,595	0,574	0,564	0,630	0,627	0,628	0,609	0,645	0,647	ID	0,303	0,292	0,314	0,570	0,311	0,557	0,639	0,625	0,579	0,623	0,258	0,355
80	0,466	0,586	0,464	0,314	0,458	0,474	0,417	0,423	0,370	0,399	0,270	0,431	0,303	ID	0,553	0,567	0,391	0,567	0,392	0,267	0,516	0,371	0,514	0,336	0,469
11	0,443	0,518	0,410	0,283	0,401	0,355	0,418	0,434	0,477	0,445	0,326	0,435	0,292	0,553	ID	0,840	0,524	0,845	0,511	0,324	0,398	0,270	0,394	0,202	0,293
17	0,527	0,617	0,485	0,292	0,410	0,379	0,438	0,454	0,567	0,462	0,375	0,519	0,314	0,567	0,840	ID	0,602	0,993	0,610	0,364	0,407	0,276	0,409	0,217	0,296
19	0,838	0,690	0,769	0,549	0,661	0,630	0,695	0,721	0,902	0,733	0,660	0,820	0,570	0,391	0,524	0,602	ID	0,604	0,939	0,656	0,635	0,487	0,644	0,254	0,326
22	0,524	0,613	0,482	0,292	0,410	0,379	0,435	0,451	0,564	0,458	0,371	0,516	0,311	0,567	0,845	0,993	0,604	ID	0,606	0,365	0,404	0,273	0,406	0,217	0,296
23	0,828	0,705	0,760	0,539	0,640	0,609	0,686	0,708	0,882	0,720	0,642	0,810	0,557	0,392	0,511	0,610	0,939	0,606	ID	0,632	0,626	0,481	0,633	0,260	0,320
61	0,630	0,432	0,633	0,667	0,629	0,637	0,712	0,688	0,740	0,699	0,989	0,665	0,639	0,267	0,324	0,364	0,656	0,365	0,632	ID	0,559	0,648	0,572	0,247	0,337
G 1	0,768	0,636	0,798	0,612	0,752	0,734	0,736	0,721	0,697	0,700	0,562	0,756	0,625	0,516	0,398	0,407	0,635	0,404	0,626	0,559	ID	0,635	0,940	0,324	0,421
G 2	0,587	0,463	0,613	0,636	0,617	0,631	0,608	0,593	0,530	0,570	0,654	0,585	0,579	0,371	0,270	0,276	0,487	0,273	0,481	0,648	0,635	ID	0,623	0,305	0,420
G 3	0,781	0,643	0,807	0,604	0,752	0,738	0,737	0,719	0,710	0,697	0,575	0,769	0,623	0,514	0,394	0,409	0,644	0,406	0,633	0,572	0,940	0,623	ID	0,326	0,422
G 4	0,299	0,371	0,303	0,334	0,266	0,311	0,242	0,243	0,240	0,229	0,250	0,276	0,258	0,336	0,202	0,217	0,254	0,217	0,260	0,247	0,324	0,305	0,326	ID	0,591
G 5	0,392	0,468	0,387	0,374	0,392	0,418	0,350	0,354	0,304	0,331	0,340	0,361	0,355	0,469	0,293	0,296	0,326	0,296	0,320	0,337	0,421	0,420	0,422	0,591	ID

Figura 15. Matriz de identidad. En el recuadro azul se encuentran representadas las cepas uruguayas de 377 pb y se indican con un recuadro rojo las secuencias de referencia de cada genogrupo.

5.3. Obtención de stock de control positivo.

Con el propósito de conservar un stock de control positivo de cepas de TTVH Uruguayas, se realizó la clonación del producto de amplificación TTVH SEIC 40 generado por la Nested- PCR de caracterización en el vector pJET 1.2/blunt.

La verificación del inserto de interés en el plásmido fue llevada a cabo por medio de rastreo por PCR de las seis colonias crecidas, con los cebadores específicos para el segundo round y con las especificaciones anteriormente mencionadas.

Los amplicones obtenidos fueron visualizados mediante corrida electroforética en gel de agarosa 1 % (Figura 16), utilizando como referencia el marcador de peso molecular 100 pb GeneRuler™ Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®).

Se observó que solamente la colonia transformada número cuatro contenía el vector con el inserto incorporado del tamaño esperado de 377 pb, por lo que la extracción del ADN plasmídico se realizó en ella exclusivamente.

Posteriormente, se cuantificó el plásmido extraído en un Nanodrop™ 2000 Thermo Scientific y se conservó el stock a -20°C.

Paralelamente, se almacenó parte del cultivo no extraído de LB crecido de la colonia 4 con glicerol en freezer a -80°C en caso de necesitarse a futuro.

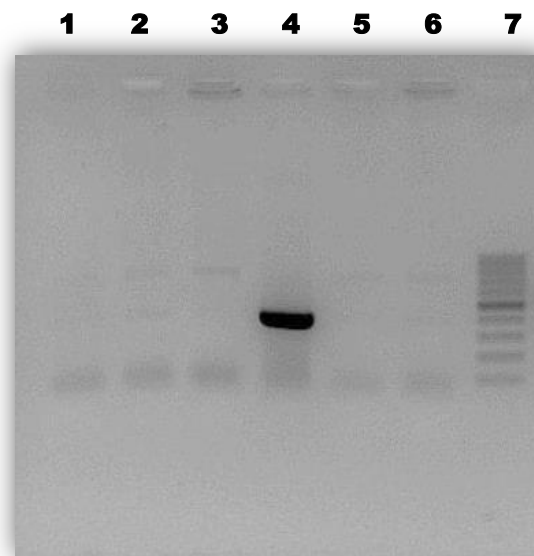


Figura 16. Verificación de inserto de 377 pb incorporado en vector de clonación.

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los rastreos por PCR realizados en seis colonias transformadas crecidas.

Carril 1: Colonia 1; Carril 2: Colonia 2; Carril 3: Colonia 3; Carril 4: Colonia 4; Carril 5: Colonia 5; Carril 6: Colonia 6; Carril 7: marcador de peso molecular 100 pb GeneRuler™ Plus DNA Ladder (Fermentas)®.

6. Discusión

A partir del descubrimiento de los marcadores para la detección del virus de la Hepatitis A (HAV) y de HBV en la década del 70, fue evidente la existencia de Hepatitis post-transfusionales causadas por otros agentes no identificados (Choo et al., 1989).

Los patógenos desconocidos se denominaron virus no A no B hasta que fue identificado el HCV en 1989 (Choo et al., 1989). Se encontró que este último era el responsable en la gran mayoría de los casos de Hepatitis en pacientes que habían recibido transfusiones sanguíneas (Alter et al., 1997). A pesar de esto, en aproximadamente el 5% de los mismos, no se ha podido identificar al agente etiológico (Kodali et al., 1994) y en la mayoría de los pacientes con Hepatitis fulminante y aguda, no se han detectado marcadores de Hepatitis virales (Wright., 1993). Asimismo, las Hepatitis de etiología desconocida pueden llegar a ser crónicas, las cuales se han clasificado como criptogénicas (Kodali et al., 1994).

Precisamente, hace poco menos de dos décadas que se descubrió a TTVH como el único nuevo agente viral humano presente en una infección con cuadro clínico de Hepatitis no A-G, relacionándolo a la misma, a HCV, HBV y a afecciones hepáticas con una alta prevalencia a nivel mundial (Charlton et al., 1998; Naumonov et al., 1998; Okamoto et al., 1998b; Poovorawan et al., 1998; Simmonds et al., 1998; Tanaka et al., 1998a; Fukuda et al., 1999; G-Barcons et al., 1999; Hsieh et al., 1999; Kanda et al., 1999; Kao et al., 1999; Nakano et al., 1999; Niel et al., 1999; Parquet et al., 1999; Schröter et al., 1999; Gad et al., 2000).

Ciertamente, estos sorprendentes valores de prevalencia en población no sana junto con el hecho de haberse detectado por primera vez en el país TTV Porcino, fueron los principales motivos que impulsaron la necesidad de estudiar los Anellovirus en mayor profundidad y conocer así su circulación en humanos en el país.

En el presente trabajo, se implementó por primera vez en Uruguay una metodología de detección molecular para TTVH, con el propósito de determinar su presencia y frecuencia de infección en una población de riesgo conformada por 85 sueros en total. De los cuales, como se describe en la ficha técnica de la Tabla 2, 13 pertenecen a pacientes con Hepatitis de etiología desconocida del Hospital Central de las Fuerzas Armadas y 72 se corresponden a pacientes infectados con HCV, HBV y/o HIV-1 provenientes del SEIC.

Fue necesario explorar diferentes protocolos de detección molecular basados en la amplificación por PCR, ya que coincidiendo con la elevada heterogeneidad genética del virus, las técnicas aplicadas carecían de reproducibilidad y efectividad, por lo que como hecho destacable, los resultados obtenidos representan un inconmensurable significado.

Finalmente, fue optimizada la técnica de Nested-PCR reportada por Okamoto et al. 1999b, la cual resultó ser la más adecuada para el desarrollo del screening de las muestras, debido a que permitió la amplificación de la región UTR A de 110 pb de manera exitosa y con resultados reproducibles. Los cebadores utilizados demostraron, como explica la bibliografía, ser capaces de amplificar la gran mayoría del espectro de variantes de TTVH pertenecientes a distintos genotipos y genogrupos, al basarse en la zona del genoma con mayor grado de conservación entre las cepas (Okamoto et al., 1999b). A su vez, la alta sensibilidad de este ensayo le confiere una ventaja adicional

frente a las técnicas de PCR convencional de un solo paso, puesto que estas son menos exitosas para detectar muestras con baja carga viral, dando como resultado falsos negativos.

La implementación de esta técnica permitió identificar la presencia de cepas de TTVH por primera vez en Uruguay, presentando una gran homología de secuencia nucleotídica (93%-99%) con las cepas depositadas en la base de datos, sumándose así a la lista creciente de países que han reportado su presencia.

Notablemente, fue observada una alta frecuencia de infección del 79 % (67/85) en el total de las muestras analizadas, lo cual coincide con los datos reportados previamente sobre la prevalencia de esta infección a nivel mundial en una población de riesgo (Nishizawa et al., 1997; Charlton et al., 1998; Tanaka et al., 1998a; Ikeda et al., 1999; Kanda et al., 1999; Okamura et al., 2000).

En relación al potencial patogénico de TTVH, particularmente este virus reviste especial importancia desde el punto de vista epidemiológico en los cuadros clínicos de Hepatitis desconocidas aguda, crónica y fulminante (Nishizawa et al., 1997; Charlton et al., 1998; Tanaka et al., 1998a), ya que la imposibilidad de relacionar un agente etiológico específico como causa de estas patologías y al ser el único presente en estos casos, desde un principio se lo ha llevado a juzgar como el culpable. Paralelamente, considerando las enfermedades producidas por virus en general, estas pueden ocurrir por una variedad de mecanismos, directamente por destrucción celular, o por inducción de alteraciones genéticas o celulares, e indirectamente interfiriendo con el sistema inmune, como puede llegar a ser este último, el caso de los Anellovirus Jelcic et al., 2004; Umemura et al., 2002b). Asimismo, incluso se ha llegado a considerar que TTVH podría ser un patógeno oportunista, desarrollándose la enfermedad solo bajo ciertas condiciones, dónde por ejemplo, la carga viral puede ser un factor crítico ante la aparición de la sintomatología (Christensen et al., 2000; Sagir et al., 2005b; Thom et al., 2007). Por otro lado, se ha planteado que es posible que solo algunos genotipos de TTVH sean patogénicos, como sucede con PCV y HPV (Calcaterra et al., 2001).

Con respecto a los resultados obtenidos de frecuencia de infección de TTVH para cada enfermedad, se observó, que del total de muestras que resultaron infectadas con TTVH, el 24% corresponden a casos con Hepatitis de etiología desconocida. Cabe destacar a su vez, que se detectó TTVH en todas las muestras de Hepatitis de etiología desconocida disponibles, correlacionándose con otras investigaciones realizadas (Artini et al., 2002; Savas et al., 2003).

Es importante destacar además, que entre los pacientes presentando Hepatitis aguda se encuentran niños, coincidiendo con lo exhibido en la literatura, dónde se plantea la adquisición de la enfermedad a una temprana edad y se caracteriza por producir viremias crónicas en la mayoría de los casos (Saback et al., 1999; Gerner et al., 2000; Morrica et al., 2000; Matsubara et al., 2001; Bagaglio et al., 2002).

Interesantemente, también se observó que un 24% del total de TTVH positivos correspondían a individuos que solo estaban infectados con HCV, un índice menor según lo divulgado por distintos investigadores (Hussain et al., 2012).

En contraposición, se detectó que un 13% del total de positivos eran pacientes que presentaban infección con HBV. Asimismo, el total de los individuos padeciendo esta enfermedad resultaron estar también infectados con TTVH. Si bien los datos existentes en la región son escasos, se ha analizado solamente en Brasil, reportándose un 54% de infección con TTVH para portadores de HBV exclusivamente (Devalle y Niel., 2004).

Mundialmente, se han realizado un amplio número de estudios con virus de Hepatitis, preferentemente HBV y HCV, en donde se ha planteado la influencia de TTVH como co-factor y/o marcador patogénico en la progresión de estas enfermedades a hepatocarcinoma (Tokita et al., 2002).

Conjuntamente, se detectó que un 4% de individuos con TTVH son pacientes con HIV-1, un valor significativamente menor en comparación a lo expuesto por otros autores (Devalle y Niel., 2004; Niel et al., 2005).

En última instancia, se evaluaron pacientes infectados con TTVH que presentaban distintas combinaciones de co-infecciones con HBV, HCV y/o HIV-1 (17% para HIV-1/HBV, 14% para HCV/HIV-1, 2% para HCV/HBV y 2% para HBV/HCV/HIV-1). No existen antecedentes en la literatura que describan el análisis de TTVH en infecciones con múltiples virus presentes, de todas formas las frecuencias observadas fueron bajas y el número de pacientes dentro de cada uno de los subgrupos analizados fue acotado, no pudiéndose emitir un juicio concreto al respecto.

En conclusión, en base a los resultados obtenidos, se observó el mismo porcentaje de positivos para los individuos que presentan Hepatitis aguda de etiología desconocida y para aquellos con HCV. Justamente, esto reafirma la dicotomía existente sobre la patogenicidad de este virus, donde se ha propuesto en múltiples ocasiones que puede actuar tanto como causante de la enfermedad así como co-factor dificultando los cuadros clínicos existentes (Bendinelli et al., 2001).

Por otro lado, cabe resaltar, que el hallazgo de este virus en el país no sólo significa contribuir al conocimiento de su epidemiología molecular sino que también representa una importancia adicional al tratarse de una virosis emergente.

Las virosis emergentes y re-emergentes son aquellas infecciones que no habían sido reportadas previamente en una población o que han existido pero están incrementando rápidamente en incidencia o rango geográfico (Satcher, 1995). El reconocimiento de un virus emergente puede ocurrir porque la enfermedad está presente en cierta población por primera vez, porque ha sido detectada por primera vez en la historia o debido a que los vínculos entre un agente viral y una enfermedad crónica han sido recientemente identificados, como se ha planteado ser el caso de TTVH con los cuadros clínicos de Hepatitis (Morse et al., 1996). La vasta mayoría de las infecciones son causadas por patógenos previamente presentes en el ambiente, a los cuales se les ha proporcionado una selección ventajosa por medio de cambios en el entorno y brindando así una oportunidad de infectar nuevos hospederos. Estas modificaciones incluyen: alteraciones ecológicas, como la debida a la actividad humana o anomalías climáticas, cambios demográficos, desplazamiento poblacional a través de viajes y comercio, industria y tecnología, adaptación microbiana y/o carencia de medidas sanitarias adecuadas (Morse et al., 1996). Tal es así que virus que han co-existido y co-evolucionado con nosotros y animales por millones de años pero sin ser detectados hasta ahora, como los Anellovirus, han emergido (Thom et al., 2003).

Precisamente, se ha presentado evidencia respaldando esta afirmación, que proviene del estudio de las secuencias de TTVH y TTMV identificadas en primates no-humanos, donde estos forman sus propios clusters de secuencia, con creciente divergencia hacia cepas humanas, sugiriendo por lo tanto co-evolución y co-especificación dentro de sus respectivas especies (Thom et al., 2003). Dicha co-evolución a largo plazo entre virus-hospedador, podría ser la clave para el entendimiento de la existencia de los numerosos genotipos de TTVH y su marcada variabilidad genética.

Acorde a lo expuesto, debido a que nos encontramos frente a un virus mayormente desconocido y muy ubicuo, con una gran heterogeneidad genética, nos propusimos indagar acerca de su variabilidad y distribución entre los genogrupos existentes. Precisamente, para ello se enfatizó en la caracterización genética de las cepas para contribuir a expandir su conocimiento en dicho aspecto, investigando por ejemplo, si existe un genogrupo predominante en la región o presencia de co-infección.

Justamente, con el objetivo de realizar un estudio filogenético de las cepas, se llevó a cabo una Seminested-PCR (Okamoto et al., 1999b) para la región UTR B con mayor variabilidad que produce un amplicón de 377 pb. Se obtuvo por esta técnica un 63% (42/67) de amplificación. Sin embargo, solamente fue posible llevar a cabo los análisis de secuencia y estudios filogenéticos de 20 cepas, ya que los demás amplicones luego de secuenciados presentaron al parecer co-infección con diversas cepas de TTVH (Anexo II), esto fue inferido debido a la existencia de dobles picos superpuestos a lo largo de los cromatogramas obtenidos.

Ciertamente, se ha reportado que la co-infección con diversos genotipos o genogrupos en un mismo individuo es muy usual entre los Anellovirus (Ball et al., 1999; Biagini et al., 1999; Chan et al., 2001a; Forns et al., 1999; Gallian et al., 1999; Mushahwar et al., 1999; Prescott et al., 1999; Okamoto et al., 1999b; Takayama et al., 1999b; Niel et al., 2000; Jelcic et al., 2004).

A continuación, se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético, por el método de Máxima Verosimilitud, con las secuencias que pudieron ser efectivamente analizadas.

En el árbol, se observaron dos agrupamientos para las cepas uruguayas en clusters bien definidos que no pertenecen a ningún genogrupo conocido, incluyéndose entre ellos la cepa TTVH FA2 proveniente de un paciente con Hepatitis aguda de etiología desconocida.

Estos dos clusters estrechamente vinculados sugieren la posible existencia de nuevos grupos filogenéticos, como lo planteaban Devalle y Niel. (2004) por los resultados de su propia investigación. Esta hipótesis solamente podrá ser confirmada mediante secuenciación nucleotídica de los genomas completos.

Por otro lado, tres muestras (TTVH 36, TTVH 49 y TTVH 61) se clasificaron en el grupo 2 junto a aislados alemanes.

Asimismo, se realizó una matriz de identidad para las 20 cepas de 377 pb y para una secuencia de referencia de cada genogrupo, a modo de analizar cuantitativamente el grado de variabilidad nucleotídica.

Notablemente, si bien la mayoría de las cepas uruguayas presentan una similaridad considerable, existen algunas con una discrepancia de hasta un 70%, siendo coherente con la alta tasa de variabilidad del virus.

Al mismo tiempo, al analizarse la identidad nucleotídica entre solamente las cepas de referencia, se observó que estas poseen un amplio rango de homogeneidad desde el 30,5% al 94,0%, reafirmando el hecho de que cada genogrupo es marcadamente distinto.

Coincidentemente, se observó una mayor similitud por parte de las secuencias hacia los grupos 1 y 3 y una gran divergencia hacia los grupos 4 y 5, lo cual se corresponde con lo presentado en el árbol filogenético, donde los agrupamientos se encuentran más cercanos evolutivamente hacia los genogrupos 1, 2 y 3.

Por último, se efectuó la clonación de un fragmento seleccionado de la PCR de caracterización para contar con un stock de control positivo en el país.

Paralelamente, intentos previos en desarrollar métodos para genotipificar, basados en polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y PCR con cebadores tipo-específicos, han fracasado (Devalle y Niel., 2004). Precisamente, los intentos de poner a punto una Multiplex PCR en el presente trabajo para clasificar las cepas simultáneamente no fue exitoso, al igual que la intención de amplificar la región codificante N22, posiblemente debido a la heterogeneidad nucleotídica.

Actualmente, la comunidad científica ha reconocido que es un fin más realista y factible el caracterizar las cepas en los cinco genogrupos principales en lugar de los numerosos genotipos (Devalle y Niel., 2004).

Dado lo expuesto, se deja en evidencia la importancia de profundizar en más investigaciones sobre la presencia del virus en estas poblaciones de estudio y en nuevas, en orden de elucidar en un futuro su potencial patogénico, pudiendo también implementarse su diagnóstico clínico nacional ante los relevantes resultados presentados en esta tesina.

A pesar del avance logrado hasta ahora, las investigaciones dedicadas al estudio de las infecciones con TTVH permanecen aún bastante primitivas por diversas razones, entre ellas, no se ha descrito todavía un sistema de cultivo eficiente que pueda ser utilizado para su aislamiento viral *in vitro*, las respuestas inmunes producidas por este virus son pobremente entendidas y en particular no hay métodos serológicos sencillos para utilizar (Bendinelli et al., 2001).

Innegablemente, un hecho es seguro, la asombrosa alta prevalencia mundial es inquietante, dónde TTVH parece haber alcanzado la euforia de la vida viral: aparente replicación y transmisión sin límites.

7. CONCLUSIONES

- ◆ Se generó y aplicó por primera vez en Uruguay un sistema de detección para TTVH en suero de 85 pacientes infectados con HBV, HCV y/o HIV-1 y con Hepatitis de etiología desconocida, basado en la amplificación de un fragmento conservado de la UTR.
- ◆ ADN viral perteneciente a cepas de TTVH fue detectado con una frecuencia de infección total del 79%.
- ◆ La frecuencia de co-infección de TTVH con los virus analizados fue de:
 - 24%- Hepatitis no A - G
 - 24%- HCV
 - 17%- HIV-1/HBV
 - 14%- HCV/HIV-1
 - 13%- HBV
 - 4%- HIV-1
 - 2%- HCV/HBV
 - 2%- HBV/HCV/HIV-1
- ◆ Se desarrolló un ensayo molecular en las muestras positivas para evaluar la variabilidad genética de los aislados circulantes.
- ◆ La validez de la metodología empleada quedó confirmada ya que se obtuvo un 63% de amplificación para la región con mayor heterogeneidad de la UTR.
- ◆ Se establecieron relaciones filogenéticas entre las cepas de TTVH detectadas y las reportadas por otros países mediante la construcción de un árbol filogenético.
- ◆ Se observó que tres cepas nacionales forman parte del grupo 2, mientras que las demás muestras uruguayas formaron dos agrupamientos no pertenecientes a ningún genogrupo, planteando la probable existencia de otros grupos desconocidos, que podrán ser confirmados solamente por análisis de genomas completos.
- ◆ A través del análisis de matriz de identidad, se observó un rango de similitud entre las cepas nacionales desde 27,0% a 99,3%.
- ◆ Por último, se almacenó un stock de control positivo, obtenido a través de clonación de una cepa nacional.

8. PERSPECTIVAS

Al tratarse de un estudio realizado por primera vez en Uruguay sobre los Anellovirus humanos y debido a la escasa información en todos los aspectos sobre este virus, los resultados presentados en esta tesina abren la posibilidad de un amplio campo de investigación al respecto.

- ◆ En primer lugar, se continuará poniendo a punto una técnica de PCR para amplificar la región N22 de ORF1 y a futuro, será necesario diseñar estrategias de amplificación para otras regiones del genoma como por ejemplo la proteína de cápside. Además, será importante realizar las clonaciones para los fragmentos de caracterización que presentaron co-infección.
- ◆ Subsiguientemente, para lograr un conocimiento más sólido de la variabilidad del virus y su distribución entre los cinco genogrupos existentes de cepas reportadas de otros países, se deberá obtener los genomas completos. Parte de este trabajo ya ha sido iniciado, ya que mediante el método de amplificación por círculo rodante con random primers y ADN polimerasa phi 29, se logró obtener un fragmento del tamaño esperado pero no ha sido posible clonarlo para su secuenciación hasta el momento.
- ◆ Eventualmente, se debería incluir y optimizar una Real Time PCR (qPCR) que permita cuantificación de la carga viral de TTVH en suero, pudiendo también realizarse diluciones seriadas para evaluar la sensibilidad de la técnica.
- ◆ Efectuar transfecciones de distintos clones de genoma completo en líneas celulares anteriormente probadas como Huh7 y HEK 293 para realizar expresiones de las proteínas virales, con el propósito de evaluar el número de proteínas producidas así como su localización subcelular por inmunofluorescencia.
- ◆ Conjuntamente, para adquirir un mejor entendimiento sobre las características epidemiológicas de TTVH, ya una vez identificados en una población de riesgo, se podría evaluar la presencia del mismo en donantes de sangre sanos y así comparar los índices de frecuencia de infección.
- ◆ Asimismo, a modo de profundizar el conocimiento sobre los Anellovirus humanos en general, se podrían enfocar los mismos análisis sobre TTMV y TTMDV.

9. REFERENCIAS

- Abe K, Inami T, Asano K, Miyoshi C, Masaki N, Hayashi S, Ishikawa K, Takebe Y, Win KM, El-Zayadi AR, Han KH, Zhang DY. TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. *J.Clin.Microbiol.* 1999 Aug;37(8):2703-2705.
- Abe K, Inami T, Ishikawa K, Nakamura S, Goto S. TT virus infection in nonhuman primates and characterization of the viral genome: identification of simian TT virus isolates. *J.Virol.* 2000 Feb;74(3):1549-1553.
- Akahane Y, Sakamoto M, Miyazaki Y, Okada S, Inoue T, Ukita M, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Effect of interferon on a nonenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic hepatitis of unknown etiology. *J.Med.Virol.* 1999 Jul;58(3):196-200.
- Ali S, Fevery J, Peerlinck K, Verslype C, Schelstraete R, Gyselinck F, Emonds MP, Vermeylen J, Yap SH. TTV infection and its relation to serum transaminases in apparently healthy blood donors and in patients with clotting disorders who have been investigated previously for hepatitis C virus and GBV-C/HGV infection in Belgium. *J.Med.Virol.* 2002 Apr;66(4):561-566.
- Ambrose HE, Clewley JP. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev.Med.Virol.* 2006 Nov-Dec;16(6):365-383.
- Artini M, Cariani E, Almerighi C, Fulco M, Rossini A, Pietropaolo L, Stivali G, Montalto G, Caratozzolo M, Girelli G, Grimali E, Costanzo A, Levrero M, Balsano C. Prevalence and genomic variability of transfusion transmitted virus in Italian cryptogenic chronic liver disease and healthy blood donors. *Dig Liver Dis.* 2002 Aug;34(8):570-6.
- Bagaglio S, Sitia G, Prati D, Cella D, Hasson H, Novati R, Lazzarin A, Morsica G. Mother-to-child transmission of TT virus: sequence analysis of non-coding region of TT virus in infected mother-infant pairs. *Arch.Virol.* 2002 Apr;147(4):803-812.
- Ball JK, Curran R, Berridge S, Grabowska AM, Jameson CL, Thomson BJ, Irving WL, Sharp PM. TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J.Gen.Virol.* 1999 Jul;80(Pt 7):1759-1768
- Bandinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin.Microbiol.Rev.* 2001 Jan;14(1):98-113.
- Biagini P, Gallian P, Attoui H, Cantaloube JF, de Micco P, de Lamballerie X. Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. *J.Gen.Virol.* 1999 Feb;80(Pt 2):419-424.
- Biagini P, Gallian P, Attoui H, Touinssi M, Cantaloube J, de Micco P, de Lamballerie X. Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. *J.Gen.Virol.* 2001b Feb;82(Pt 2):379-383.

- Biagini P, Todd D, Bendinelli M, Hino S, Mankertz A, Mishiro S, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Ritchie BW, Teo GC. Anellovirus in virus taxonomy. In Eight report of the international committee on taxonomy of viruses. Eds. Fauquet CM Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. London, United Kingdom:Elsevier/Academic Press., 2004 May, 335-341.
- Biagini P, de Micco P, de Lamballerie X. Identification of a third member of the Anellovirus genus ("small anellovirus") in French blood donors. *Arch.Virol.* 2006a Feb;151(2):405-408.
- Biagini P, Gallian P, Cantaloube JF, Attoui H, de Micco P, de Lamballerie X. Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. *J.Med.Virol.* 2006b Feb;78(2):298-304.
- Biagini P, Uch R, Belhouchet M, Attoui H, Cantaloube JF, Brisbarre N, de Micco P. Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach. *J.Gen.Virol.* 2007 Oct;88(Pt10):2696-2701.
- Brock T, Madigan M, Martinko J, Parker J. *Biology of Microorganisms* 10^a Edición. Pearson –Prentice Hall. 2004. pp 515-517.
- Calcaterra S, Zaniratti MS, Serraino D, Peroni M, Abbate I, Cappiello G, Piselli P, Pavia C, Rezza G, Ippolito G, Capobianchi MR. Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. *J.Hum.Virol.* 2001 Nov-Dec;4(6):343-345.
- Chan PK, Chik KW, Li CK, Tang NL, Ming MS, Cheung JL, Ng K.C, Yuen PM, Cheng AF. Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. *J.Viral Hepat.* 2001a Jul;8(4):304-309.
- Chan PK, Tam WH, Yeo W, Cheung JL, Zhong S, Cheng AF. High carriage rate of TT virus in the cervixes of pregnant women. *Clin.Infect.Dis.* 2001c May 1;32(9):1376-1377.
- Charlton M, Adjei P, Poterucha J, Zein N, Moore B, Therneau T, Krom R, Wiesner R. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 1998 Sep;28(3):839-842.
- Chayama K, Kobayashi M, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Suzuki Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Okamoto K, Hashimoto M, Matsuda M, Koike H, Kobayashi M, Kumada H. Susceptibility of TT virus to interferon therapy. *J.Gen.Virol.* 1999 Mar;80(Pt 3):631-634.
- Cheng J, Hada T, Liu W, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Amuro Y, Kubota A, Higashino K. Investigation of TTV by in situ hybridization in patients with chronic hepatitis. *Hepatol.Res.* 2000 Jul;18(1):43-53.
- Christensen JK, Eugen-Olsen J, SLrensen M, Ullum H, Gjedde SB, Pedersen BK, Nielsen JO, Krogsgaard K. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J.Infect.Dis.* 2000 May;181(5):1796-1799.

- Chung JY, Han TH, Koo JW, Kim SW, Seo JK, Hwang ES. Small anellovirus infections in Korean children. *Emerg.Infect.Dis.* 2007;13(5):791-792.
- Cong ME, Nichols B, Dou XG, Spelbring JE, Krawczynski K, Fields HA, Khudyakov YE. Related TT viruses in chimpanzees. *Virology* 2000 Sep 1;274(2):343-355.
- de Villiers EM, Schmidt R, Delius H, zur Hausen H. Heterogeneity of TT virus related sequences isolated from human tumour biopsy specimens. *J.Mol.Med.* 2002 Jan;80(1):44-50.
- Deng X, Terunuma H, Handema R, Sakamoto M, Kitamura T, Ito M, Akahane Y. Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J.Med.Virol.* 2000 Dec;62(4):531-537.
- Devalle S, Niel C. Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. *J.Med.Virol.* 2004 Jan;72(1):166-173.
- Erensoy S, Sayiner AA, Turkoglu S, Canatan D, Akarca US, Sertoz R, Ozacar T, Batur Y, Badur S, Bilgic A. TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection* 2002 Oct;30(5):299-302.
- Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML, Mushahwar IK. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J.Gen.Virol.* 1999 Jul;80(Pt 7):1743-1750.
- Flint, S. J. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses.* 2^{da} Edición. Washington, DC, American Society for Microbiology Press. 2004. pp 782-800.
- Fornai C, Maggi F, Vatteroni ML, Pistello M, Bendinelli M. High prevalence of TT virus (TTV) and TTVlike minivirus in cervical swabs. *J.Clin.Microbiol.* 2001 May;39(5):2022-2024.
- Forns X, Hegerich P, Darnell A, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *J.Med.Virol.* 1999 Nov;59(3):313-317.
- Fukuda Y, Nakano Y, Katano Y, et al. TT virus (TTV) is not associated with acute sporadic hepatitis. *Infection* 1999; 27: 125-7.
- Gad A, Tanaka E, Orii K, Kafumi T, Serwah AEH, ElSherif A. Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic liver disease and volunteer blood donors in Egypt. *J Med Virol* 2000; 60: 177-81.
- Gallian P, Berland Y, Olmer M, Raccach D, de Micco P, Biagini P, Simon S, Bouchouareb D, Mourey C, Roubicek C, Touinssi M, Cantaloube JF, Dussol B, de Lamballeri X. TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J.Clin.Microbiol.* 1999 Aug;37(8):2538-2542.
- Gallian P, Biagini P, Zhong S, Touinssi M, Yeo W, Cantaloube JF, Attoui H, de Micco P, Johnson PJ, de Lamballerie X. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J.Clin.Virol.* 2000 Jun;17(1):43-49.

- Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, Pignoloni P, Pulsoni A, Sourdis J, Pescarmona E, Vitolo D, Mandelli F. Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection. *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* 2003 May-Aug;16(2):109-118.
- Gergely P, Jr, Blazsek A, Danko K, Ponyi A, Poor G. Detection of TT virus in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2005a Jun;1050:304-313.
- Gerner P, Oettinger R, Gerner W, Falbrede J, Wirth S. Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 2000 Nov;19(11):1074-1077.
- Giménez-Barcons M, Forns X, Ampurdanés S, et al. Infection with a novel human DNA virus (TTV) has no pathogenic significance in patients with liver diseases. *J Hepatol* 1999; 30: 1028-34.
- Hallett RL, Clewley JP, Bobet F, McKiernan PJ, Teo CG. Characterization of a highly divergent TT virus genome. *J.Gen.Virol.* 2000 Sep;81(Pt 9):2273-2279.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Yamashita H, Nakajima E, Ohgaki S. One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in wastewater treatment plants in Japan. *Water Res.* 2005b May;39(10):2008-2013.
- Heller F, Zachoval R, Koelzer A, Nitschko H, Froesner GG. Isolate KAV: a new genotype of the TT-virus family. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001 Dec 21;289(5):937-941.
- Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 1999b Jul 20;260(1):17-22.
- Hino S, Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev.Med.Virol.* 2007 Jan-Feb;17(1):45-57.
- Hirata D, Kaneko N, Iwamoto M, Yoshio T, Okazaki H, Mimori A, Masuyama J, Minota S. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with non-A to G hepatitis in patients with rheumatoid arthritis. *Br.J.Rheumatol.* 1998 Dec;37(12):1361-1362.
- Hsieh SY, Wu YH, Ho YP, Tsao KC, Yeh CT, Liaw YF. High prevalence of TT virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan. *J.Clin.Microbiol.* 1999 Jun;37(6):1829-1831.
- Huang LY, Oystein Jonassen T, Hungnes O, Grinde B. High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in Norwegian blood donors. *J.Med.Virol.* 2001 Jul;64(3):381-386.
- Hussain T, Manzoor S, Waheed Y, Tariq H, Hanif K. Phylogenetic analysis of torque teno virus genome from Pakistani isolate and incidence of co-infection among HBV/HCV infected patients. *Virology J.* 2012 Dec 28;9:320.

- Ikedo H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J.Hepatol.* 1999 Feb;30(2):205-212.
- Inami T, Konomi N, Arakawa Y, Abe K. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J.Clin.Microbiol.* 2000a Jun;38(6):2407-2408.
- Inami T, Obara T, Moriyama M, Arakawa Y, Abe K. Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: evidence for a new TT virus-like species. *Virology* 2000b Nov 25;277(2):330-335.
- Ishikawa T, Hamano Y, Okamoto H. Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. *Infection* 1999;27(4-5):298.
- Iso K, Suzuki Y, Takayama M. Mother-to-infant transmission of TT virus in Japan. *Int.J.Gynaecol.Obstet.* 2001 Oct;75(1):11-19.
- Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, Tanaka T, Nishizawa T, Okamoto H. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000 Dec 20;279(2):718-724
- Jelcic I, Hotz-Wagenblatt A, Hunziker A, Zur Hausen H, de Villiers EM. Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J.Virol.* 2004 Jul;78(14):7498-7507.
- Jiang XJ, Luo KX, He HT. Intrahepatic transfusion-transmitted virus detected by in situ hybridization in patients with liver diseases. *J.Viral Hepat.* 2000 Jul;7(4):292-296.
- Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J.Virol.* 2005 Jul;79(13):8230-8236.
- Kakkola L, Bondén H, Hedman L, Kivi N, Moisala S, Julin J, Ylä-Liedenpohja J, Miettinen S, Kantola K, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Expression of all six human Torque teno virus (TTV) proteins in bacteria and in insect cells, and analysis of their IgG responses. *Virology.* 2008 Oct;382:182–189.
- Kamada K, Kamahora T, Kabat P, Hino S. Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* 2004 Apr 10;321(2):341-348.
- Kamahora T, Hino S, Miyata H. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J.Virol.* 2000 Nov;74(21):9980-9986.
- Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K, Yuji K, Ogawa S, Honda H, Mitani K, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood* 1999 Apr 15;93(8):2485-2490.

- Kao JH, Chen W, Hsiang SC, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Prevalence and implication of TT virus infection: minimal role in patients with non-A-E hepatitis in Taiwan. *J Med Virol* 1999; 59: 307-12.
- Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. SEN virus infection in patients with chronic hepatitis C: preferential coinfection with hepatitis C genotype 2a and no effect on response to therapy with interferon plus ribavirin. *J.Infect.Dis.* 2003 Jan 15;187(2):307-310.
- Kekarainen T, Sibila M, Segales J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J.Gen.Virol.* 2006 Apr;87(Pt4):833-837.
- Khudyakov YE, Cong ME, Nichols B, Reed D, Dou XG, Viazov SO, Chang J, Fried MW, Williams I, Bower W, Lambert S, Purdy M, Roggendorf M, Fields HA. Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses. *J.Virol.* 2000 Apr;74(7):2990-3000.
- Kincaid RP, Burke JM, Cox JC, de Villiers EM, Sullivan CS. A human Torque Teno virus encodes a microRNA that inhibits interferon signaling. *PLoS Pathog.* 2013 Dec;9(12).
- Leppik L, Gunst K, Lehtinen M, Dillner J, Streker K, de Villiers EM. In Vivo and in Vitro Intragenomic Rearrangement of TT Viruses. *J.Virol.* 2007 Sep;81(17):9346-56.
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993 Feb 12;259(5097):946-951.
- Lopez-Alcorocho JM, Mariscal LF, de Lucas S, Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Castillo I, Bartolome J, Herrero M, Manzano ML, Pardo M, Carreno V. Presence of TTV DNA in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis. *J.Viral Hepat.* 2000 Nov;7(6):440-447.
- Luo K, He H, Liu Z, Liu D, Xiao H, Jiang X, Liang W, Zhang L. Novel variants related to TT virus distributed widely in China. *J.Med.Virol.* 2002 May;67(1):118-126.
- MacDonald DM, Scott GR, Clutterbuck D, Simmonds P. Infrequent detection of TT virus infection in intravenous drug users, prostitutes, and homosexual men. *J.Infect.Dis.* 1999 Mar;179(3):686-689.
- Madsen CD, Eugen-Olsen J, Kirk O, Parner J, Kaae Christensen J, Brasholt MS, Ole Nielsen J, Krogsgaard K. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV.Clin.Trials* 2002 Jul-Aug;3(4):287-295.
- Maeda M, Hamada H, Tsuda A, Kaneko K, Fukunaga Y. High rate of TTV infection in multitransfused patients with pediatric malignancy and hematological disorders. *Am.J.Hematol.* 2000 Sep;65(1):41-44.
- Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Siciliano G, Menichetti F, Tascini C, Specter S, Pistello M, Bendinelli M. Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *J.Med.Virol.* 2001a Oct;65(2):418-422.

- Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, Marchi S, Ricchiuti A, Pistello M, Bendinelli M. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J.Med.Virol.* 2001b Jun;64(2):190-194.
- Maggi F, Pistello M, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Isola P, Fornai C, Fagnani S, Andreoli E, Antonelli G, Bendinelli M. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J.Virol.* 2001c Dec;75(24):11999-12004.
- Maggi F, Marchi S, Fornai C, Tempestini E, Andreoli E, Lanini L, Vatteroni ML, Bellini M, De Bortoli N, Costa F, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Relationship of TT virus and *Helicobacter pylori* infections in gastric tissues of patients with gastritis. *J.Med.Virol.* 2003a Sep;71(1):160-165.
- Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J.Virol.* 2003b Feb;77(4):2418-2425.
- Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Fornai C, Vatteroni M, Pistello M, Presciuttini S, Bendinelli M. Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *J.Clin.Microbiol.* 2005a Sep;43(9):4807-4810.
- Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Meschi S, Rocchi J, Fornai C, Vatteroni ML, Pistello M, Bendinelli M. Rapid increase in total torquetenovirus (TTV) plasma viremia load reveals an apparently transient superinfection by a TTV of a novel group 2 genotype. *J.Clin.Microbiol.* 2006 Jul;44(7):2571-2574.
- Mariscal LF, Lopez-Alcorocho JM, Rodriguez-Inigo E, Ortiz-Movilla N, de Lucas S, Bartolome J, Carreno V. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 2002 Sep 15;301(1):121-129.
- Martinez NM, Garcia F, Garcia F, Alvarez M, Bernal MC, Piedrola G, Hernandez J, Maroto MC. TT virus DNA in serum, peripheral blood mononuclear cells and semen of patients infected by HIV. *AIDS* 2000 Jul 7;14(10):1464-1466.
- Massaú A, Martins C, Nachtigal GC, Araújo AB, Rossetti ML, Niel C, da Silva CM. The high prevalence of Torque Teno virus DNA in blood donors and haemodialysis patients in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Aug;107(5):684-6.
- Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Kihana T, Yano M, Mori T, Onji M. Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatol.Res.* 2001 Nov;21(3):280-287.
- Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Yano M, Akbar SM, Torisu M, Onji M. Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology* 2000;43(1):16-19.
- Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J.Virol.* 1999 May;73(5):3582-3586.

- Moen EM, Huang L, Grinde B. Molecular epidemiology of TTV-like mini virus in Norway. *Arch.Virol.* 2002a;147(1):181-185.
- Morrice A, Maggi F, Vatteroni ML, Fornai C, Pistello M, Ciccorossi P, Grassi E, Gennazzani A, Bendinelli M. TT virus: evidence for transplacental transmission. *J.Infect.Dis.* 2000 Feb;181(2):803-804.
- Morse S S. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases.* 1996;1(1): 7-15.
- Mueller B, Maerz A, Doberstein K, Finsterbusch T, Mankertz A. Gene expression of the human Torque Teno Virus isolate P/1C1. *Virology.* 2008 Nov 10;381(1):36-45.
- Muljono DH, Nishizawa T, Tsuda F, Takahashi M, Okamoto H. Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Arch.Virol.* 2001 Jul;146(7):1249-1266.
- Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Desai SM. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999 Mar 16;96(6):3177-3182.
- Nakano T, Park Y, Mizokami M, et al. TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Korea. *J Hepatol* 1999; 30: 389-93.
- Nasser TF, Brajão de Oliveira K, Reiche EM, Amarante MK, Pelegrinelli Fungaro MH, Watanabe MA. Detection of TT virus in HIV-1 exposed but uninfected individuals and in HIV-1 infected patients and its influence on CD4+ lymphocytes and viral load. *Microbial Pathogenesis.* 2009 Jul;47(1):33-7.
- Naumonov N, Petrova EP, Thomas MG, Williams R. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 1998; 352: 195-7.
- Niel C, Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M, Viazov S. High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol* 1999; 57: 259-63.
- Niel C, Saback FL, Lampe E. Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J.Clin.Microbiol.* 2000 May;38(5):1926-1930.
- Niel C, Lampe E. High detection rates of TTV-like mini virus sequences in sera from Brazilian blood donors. *J.Med.Virol.* 2001 Sep;65(1):199-205.
- Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, Lorenzo FR, Shimosegawa T, Okamoto H. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J.Gen.Virol.* 2007a Jul;88(Pt 7):1939-1944.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1997 Dec 8;241(1):92-97.

- Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T, Sugai Y, Konishi K, Akahane Y, Ukita M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J.Virol.* 1999 Nov;73(11):9604-9608.
- Ohto H, Ujiie N, Takeuchi C, Sato A, Hayashi A, Ishiko H, Nishizawa T, Okamoto H, Vertical Transmission of Hepatitis Viruses Collaborative Study Group. TT virus infection during childhood. *Transfusion* 2002 Jul;42(7):892-898.
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J.Med.Virol.* 1998a Oct;56(2):128-132.
- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol.Res.* 1998b;10(1):1-16.
- Okamoto H, Kato N, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J.Med.Virol.* 1999a Mar;57(3):252-258.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 1999b Jul 5;259(2):428-436.
- Okamoto H, Fukuda M, Tawara A, Nishizawa T, Itoh Y, Hayasaka I, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Species-specific TT viruses and cross-species infection in nonhuman primates. *J.Virol.* 2000a Feb;74(3):1132-1139.
- Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Peng Y, Takahashi M, Kishimoto J, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. *Virology* 2000b Nov 25;277(2):368-378.
- Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J.Virol.* 2000d Nov;74(21):10236-10239.
- Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F, Yoshikawa A. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* 2001a Sep 30;288(2):358-368.
- Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Tawara A, Peng Y, Kishimoto J, Wang Y. Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. *J.Gen.Virol.* 2001b Sep;82(Pt 9):2041-2050.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, Naito Y, Yoshikawa A. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J.Gen.Virol.* 2002 Jun;83(Pt 6):1291-1297.

- Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X, Hayashi A, Ishiko H, Kobayashi K. Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J.Med.Virol.* 2000 Sep;62(1):104-108.
- Okamura A, Yoshioka M, Kubota M, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K. Detection of a novel DNA virus (TTV) sequence in peripheral blood mononuclear cells. *J.Med.Virol.* 1999 Jun;58(2):174-177.
- Osiowy C, Sauder C. Detection of TT virus in human hair and skin. *Hepatol.Res.* 2000;16(2):155-162.
- Parquet MD, Yatsushashi H, Koga M, et al. Prevalence and clinical characteristics of TT virus (TTV) in patients with sporadic acute hepatitis of unknown etiology. *J Hepatol* 1999; 31: 985-9.
- Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch.Virol.* 2002;147(1):21-41.
- Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, Browning GF. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J.Biol.Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39566-39573.
- Piaggio F, Dodi F, Bottino G, Andorno E, Gentile R, Ferrari C, Barabino G, Giannone A, Immordino G, Miggino M, Magoni Rossi A, Moraglia E, Gasloli G, Gelli M, Ferrante R, Morelli N, Casaccia M, Valente U. Torque Teno Virus--cause of viral liver disease following liver transplantation: a case report. *Transplant Proc.* 2009 May;41(4):1378-9.
- Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Marco ED, Fornai C, Vatteroni ML, Pistello M, Ragazzo V, Macchia P, Boner A, Bendinelli M. Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *J.Infect.Dis.* 2005 Oct 1;192(7):1141-1148.
- Pollicino T, Raffa G, Squadrito G, Costantino L, Cacciola I, Brancatelli S, Alafaci C, Florio MG, Raimondo G. TT virus has a ubiquitous diffusion in human body tissues: analyses of paired serum and tissue samples. *J.Viral Hepat.* 2003 Mar;10(2):95-102.
- Poovorawan Y, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Kaew-in N, Hirsch P, Tangkitvanich P. Hepatitis TT virus infection in high-risk groups. *Infection* 1998; 26:355-8.
- Prati D, Lin YH, De Mattei C, Liu JK, Farma E, Ramaswamy L, Zanella A, Lee H, Rebullia P, Allain JP, Sirchia G, Chen B. A prospective study on TT virus infection in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia. *Blood* 1999 Mar 1;93(5):1502-1505.
- Prescott LE, Simmonds P. Global distribution of transfusion-transmitted virus. *New Engl.J.Med.* 1998 Sep;339(11):776-777.

- Prescott LE, MacDonald DM, Davidson F, Mokili J, Pritchard DI, Arnot DE, Riley EM, Greenwood BM, Hamid S, Saeed AA, McClure MO, Smith DB, Simmonds P. Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. *J.Gen.Virol.* 1999 Jul;80(Pt 7):1751-1758.
- Qiu J, Kakkola L, Cheng F, Ye C, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Pintel DJ. Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone. *J.Virol.* 2005 May;79(10):6505-6510.
- Rocchi J, Ricci V, Albani M, Lanini L, Andreoli E, Macera L, Pistello M, Ceccherini-Nelli L, Bendinelli M, Maggi F. Torquetenovirus DNA drives proinflammatory cytokines production and secretion by immune cells via toll-like receptor 9. *Virology.* 2009 Sep;394:235-242.
- Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Bartolome J, Ortiz-Movilla N, Lopez-Alcorocho JM, Herrero M, Manzarbeitia F, Oliva H, Carreno V. Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am.J.Pathol.* 2000 Apr;156(4):1227-1234.
- Romeo R, Hegerich P, Emerson SU, Colombo M, Purcell RH, Bukh J. High prevalence of TT virus (TTV) in naive chimpanzees and in hepatitis C virus-infected humans: frequent mixed infections and identification of new TTV genotypes in chimpanzees. *J.Gen.Virol.* 2000 Apr;81(Pt 4):1001-1007.
- Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW, Roggendorf M. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J.Clin.Virol.* 1999 Aug;13(3):181-184.
- Saback FL, Gomes SA, de Paula VS, da Silva RR, Lewis-Ximenez LL, Niel C. Age-specific prevalence and transmission of TT virus. *J.Med.Virol.* 1999 Nov;59(3):318-322.
- Sagir A, Adams O, Antakyali M, Oette M, Erhardt A, Heintges T, Haussinger D. SEN virus has an adverse effect on the survival of HIV-positive patients. *AIDS* 2005a Jul 1;19(10):1091-1096.
- Savas MC, Guney C, Kadayifci A, Balkan A, Koruk M, Kubar A, Uygun A. High prevalence of transfusion-transmitted virus infection in patients with chronic liver diseases in an endemic area of hepatitis B and C virus. *Med Princ Pract.* 2003 Jul-Sep;12(3):176-9.
- Schröter M, Feucht H, Zöllner B, et al. Prevalence of TTV viremia among healthy subjects and individuals at risk for parenterally transmitted diseases in Germany. *Hepato Res* 1999; 13: 205-11.
- Schröter M, Polywka S, Zollner B, Schafer P, Laufs R, Feucht HH. Detection of TT virus DNA and GB virus type C/Hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. *J.Clin.Microbiol.* 2000 Feb;38(2):745-747.
- Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, Okamoto H. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS* 2001 Mar 30;15(5):563-570.

- Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J, Jarvis LM. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998 Jul 18;352(9123):191-195.
- Sospedra M, Zhao Y, zur Hausen H, Muraro PA, Hamashin C, de Villiers EM, Pinilla C, Martin R. Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity. *PLoS Pathog.* 2005 Dec;1(4):41.
- Suzuki F, Chayama K, Tsubota A, Akuta N, Someya T, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Pathogenic significance and organic virus levels in patients infected with TT virus. *Intervirology* 2001;44(5):291-297.
- Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li TC, Matsuura Y, Mishiro S, Miyamura T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J.Virol.* 2004 Oct;78(19):10820-10824.
- Takahashi K, Ohta Y, Mishiro S. Partial 2.4-kb sequences of TT virus (TTV) genome from eight Japanese isolates: diagnostic and phylogenetic implications. *Hepatol.Res.* 1998;12(2):111-120.
- Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, Mishiro S. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch.Virol.* 2000;145(5):979-993.
- Takayama S, Yamazaki S, Matsuo S, Sugii S. Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999b Mar 5;256(1):208-211.
- Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J.Med.Virol.* 1998a Nov;56(3):234-238.
- Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Nakano T, Kato T, Kato H, Mukaide M, Park YM, Kim BS, Ueda R. New genotypes of TT virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *FEBS Lett.* 1998b Oct 23;437(3):201-206.
- Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Nakano T, Hayashi K, Kato T, Mukaide M, Iida S, Mizokami M. Identification of a novel 23kDa protein encoded by putative open reading frame 2 of TT virus (TTV) genotype 1 different from the other genotypes. *Arch.Virol.* 2000b;145(7):1385-1398.
- Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M, Alter HJ, Shih JW. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *J.Infect.Dis.* 2001 Feb 1;183(3):359-367
- Thom K, Morrison C, Lewis JC, Simmonds P. Distribution of TT virus (TTV), TTV-like minivirus, and related viruses in humans and nonhuman primates. *Virology* 2003 Feb 15;306(2):324-333.

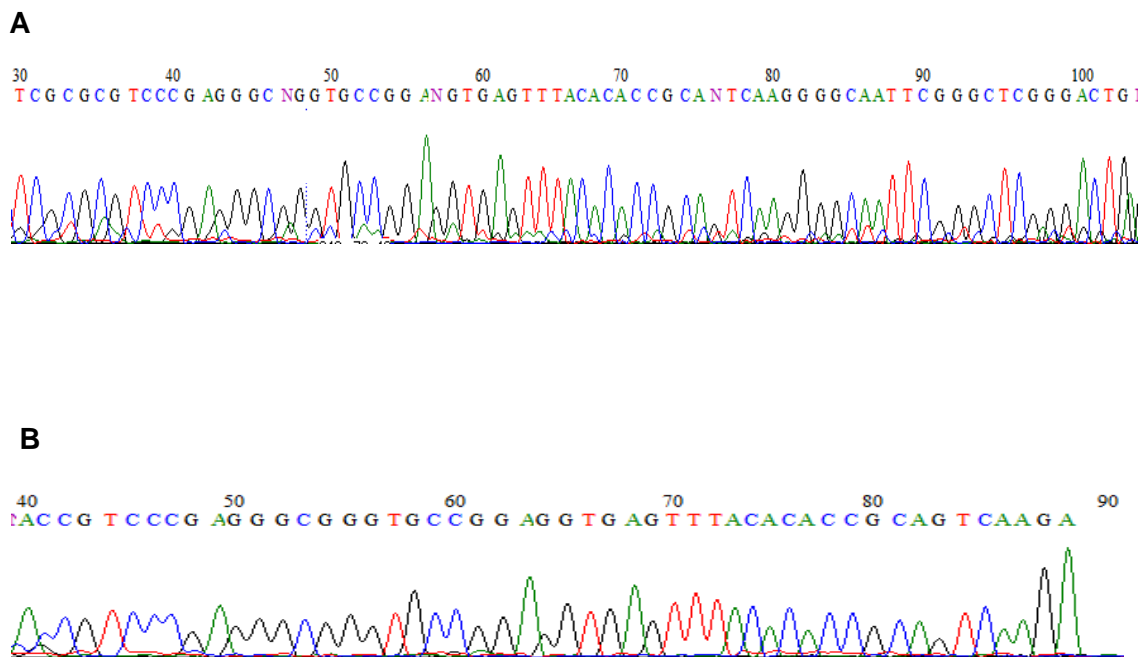
- Thom K, Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J.Med.Virol.* 2007 Jan;79(1):1-7.
- Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H. High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J.Med.Virol.* 2002 Aug;67(4):501-509.
- Touinssi M, Gallian P, Biagini P, Attoui H, Vialettes B, Berland Y, Tamalet C, Dhiver C, Ravaux I, De Micco P, De Lamballerie X. TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. *J.Clin.Virol.* 2001 May;21(2):135-141.
- Tyagi AK, Pradier A, Baumer O, Uppugunduri CR, Huezo-Diaz P, Posfay-Barbe K, Roosnek E, Ansari M. Validation of SYBR Green based quantification assay for the detection of human Torque Teno virus titers from plasma. *Virology J.* 2013 Jun 11;10:191.
- Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J.Infect.Dis.* 1999 May;179(5):1245-1248.
- Ukita M, Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. *Arch.Virol.* 2000;145(8):1543-1559.
- Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Yeo AE, Shih JW, Orii K, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K. Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *J.Infect.Dis.* 2001a Nov 15;184(10):1246-1251.
- Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Orii K, Yeo AE, Shih JW, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K. SEN virus: response to interferon alfa and influence on the severity and treatment response of coexistent hepatitis C. *Hepatology* 2002a Apr;35(4):953-959.
- Umemura T, Tanaka Y, Kiyosawa K, Alter HJ, Shih JW. Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). *FEBS Lett.* 2002b Jan 16;510(3):171-174.
- Umemura T, Tanaka E, Ostapowicz G, Brown KE, Heringlake S, Tassopoulos NC, Wang RY, Yeo AE, Shih JW, Orii K, Young NS, Hatzakis A, Manns MP, Lee WM, Kiyosawa K, Alter HJ. Investigation of SEN virus infection in patients with cryptogenic acute liver failure, hepatitis-associated aplastic anemia, or acute and chronic non-A-E hepatitis. *J.Infect.Dis.* 2003 Nov 15;188(10):1545-1552.
- Vaidya SR, Chitambar SD, Arankalle VA. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J.Hepatol.* 2002 Jul;37(1):131-136.
- Vasconcelos HC, Gomes SA, Cataldo M, Niel C. Prevalence and genetic diversity of TT virus genotype 21 (YONBAN virus) in Brazil. *Arch.Virol.* 2003 Mar;148(3):517-529.

- Viazov S, Ross RS, Niel C, de Oliveira JM, Varenholz C, Da Villa G, Roggendorf M. Sequence variability in the putative coding region of TT virus: evidence for two rather than several major types. *J.Gen.Virol.* 1998a Dec;79(Pt 12):3085-3089.
- Viazov S, Ross RS, Varenholz C, Lange R, Holtmann M, Niel C, Roggendorf M. Lack of evidence for an association between TTV infection and severe liver disease. *J.Clin.Virol.* 1998b Dec;11(3):183-187.
- Watanabe H, Saito T, Kawamata O, Shao L, Aoki M, Terui Y, Mitsunashi H, Matsuo T, Takeda Y, Saito K, Togashi H, Shinzawa H, Takahashi T. Clinical implications of TT virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *Am.J.Gastroenterol.* 2000 Jul;95(7):1776-1780.
- Wright TL. Etiology of fulminant hepatic failure: is another virus involved? *Gastroenterology.* 1993; 104: 640-3.
- Yamamoto T, Kajino K, Ogawa M, Gotoh I, Matsuoka S, Suzuki K, Moriyama M, Okubo H, Kudo M, Arakawa Y, Hino O. Hepatocellular carcinomas infected with the novel TT DNA virus lack viral integration. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998 Oct 9;251(1):339-343.
- Yazici M, Comert MR, Mas R, Guney C, Cinar E, Kocar IH. Transfusion-transmitted virus prevalence in subjects at high risk of sexually transmitted infection in Turkey. *Clin.Microbiol.Infect.* 2002 Jun;8(6):363-367.
- Yu Q, Shiramizu B, Nerurkar VR, Hu N, Shikuma CM, Melish ME, Cascio K, Imrie A, Lu Y, Yanagihara R. TT virus: preferential distribution in CD19(+) peripheral blood mononuclear cells and lack of viral integration. *J.Med.Virol.* 2002 Feb;66(2):276-284.
- Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, Kong L, Wang W, Zeng Y, Wu Z, She Y, Zhou X. Torque Teno Virus (SANBAN isolate) ORF2 Protein Suppresses the NF κ B Pathways via Interaction with I κ B Kinases. *J.Virol.* 2007 Nov;81(21):11917-24.
- Zhong S, Yeo W, Lin CK, Lin XR, Tang MW, Johnson PJ. Quantitative and genotypic analysis of TT virus infection in Chinese blood donors. *Transfusion* 2001a Aug;41(8):1001-1007.
- Zhong S, Yeo W, Tang M, Liu C, Lin XR, Ho WM, Hui P, Johnson PJ. Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *J.Med.Virol.* 2002 Mar;66(3):428-434.
- Zuckermann. The acronym TTV. Transfusion transmitted virus. *Lancet* 1999 Mar; 13;353(9156):932.
- zur Hausen H, de Villiers EM. Virus target cell conditioning model to explain some epidemiologic characteristics of childhood leukemias and lymphomas. *Int.J.Cancer* 2005 May20;115(1):1-5.

ANEXO

ANEXO I: Cromatogramas obtenidos para detección de TTVH.

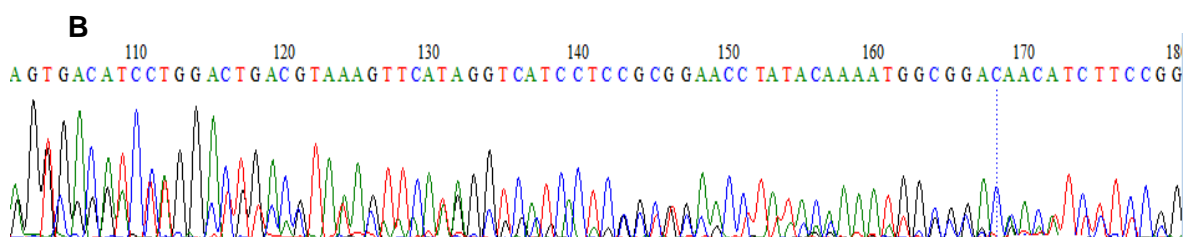
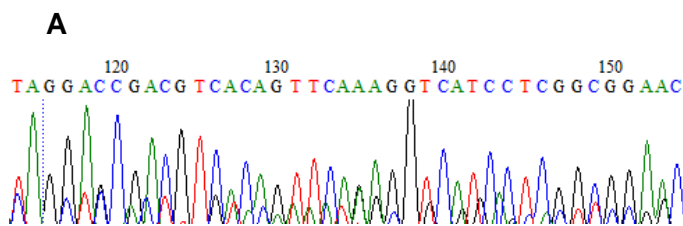
A continuación se presentan los cromatogramas para dos muestras a modo de ilustrar, obtenidos por medio de la Nested-PCR de detección para el fragmento UTR A conservado de 110 pb, debidamente corroborada su identidad con el programa de alineamiento on-line BLAST.



Cromatogramas de región UTR A de 110 pb. A) Secuencia de muestra SEIC 40. B) Secuencia de muestra SEIC 38. Editadas y analizadas en Bioedit V. 7.0.5.

ANEXO II: Cromatogramas que presentan co-infección con cepas de TTVH.

Se presentan, con motivos de ejemplificar, dos cromatogramas pertenecientes a dos muestras conteniendo co-infección con distintas cepas de TTVH, obtenidos por medio de la Seminested-PCR de caracterización.



Cromatogramas de región UTR B. A) Secuencia de muestra SEIC 35. B) Secuencia de muestra SEIC 24. Visualizadas en Bioedit V. 7.0.5.

