

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
MAESTRÍA EN MEDICINA ESTOMATOLÓGICA

DETECCIÓN DEL VIRUS HEPATITIS C EN SALIVA DE PACIENTES

VHC POSITIVOS: EN UNA POBLACIÓN VENEZOLANA

AUTOR: OD. MARCO AURELIO LUNA AVELLANEDA
TUTOR: DRA. MARIA CORRENTI DE PLATA

CARACAS, 2005

Aprobado en nombre de la Universidad Central de Venezuela por el siguiente jurado
examinador:

(Coordinador) Nombre y apellido

Firma

Jurado Nombre y apellido

Firma

Jurado Nombre y apellido

Firma

Observaciones: _____

Caracas, 2004

AGRADECIMIENTOS

“En aquel momento, Jesús, lleno de gozo en el Espíritu Santo, exclamó: Te doy Gracias Padre porque haz revelado estas cosas a la gente sencilla” Lc 10,21.

Al Dr. Pablo Lecuna, jefe del I Servicio de Gastroenterología del Hospital Clínico, y al Dr. Miguel Garassini, Jefe de la consulta de Hígado, por permitirme trabajar con sus pacientes y suministrarme toda la información y el espacio necesario para realizar esta investigación.

A la Dra. María Correnti, no solo por ofrecerse como tutora para esta investigación, también por el tiempo dedicado a enseñarme lo que es la verdadera Ciencia, y el amor de un Docente al enseñar y buscar el crecimiento de sus alumnos.

A la Dra. Marianella Perrone, que de una forma u otra estuvo apoyando esta investigación.

A los Licenciados Mayra Ávila, Armando Rodríguez y Soraya de Rodríguez por el desinteresado apoyo que me ofrecieron para que este estudio se realizara.

A todos los que me apoyaron y creyeron en mí, en especial a los pacientes, que con su cariño y paciencia lograron contribuir en el crecimiento de la ciencia.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
I.- INTRODUCCIÓN	7
II.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	11
1.- La Hepatitis	11
2.- Características Clínicas del Virus de Hepatitis C	12
3.- Rutas de infección	13
4.- Características Clínicas y Etiopatogenia	13
5.- Epidemiología del Virus de Hepatitis C	14
6.- Métodos de Diagnóstico	15
7.- Tratamiento	22
8.- Hepatitis C y la Práctica Odontológica	22
9.- Hepatitis C y la Cavidad Bucal	23
10.- Hepatitis C y la Saliva	25
11.- Virus de Hepatitis C y otros Fluidos	28
12.- Condición Bucal y Hepatitis C	28
13.- Hepatitis C en Relación con otra Patologías	29
JUSTIFICACIÓN	31
OBJETIVOS GENERALES	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	33
1.- Materiales Biológicos	33
2.- Soluciones y Reactivos	33
3.- Equipos de Laboratorio	34
4.- Materiales de Laboratorio	35
5.- Metodología	36
5.1.- Selección de la Muestra	36
5.2.- Toma de la Muestra	38
6.- Procesamiento de la Muestra	39
6.1.- Detección del ARN del Virus de Hepatitis C en Muestras de Saliva	39

6.2.- Extracción de ARN	39
6.3.- Síntesis de ADNc	40
6.4.- Primera Ronda de Amplificación	40
6.5.- Segunda Amplificación	41
7.- Genotipaje	42
7.1.- Preparación de Reactivos	42
7.2.- Genotipaje	42
7.3.- Procedimiento	43
7.4.- Análisis Estadísticos	45
IV.- RESULTADOS	46
V.- DISCUSIÓN	68
VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
VII.- REFERENCIAS	85
ANEXOS	97

RESUMEN

La hepatitis es la inflamación del hígado generalmente causada por virus. Existen varios tipos de hepatitis virales que se identifican con una letra, tienen mecanismos de infección, patogenia y sintomatología diferente.

De todas las hepatitis, la causada por Virus C (VHC) es la que ocasiona mayores daños hepáticos con el transcurso del tiempo. La Hepatitis C se puede transmitir por vía parenteral, relaciones sexuales, contacto con tejidos contaminados e infección vertical, consumo de drogas intravenosas, hasta la fecha, no están esclarecidas todas las rutas de infección. Estudios han establecido la presencia de genoma del Virus Hepatitis C en distintos fluidos y numerosos investigadores han analizado otras posibles rutas de contagio, ya que lograron detectar y genotipar el virus de Hepatitis C en saliva.

El objetivo de este estudio fue detectar, mediante técnicas de Biología Molecular, la presencia del Virus Hepatitis C en la saliva de pacientes infectados, relacionándolo con las condiciones bucales y las patologías bucales. La fase experimental se realizó en el instituto de Oncología y Hematología (Laboratorio de Genética) del MSDS-UCV.

Entre los resultados obtenidos en este trabajo se destaca la relación existente entre la detección del Virus Hepatitis C en saliva y la condición bucal.

I. INTRODUCCION

En los últimos años se ha observado un incremento de los casos reportados de pacientes infectados por el Virus de Hepatitis C (VHC); probablemente esto es debido a los problemas éticos, morales, de prejuicios, así como a la carencia de información, para que las personas que padecen tal enfermedad la acepten y mejoren su salud, además sientan apoyo para que lo comuniquen abiertamente a los profesionales de la salud que clínicamente los tratan en los servicios médicos y odontológicos. Adicionalmente existe la dificultad que confrontan muchos de esos profesionales para realizar el diagnóstico de esta enfermedad, porque, se requiere para la detección del virus, la aplicación de técnicas de Biología Molecular, que están restringidos a pocos Centros Especializados que ofrecen el servicio. Lo antes expuesto ha motivado a diferentes sectores de la investigación para efectuar estudios que puedan contribuir a un diagnóstico más certero para el paciente, con fuertes implicaciones en la toma de decisiones sobre el tratamiento a seguir, así como disminuir el riesgo de contaminación de los profesionales que laboran en el área de la salud.

Cabe destacar que las investigaciones de la infección por VHC y las rutas de transmisión por las que ésta pudiera ocurrir, hasta la actualidad no están del todo esclarecidas y en nuestro país y en Latinoamérica, a diferencia de algunos países europeos y de Estados Unidos, son escasos los estudios que contemplen la cavidad bucal y la variable fluido salival como las consideradas en el presente estudio.

La hepatitis es la inflamación del hígado que puede ser causada por alcohol, bacterias, drogas y trauma, entre otras. Existen varios tipos de hepatitis virales y cada una de ellas se identifica con una letra, A, B, C, D, E; cada tipo de hepatitis tiene un mecanismo de infección y patogenicidad, presentando sintomatología y curso

diferentes. Aunque la hepatitis A y la B son las más comunes, la causada por Virus C es la que ocasiona mayores daños hepáticos con el transcurso del tiempo (1)

La Hepatitis C se puede transmitir por transfusión sanguínea, relaciones sexuales, contacto con tejidos contaminados e infección vertical (madre a hijo). Se ha reportado que la sintomatología pasa inadvertida en un 45% de los pacientes que sufren esta enfermedad, aunque un 10% a 15% de las personas presentan ictericia. El estado inicial de la infección es seguido por un período de latencia o ventana, el cual puede durar entre 10-15 años, tiempo en el que el virus puede replicarse y causar daños severos en el hígado. (1)

Investigaciones realizadas a lo largo de varios años han reportado la aparición de algunas entidades que están relacionadas con la infección o son consecuencia del tratamiento de esta enfermedad (2)

A partir de los años 90, diferentes estudios proveen resultados controversiales en relación con la vía de transmisión, ya que se ha podido establecer la presencia de Ácido Ribonucleico de Virus de Hepatitis C (ARN-VHC) en saliva (3, 4, 5, 6). Otros investigadores han analizado otras posibles rutas de contagio detectando y en algunos casos genotipando, el ARN de VHC en lágrimas, saliva, orina y semen. (7, 4, 8).

Debido a que ha sido demostrada la presencia de partículas de VHC en la saliva, se ha sugerido que las células sanguíneas periféricas mononucleares son un posible vehículo para transferencia de partículas virales, de la circulación sanguínea a la saliva. Estos estudios plantean que las células sanguíneas periféricas mononucleares pudieran ser un blanco extra hepático para la infección de VHC. Sin

embargo estas no parecen ser el mayor vehículo para transportar las partículas del virus a la saliva (9).

Otro enfoque importante ha sido reportado en algunos trabajos, en donde se ha demostrado que el virus de hepatitis C se replica en células epiteliales de las glándulas salivales en pacientes con Síndrome de Sjögren o Sialoadenitis (10).

Por otra parte, (11) han reportado la presencia del ARN VHC en saliva mediante la técnica de la TR-RCP, y han relacionado este evento con la presencia viral en fluido crevicular de pacientes con hepatitis crónica sin cuidado dental.

Gracias a los avances científicos y el desarrollo de las técnicas de biología molecular, algunos grupos de investigación están dirigiendo todos sus esfuerzos en detectar el ARN viral en células mononucleares (9) que se presentan en saliva, a la vez que otros buscan detectarlo en fluido gingival (11). Este aspecto es importante no sólo para el diagnóstico de la enfermedad, sino que además debe ser tomado en consideración a la hora de evaluar los riesgos ocupacionales dentro de la práctica odontológica, ya que ésta, implica el contacto con fluidos como saliva, sangre y líquido gingival y además incluye aerosoles microbianos que pudieran de modo significativo, modificar las posibilidades de contagio.

Cabe destacar que no sólo se trata de diagnóstico y tratamiento del paciente positivo para hepatitis C, se debe considerar también la realización de protocolos de atención integral que permitan de manera segura y exitosa brindar salud bucal a este grupo de pacientes, tanto en su condición especial como para las patologías que pudieran generarse como consecuencia de esta enfermedad.

En nuestro país no se conocen estudios para la determinación del Virus de Hepatitis C en cavidad bucal empleando las técnicas de Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-RCP).

El presente trabajo tiene como objetivo fundamental determinar la presencia de ARN de VHC en la saliva de un grupo de pacientes que padecen esta infección, relacionarlo con la condición bucal de estos pacientes y con las patologías bucales que padecen, con el propósito de incentivar nuevas investigaciones en esta materia y en el campo de la salud bucal y Bioseguridad.

II.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

1. La Hepatitis

El hígado es un órgano muy vascularizado que cada minuto recibe unos 400 cc de sangre de la vena porta y 100 cc de la arteria hepática; al fluir por los sinusoides, la sangre queda expuesta a las células de Kupffer, que son células fagocitarias; estas eliminan los desechos celulares y las partículas extrañas, teniendo un papel importantísimo en la filtración de la sangre. De igual forma cumple un importante rol en el almacenamiento de sangre (12).

Se define la hepatitis como la inflamación del hígado, originado por varios agentes etiológicos como fármacos y virus entre otros (13).

El término hepatitis también se usa en patología para referirse a los procesos infecciosos que lesionan de forma difusa el parénquima hepático, produciendo inflamación con afectación del hepatocito. Este proceso puede ser producido por diferentes tóxicos y agentes infecciosos como virus Epstein-Barr, Citomegalovirus y virus Herpes Simple (1).

Sin embargo existe un grupo de virus que tienen tropismo predominantemente hepático y que producen la denominada hepatitis vírica, aunque presentan variaciones en sus características clínicas y epidemiológicas; estos no están emparentados filogenéticamente y no constituyen ninguna entidad taxonómica, entre ellos se encuentran:

Virus Hepatitis A (VHA), Virus Hepatitis B (VHB), Virus Hepatitis C (VHC), Virus Hepatitis D (VHD), Virus Hepatitis E (VHE), y otros como el Virus Hepatitis F (VHF) y

Virus Hepatitis G (VHG), estos dos últimos relacionados con la hepatitis de células gigantes (1).

Antes del desarrollo de técnicas de biología molecular se pensaba que sólo existían dos tipos de hepatitis viral; se sabía que estas enfermedades eran diferentes y que eran causadas por virus parecidos, una que es transmitida por vía oral y la otra por vía parenteral, aunque ya se relacionaba con necrosis hepática sub-aguda o con insuficiencia hepática aguda (14).

2. Características del Virus Hepatitis C

El virus hepatitis C pertenece a la familia *Flaviviridæ*, es un virus pequeño que mide entre 30-60 nanómetros de diámetro con una densidad de 1.24-1.32/ml en cl/cs, presenta una cubierta lipídica y un genoma de ARN monocatenario con polaridad positiva, de lectura abierta que codifica una poliproteína que, posteriormente, mediante la acción de proteasas se escinde en proteínas estructurales del virus, denominadas proteínas C del core y E de envoltura. (10)

El genoma viral también presenta una región que codifica para proteínas no estructurales (NS) en el extremo 3'. Posee una extraordinaria variabilidad genética que posiblemente le permite escapar de la respuesta inmunológica del hospedero. Se conocen varios genotipos de este virus.

Se comenzó a estudiar a inicios de los ochenta, gracias a los avances de las técnicas de biología molecular. En 1988 se consiguió clonar el virus aislado del suero de chimpancé con elevado título viral. (1)

3. Rutas de Infección

La transmisión se produce principalmente por vía parenteral, siendo un virus hepatotrópico y linfotrópico que se replica directamente en el hepatocito. (1)

Varios autores sugieren que existen otras rutas de infección como daño percutáneo, transfusiones sanguíneas, compartir jeringas y/o drogadicción, abuso de drogas, hemodiálisis y accidentes laborales (7, 9, 11, 15, 16, 17,). Otro plantea el contacto familiar y de igual forma, en anteriores trabajos no descartan la posibilidad de que la saliva, por los elementos que la constituyen y que contiene, pueda de alguna manera ser una importante vía de contaminación. (3)

Por otra parte, otros autores aseguran que el contacto sexual y las relaciones homosexuales podrían estar involucrados en este proceso. (15,18). Mientras que la transmisión vertical parece ser poco probable (1).

4. Características Clínicas y Etiopatogenia

Clínicamente puede comenzar con una fase prodrómica que dura varios días y se caracteriza por síntomas constitucionales y gastrointestinales, entre los que figuran: Malestar, debilidad, anorexia, náuseas y vómitos, mialgias y cefaleas, puede haber una ligera fiebre y parecerse a una gripe, con posterior aparición de ictericia. (19)

La infección tiene un período de incubación que varía entre 15 días y 6 meses y puede cursar asintomática o con las características clínicas de cualquier hepatitis; son raros los casos fulminante o con elevado porcentaje a la cronicidad (entre 80% y 85%) pudiéndose presentar como hepatitis crónica activa, persistente o cirrosis;

presenta una elevada relación con el hepatocarcinoma. Se cree que el daño hepático que este virus causa se debe a la respuesta inmunitaria del hospedero. (1)

Algunos casos de hepatitis C se resuelven espontáneamente, pero entre el 80-85% de los casos progresan a una hepatitis crónica, que muchas veces no cursa con síntomas, por lo que la infección pasa inadvertida y sólo es detectada en un análisis de rutina. (1)

Además de la hepatitis crónica, la infección por VHC también tiene manifestaciones extrahepáticas. En particular es conocida la asociación entre VHC, Crioglobulinemia Mixta y Glomérulo Nefritis Membranoproliferativa. Otras patologías con las que se ha relacionado son Porfirio Cutánea Tardía, Enfermedad Tiroidea Autoinmune, Síndrome Proliferativo, Síndrome de Sjögren, Linfoma no Hodking, Diabetes Melitus y Liquen Plano. (2)

5. Epidemiología del VHC: Frecuencia en la Población

Edad y Sexo

En relación al género y a la edad de adquisición de la infección las investigaciones revisadas no indican predilección. Se calcula que alrededor de 100 millones de personas a nivel mundial están infectadas con este virus (18).

La Organización Mundial de la Salud estima que el 3% de la población mundial está infectada por Virus Hepatitis C (de 170 a 200 millones de personas) y con un alto riesgo para desarrollar cirrosis y cáncer de hígado (20).

En Venezuela, se estima que el 1.5% de la población adulta está infectada con VHC, lo que comprende 200.000 individuos ya que en nuestro país existe un sub-registro. La evolución de la infección es variable; del 20% al 30% de los individuos infectados desarrollan cirrosis en un lapso de 20 años, lo que a su vez predispone a la aparición de hepatocarcinoma. La cirrosis por VHC constituye en el ámbito mundial una de las primeras causas de enfermedad hepática y la primera indicación de transplante de hígado. (21)

Rapicetta y col, (1992) en un estudio en el que procesaron 1484 muestras de suero pertenecientes a pacientes con VHC concluyeron que la mayor prevalencia se presentó en el grupo de pacientes entre el rango de edad comprendido entre 50 y 59 años.

6. Métodos de Diagnóstico

Existen diferentes métodos de diagnóstico para el VHC, algunos directos y otros indirectos. Entre los directos se mencionan:

Pruebas inespecíficas como transaminasas, gamma-glutamiltanspeptidasas, fosfatasa alcalina y biopsias, entre otras.

En los específicos se nombran determinación de Anticuerpos antihepatitis C por ELISA, inmunoblot, determinación del antígeno VHC y estudio del ácido nucleico por Transcriptasa Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-RCP) en suero y células mononucleares de sangre periférica entre otros. (1)

Técnica de Estudio de Ácido Nucleico

Se lleva a cabo mediante el aislamiento del ARN por técnicas de amplificación genómica, que son muy sensibles y específicas para captar bajas concentraciones de carga viral. Se pueden realizar en suero, en biopsias de hígado y en células mononucleares de sangre periférica. (23)

La reacción en cadena de la polimerasa fue reportada por primera vez en 1985, la técnica consiste en ensamblar grandes cantidades de ADN, a partir de pequeñas cantidades de material inicial en una simulación de los mecanismos básicos de la replicación del ADN que ocurre *"in Vivo"*, resultando en una amplificación exponencial de ADN, elevando el nivel de la detección en comparación con otros métodos convencionales. (23)

El RCP es un método de amplificación de ADN *"in Vitro"* que envuelve repetidos procesos cíclicos de pasos definidos. Los reactivos requeridos para el RCP incluyen una ADN polimerasa, cada uno de los cuatro nucleótidos dNTPs, bloques contruidos de ADN en cantidades equimolares, y un molde de ADN que puede ser ADN genómico o ADN complementario conteniendo una secuencia blanco. La técnica además demanda la disponibilidad de dos "primers" oligonucleótidos diseñados para complementar la secuencia de los flancos de ADN de la región de interés. El primer puede ser de una longitud variable pero usualmente se encuentran alrededor de 15 a 30 pb. Para algunos propósitos específicos puede variar o ser degenerado en su secuencia, estos son usualmente complementados de manera directa. En general la información de la secuencia a sintetizar está disponible para las regiones blanco del ADN que van a ser identificadas. (23)

La amplificación toma lugar en repetidos ciclos hechos en tres pasos definidos, la desnaturalización térmica, alineamiento y extensión. En el primer paso la desnaturalización de ADN se hace calentando a de 90 °C por 60 segundos para separar la doble cadena de ADN y producir dos cadenas sencillas. Esto es seguido por un segundo paso conocido como alineamiento donde la temperatura es reducida de 35 a 55 grados centígrados por un intervalo de tiempo entre 60 y 120 segundos, para permitir que los primers se unan a la secuencia de ADN complementario en las hebras sencillas producidas en el paso anterior. El paso final del ciclo es la extensión de la nueva cadena de ADN, produciendo copias complementarias de la hebra inicial delimitada por los primers adherido al ADN blanco. Este paso usualmente toma lugar a 72 °C por 60 a 180 segundos por una ADN polimerasa que es capaz de soportar altas temperaturas. (23)

Los tres pasos separados son repetidos generalmente de 25 a 40 ciclos en este sentido los productos de la doble cadena de los ciclos previos forman nuevos moldes para el próximo ciclo. (23)

Estos resultados se acercan a una acumulación de las secuencias blanco de ADN específico por encima de 1 millón de copias entre 3 y 4 horas. Debido al diseño de termocicladores automáticos se logran replicar eficientemente lo que se necesita. (23)

Los primers usados en RCP en general son diseñados usando información basada en secuencias existentes de cercanas similitudes o de secuencias evolutivamente conservadas, encontradas por los investigaciones, y recopiladas en bases de datos. La información existente de la secuencia de aminoácidos puede además ser usada, proveyendo secuencias deducidas de ácidos nucleótidos, de las

cuales el primer puede ser diseñado. El diseño del primer es crítica no sólo para amplificaciones específicas sino para permitir posteriores manipulaciones a través de la inclusión de sitios de restricción o de sitios promotores en el primer. (23)

El uso de la enzima de ADN polimerasa termoestable en la técnica de RCP, transformó y permitió una alta automatización superando así las enzimas anteriores no termoestables, que requerían agregar la misma para poder iniciar cada reacción; de igual manera se utilizan Taq polimerasas que son altamente termoestables y menos sensibles a los cambios del magnesio, permitiendo desnaturalizaciones prolongadas algunas veces requeridas en el procedimiento. (23)

Existen otros componentes en el RCP como el cloruro de magnesio que es un componente crítico porque no sólo es requerido por la ADN polimerasa para una actividad eficiente, sino que además forma un complejo soluble con los dNTPs el cual es esencial para la incorporación en la extensión de los pasos de los ciclos de RCP.

Él además afecta la especificidad de la interacción de los primers moldes y la desnaturalización de las dobles cadenas mediante el aumento de las temperaturas. (23)

En general insuficiencia o exceso de magnesio puede producir efectos contrarios a los deseados, de igual forma la heparina aparece como un inhibidor potencial del RCP, así como las altas concentraciones de detergentes iónicos como el SDS, proteína K y trazas de fenol que son usados rutinariamente en las técnicas de extracción de ácidos nucleicos. (23)

La confirmación del tamaño correcto del producto amplificado de RCP es usualmente realizado por electroforesis en un gel de agarosa. Es posible también

confirmar el producto por un análisis de restricción empleando endonucleasas. Posterior a la confirmación la secuencia amplificada que se desea, puede ser derivada a otros estudios etiquetando la porción interna e insertándola en la secuencia amplificada. (23)

El RCP ha encontrado muchas aplicaciones y puede ser utilizado en el diagnóstico de enfermedades, identificación de especies así como es capaz de detectar ADN de gran especificidad y por ende puede ser usado para detectar infecciones virales y bacterianas. (23)

Muchas de las ventajas de RCP pueden ser aparentes, debido a que es una técnica sensible, es relativamente rápida y teóricamente muy fácil de desarrollar. Desafortunadamente la mayor ventaja puede convertirse también en la mayor desventaja, la sensibilidad. (23)

Debido a que el RCP es capaz de amplificar una copia simple de ADN, cualquier grado de contaminación puede resultar en falso o una amplificación indeseada. Esto hace al método extremadamente sensible a dar posibles falsos resultados positivos a menos que se tenga un gran cuidado al organizar las reacciones para evitar cualquier posibilidad de contaminación. (23)

Las fuentes de contaminación no sólo incluyen muestras positivas de ADN así como controles positivos, sino también materia previamente amplificada, esta se puede encontrar en las superficies de pipetas y hasta aerosoles, por ende, es recomendado que las reacciones de RCP se realicen en localidades específicas físicamente adecuadas para estos procedimientos, así como el uso de equipo detallado específico para estas pruebas. (23)

Un método útil para prevenir la contaminación resulta de la conversión del producto de RCP en una forma no amplificada mediante radiación ultravioleta. El tiempo preciso y las condiciones de radiación dependen del contenido de timidina, el largo del ADN, y la energía de radiación ultravioleta. La degradación enzimática del ADN, se ha realizado con ADNasa o digestión exonuclear. Un posterior método hace uso del tratamiento de los productos de RCP con la enzima N- glycosylasa siguiendo amplificación con dUTP sustituida por dTTP. Estas separaciones llevan consigo productos RCP que tengan dUTP incorporado para que no puedan ser usados como templados en posteriores RCP. Esto está comercialmente disponible como AmpErase. (23)

La TR-RCP tiene un número de aplicaciones pero es especialmente útil para analizar la actividad transcripcional de genes y de isoformas genéticas y de microorganismos cuyo genoma viral se compone de ARN. (23)

Recientes desarrollos RCP:

Numerosos desarrollos y modificaciones han permitido la adaptación del RCP a la amplificación, detección y caracterización de secuencias específicas de ADN y ARN. Esto ha permitido el análisis detallado del desarrollo celular, como la diferenciación de células B y detección de copias simples del genoma viral en células infectadas por virus. (23)

Una alta modificación (de gran utilidad) del procedimiento original de RCP, puede ser usada para amplificar ARN. Esto requiere la producción de ADN complementario (ADNc) para la secuencia blanco del ARN. Esto se realiza usando un primer oligonucleótido apropiado, dNTP's y la enzima transcriptasa reversa. El ADN resultante puede ser usado directamente en el RCP. Es frecuente que las muestras

sean procesadas incluyendo en el tubo de ARN-RCP el paso de la transcripción o reversa en la primera ronda de RCP. La siguiente ronda genera otro filamento de ADN complementario al ADNc que es usado como molde en la RCP. (23)

La técnica del TR-RCP ha sido usada para permitir la detección sensible de un número muy bajo de genomas virales y ha demostrado tener una buena correlación con las muestras infectadas, la selección de primers oligonucleótidos para amplificar el Virus de Hepatitis C aislado, compromete la sensibilidad de la técnica. La sensibilidad del par de primers empleados para la detección de ARN VHC por el nested-RCP ha sido de gran utilidad en el diagnóstico y las investigaciones. (23)

Estudios que comparan la efectividad entre el TR-RCP y la detección de anticuerpos antiVHC en saliva, determinaron que esta última prueba no tiene ningún tipo de efectividad para la cavidad bucal. (24)

Un hallazgo importante se realizó en España en donde Arrieta y col (2001) asocian la infección del virus con diversas manifestaciones extrahepáticas, siendo la Sialoadenitis una de estas, detectaron virus por hibridación empleando sondas de polaridad positiva y negativa, en las células epiteliales de las glándulas salivales menores en todos los pacientes que presentaron anticuerpos Anti-VHC, demostrando así que el virus se replica en las células epiteliales de las glándulas salivales menores.

7. Tratamiento

El tratamiento para la infección con VHC es básicamente la mezcla de interferón y rivabirina, con buenos resultados en la curación de esta enfermedad. Dependiendo de la severidad de la infección y de las condiciones del paciente se usa uno de los dos, o la combinación de ambos. (25, 26)

8. Hepatitis C y la Práctica Odontológica

La bioseguridad se ha tocado siempre de alguna manera en la mayoría de los trabajos de investigación, algunos investigadores refieren que el riesgo de transmisión de agentes patógenos durante el tratamiento odontológico todavía se encuentra en estudio, sin embargo debido a los equipos e instrumentos que se usan en la práctica dental, los odontólogos se encuentran con frecuencia expuestos a aerosoles microbianos que contienen sangre, saliva y placa dental, suponiendo esto un alto riesgo para la salud de los profesionales (15, 27).

Chen y col (1995) reportan un estudio seroepidemiológico, en el que indican que el odontólogo tiene un alto riesgo de infectarse con VHC, sobre todo en procedimientos quirúrgicos o que tengan sangrado, este hecho puede ser reducido con el uso de anestésicos locales con adrenalina y con barreras de protección, disminuyendo así el riesgo laboral.

Más recientemente, Benett y col, (2000) reportaron que odontólogos presentaron infección por VHC, en comparación con los resultados obtenidos del grupo control, de igual forma reportan que a mayor tiempo de ejercicio mayor cantidad de anticuerpos anti-VHC, relacionando la transmisión con fluidos bucales

Las conclusiones de los resultados obtenidos por el estudio de Mojca y col en el año 2001, evidencian la importancia de considerar las bases biológicas de otros fluidos para posteriores investigaciones en periodoncia y factores inhibitorios en la cavidad bucal, llamando a estrategias preventivas que disminuyan el riesgo de la infección VHC en prácticas odontológicas.

9. Hepatitis C y Cavidad Bucal

Hepatitis y periodonto

El tejido gingival está sujeto a agresiones mecánicas y bacterianas continuas; la saliva, la superficie epitelial y los estadios iniciales de la respuesta inflamatoria proporcionan la resistencia a estas acciones. Aunque desde el siglo XIX se observó la presencia del fluido del surco, como cita Carranza, no fue sino hasta 1958 que Brill y Krasse despertaron el interés del estudio, introdujeron papel filtro en el surco gingival de perros a los que con anterioridad les inyectaron fluorescina por vía intramuscular, este material se recuperó en las tiras de papel luego de 3 minutos. Estudios posteriores realizados en humanos demostraron que el líquido gingival o fluido crevicular es un exudado inflamatorio y no un trasudado continuo, en una encía normal se recolecta poco o ninguno.

Hay un paso de materiales desde los vasos sanguíneos hacia el tejido conectivo y a través del epitelio al surco, algunas sustancias como la albúmina, endotoxinas, histamina, finitoina y peroxidasa indican la permeabilidad a sustancias de peso molecular elevado.

En la composición de este fluido se incluyen bacterias, células epiteliales descamadas y leucocitos, los cuales migran a través del epitelio del surco, también se encuentra potasio, sodio y calcio, esta última unión entre el sodio y el calcio y la concentración de sodio potasio se ha correlacionado con el proceso inflamatorio. (28).

En la bibliografía se reporta una correlación positiva entre el líquido, sus componentes y la gravedad de la inflamación gingival, de igual manera en los surcos de las encías clínicamente sanas se observan neutrófilos que están fuera de los vasos sanguíneos de tejido conectivo adyacente que viajan atravesando el epitelio hacia el surco gingival.(28)

Referente a las células donde se ha determinado la presencia del genoma viral, Young y col (1993) detectaron ARN-VHC en células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) en el 24% de los pacientes infectados, sugiriendo que las CSMP son un blanco extrahepático para la infección del VHC. Un estudio mas reciente indica que los leucocitos constituyen el 47% de las células somáticas en el surco gingival, migran constantemente tanto en periodontos sanos como en inflamados. (11)

Un estudio de años anteriores, señalan que la replicación viral ocurre en células mononucleares de la sangre periférica y en el epitelio de las glándulas submaxilares, además de incluir el suero exudado del fluido crevicular y las células mononucleares infectadas que migran del periodonto inflamado. (9)

Adicionalmente Maticic y col (2001), refieren que la sangre se pudo encontrar en pacientes sanos sin lesiones visibles de la mucosa bucal de la población estudiada por ellos. Este mismo trabajo en concordancia con los trabajos anteriores, menciona que la enfermedad periodontal en sus diferentes etapas induce a la

migración de células, ha atribuido un continuo trasudado de suero en la cavidad bucal a través de la unión de la encía marginal con el diente desde que se inicia la inflamación, la sangre contenida en el fluido crevicular puede reflejar la actividad inflamatoria local y también puede contener sangre periférica, asumiendo que esta puede entrar desde el fluido crevicular atravesando la encía. Concluye que no se ha implicado el alto grado de enfermedad periodontal con la presencia del VHC en saliva, mas bien se sugiere la contaminación con sangre y células.

Un reporte menciona la detección del virus en 59% del fluido crevicular de los pacientes y sólo en un 35% fue aislado en saliva, concluyendo la existencia de alguna sustancia inhibitoria en la cavidad bucal, sin embargo sugieren que el VHC podría tener alguna relación en la enfermedad periodontal de estos pacientes ya que se aisló en mayor cantidad en fluido gingival (11).

10. Hepatitis C y saliva

Así como se ha relacionado la hepatitis con problemas periodontales, con el sangrado y con las células que se presentan en la inflamación, no se descarta la posibilidad de que la saliva por los elementos que la constituyen y que contiene, pueda de alguna manera ser una importante vía de contaminación. (3)

Takamatsu y col (1990) detectaron en saliva el ARN VHC, usando técnicas de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-RCP) en cinco pacientes infectados y lo atribuyen a la presencia de linfocitos y células fraccionadas con contenido viral, sugiriendo que la saliva es una posible vía de transmisión.

Un trabajo realizado con chimpancés, por Abe y col (1991), arrojó como resultado que en dos de los cuatro animales evaluados se aisló el ARN-VHC de la saliva de los primates, llegando los autores al mismo planteamiento de los anteriores trabajos.

Existen reportes que niegan la presencia del virus de hepatitis C en la saliva, como los publicados por Fried y col (1992) e Irving y col (1992).sin embargo múltiples estudios refieren la detección del Virus Hepatitis C (VHC) en la saliva, sugiriendo que este fluido pueda ser una posible ruta de infección (4, 6, 16)

Komiyama y col (1991) también corroboran los trabajos anteriores, al reportar que se detectó el VHC en la saliva de 2 de los 6 pacientes a los que les tomó muestra, afirmando que esta secreción pudiera ser una vía de infección sobre todo cuando los pacientes se encuentran recibiendo tratamiento odontológico.

En un artículo publicado en el Lancet, Wang y col (1991), reportan la infección del VHC en un individuo luego de una mordida humana, detectando además el ARN-VHC en la saliva de pacientes con Hepatitis C postransfuncional (HPT) en tres pacientes a los que se les realizó pruebas de ARN VHC en muestras de sangre y saliva; como conclusión determinan que la saliva posee las bases biológicas para contaminar e infectar, pudiendo convertirse en una ruta de infección además de estar implicada dentro del tratamiento dental.

Este mismo autor pero en un estudio publicado el año siguiente con 14 pacientes con (HPT) concluye que el ARN del VHC está presente en la saliva de la mitad de los pacientes con Hepatitis Crónica, y sugieren que la presencia del virus en cavidad bucal depende de la viremia. (17)

Así mismo, existen estudios que aceptan la presencia del virus pero no lo implican en la infección, como el realizado en Francia por Couzigou y col (1993), quienes detectaron el ARN VHC en la saliva de pacientes con VHC y determinaron que el 67% de los pacientes a los que se les realizó RCP fueron positivos en saliva, lo que les permitió sugerir que la saliva provee las bases biológicas como ruta de transmisión, aunque podría no estar implicada necesariamente en la infección.

En relación con este hecho, Chen y col, (1995) reportan la presencia del virus independientemente de la carga viral y la presencia de células. Otros reportan que el ARN VHC es sólo detectable en células fraccionadas de saliva de pacientes con una carga viral alta (25). En el estudio realizado en Eslovenia (11) no se encontró ARN en muestras provenientes de pacientes con baja carga viral y el virus hepatitis C no fue detectado en la saliva de pacientes que estaban recibiendo tratamiento, por lo que hace pensar que la terapia con interferón puede reducir el número de partículas VHC en suero y saliva, factores que no fueron considerados en este trabajo porque debido a los elevados costos de los tratamientos médicos, son muy pocos los pacientes que reciben terapia para esta enfermedad.

Chen y col (1995) tomaron saliva de glándulas submaxilares para evitar el contacto con el sangrado gingival, también colectaron saliva de la cavidad bucal y suero de 15 pacientes con VHC; su trabajo arroja como resultado que aislaron el ARN de la saliva de la cavidad bucal que contenían células fraccionadas en un 82%, y no lo detectaron en la saliva de glándulas salivales. Estudios más recientes como el publicado en 2001 por Maticic y col, reportan que detectaron el virus en saliva aunque relacionándolo con el fluido gingival.

11. Virus de Hepatitis C y otros fluidos

Fried y col (1992) estudiaron los fluidos corporales de 14 pacientes con Hepatitis Crónica (HC). Analizaron la presencia de ARN VHC usando RT-RCP; los ácidos nucleicos se extrajeron de la saliva y el semen. El genoma viral no fue detectado en ninguna de las muestras, en contraposición Liou y col, (1992), incluyeron muestras de orina y ascitis, y demostraron que de 52 pacientes, 34 con HC fueron positivos para anticuerpos AntiVHC y ARN, además de los 34 pacientes con ARN VHC positivo en suero, se detectó el virus en el 48% de las muestras de saliva, 7% de las muestras de orina, 24% de fluido seminal y el 100% de las muestras de ascitis. La data investigada sugiere que la presencia de sangre es independiente de la presencia de ARN de VHC en saliva. (4)

En Viena se analizaron 46 muestras de suero de niños con hepatitis crónica por RCP, de igual manera se tomaron muestras de vómito y se les aplicó la misma prueba; en el estudio se obtuvo que en el 20% de las muestras de vómito se encontró ARN- VHC (8).

Estudios posteriores detectaron y genotiparon en ARN-VHC en lágrimas de pacientes que sufrían de esta infección, concluyendo que en el 9.8% se aisló el ARN y que la presencia de éste depende de la severidad de la enfermedad y de los niveles virales. (30)

12. Condición Bucal y Hepatitis C

Komiyama y col en 1991 estudiaron la presencia de VHC por RCP en la saliva de pacientes con hepatitis crónica sin cuidado dental, observando que en la saliva de

dos de los seis pacientes que fueron evaluados se detectó el virus; relacionando el cuidado dental con la presencia del VHC

Pacientes estudiados en el Reino Unido (20) evidenciaron deterioro de su salud bucal en las que se incluye sangrado gingival, mal sabor, labios rotos y boca seca, en este mismo estudio reportan que un número de posibles causas para la reducción de fluido salival es la infección por VHC; la principal teoría incluye la filtración del virus en las glándulas salivales. El rol de la saliva como mecanismo de defensa en la cavidad bucal es conocido, la xerostomía predispone a los pacientes con VHC a lesiones de tejidos blandos. También hace énfasis en recordar que los pacientes con hepatitis C tienen una gran necesidad de salud bucal y que lo que más necesitan es educación y prevención, tanto para ellos como para las personas que los cuidan.

Dentro de los índices publicados por Henderson y col (2001), se establece que los pacientes del Oeste de Escocia con diagnóstico de VHC positivo, presentaron una pobre salud dental; del grupo estudiado el 69% presentó gingivitis. En este mismo reporte afirman que 2 pacientes que buscaron atención dental fueron discriminados por los odontólogos y uno se negó a recibir tratamiento odontológico después del diagnóstico; concluyen que la salud bucal de los pacientes con VHC es pobre y con grandes necesidades de atención profesional.

13. Hepatitis en relación con otras patologías

Diferentes estudios han relacionado la presencia del virus con otras entidades; en el estudio que realizó Henderson y col (2001), un número de anomalías de la mucosa bucal fueron observadas en los pacientes, en las que se incluye queratosis friccional, candidiasis hiperplásica, queilitis angular, pigmentación de la

mucosa bucal, petequias hemorrágicas, úlceras aftosas e inflamación de la salida del conducto de la glándula sublingual, así como con liquen plano bucal. El estudio de Carozzo (2001) relaciona la infección entre el VHC y enfermedades con manifestación extrahepática, como la crioglobulinemia, Porfiria cutánea tardía, sialoadenitis, disfunciones tiroideas, diabetes melitus, neuropatía periférica y liquen plano bucal.

JUSTIFICACION

Los resultados de este estudio, pueden contribuir a incrementar la evidencia a favor de las investigaciones realizadas que señalan la presencia del virus en saliva, la relación que pueda tener con la condición de salud bucal, así como la existencia de las bases biológicas para que ocurra la infección por esta vía. Todo lo cual estaría contribuyendo a despejar incógnitas y aportar conocimientos para los profesionales de la salud en el área de bioseguridad-bioética; así mismo, de corroborarse la afirmación planteada, proveer información sobre la importancia del cuidado bucal de los pacientes con VHC. Adicionalmente estimular la realización de nuevos estudios en esta misma línea de investigación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del virus Hepatitis C en la saliva, mediante la aplicación de la técnica de Transcriptasa Reversa de Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-RCP), en un grupo de pacientes infectados por este virus, que acuden a la consulta de Hepatología del Servicio de Gastroenterología del Ambulatorio Docente del Hospital Clínico Universitario de Caracas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Relacionar la presencia del Virus de Hepatitis C con las condiciones bucales.
2. Asociar la infección del Virus de Hepatitis C con la presencia de patologías bucales.
3. Relacionar la infección del Virus de Hepatitis C con el género, la edad y la vía de transmisión.
4. Asociar la presencia del Virus de Hepatitis C con el hábito de alcohol.
5. Determinar la presencia del Virus Hepatitis C en la saliva de pacientes que estén o no recibiendo tratamiento para este virus.
6. Analizar datos sociodemográficos de los pacientes infectados

III.-MATERIALES Y METODOS

1.- Material Biológico

Muestra de saliva no estimulada de pacientes con diagnóstico de VHC positivo provenientes de la consulta de Hepatología del Servicio de Gastroenterología del Ambulatorio Docente del Hospital Clínico Universitario de Caracas.

2.- Soluciones y Reactivos

Soluciones de Electroforesis:

- Tampón TBE 10X:
- Tris base= 108gr
- Ácido bórico= 27.5gr
- EDTApH 8.0= 20 ml

Soluciones de Carga

- Tampón muestras para ARN: (electroforesis para ácido nucleico)
- Azul de bromofenol 0.25%
- Xilene cyanol FF 0.25%
- Glicerol en agua 30%

Agarosa al 2%

- Agarosa 2gr
- TBE 1X 100ml

Extracción de ARN

- Trizol (Promega)
- Isopropanol 100%

- Cloroformo

Bromuro de Etidio 10 mg/ml

- Bromuro de Etidio = 10mg
- Agua destilada = 1ml

EDTA 0,5 M pH 8, o:

- Na₂ EDTA = 186,1gr
- 2H₂O = 800 ml
- Agua destilada para completar 1 litro
- NaOH = 20 gr
- NaOH= 5M

Estuche para detección de VHC:

Kit comercial para detección de VHC: VERSANT HCV GENOTYPE AMPLIFICATION KIT (LiPA). BAYER.

Estuche para PCR de Invitrogen Detección y tipado de virus de Hepatitis C mediante identificación genómica

3.- Equipos de Laboratorio

- Incubadora o baño ajustable a 37 °C, 55 °C y 100 °C.
- Termociclador
- Microplaca para colorimetría con capacidad de lectura 405 a 410 nm.
- Espectrofotómetro de luz UV.
- Nevera cava 4 °C
- Freezer en 20 °C

- Revco 70 °C
- Centrífuga refrigerada
- Estufa
- Horno de microondas o placa calefactora
- Vortex (agitador) campana de flujo laminar
- Cámara o cubeta de Electroforesis y accesorios
- Fuente de poder
- Balanza con exactitud 0.1°gr
- Autoclave
- Cámara de fotos Polaroid
- Transiluminador (LUVB)
- Estufa (Thelco)
- PH metro
- Tanque de Nitrógeno

4.- Materiales de Laboratorio

- Micropipetas de precisión de 2, 10, 200, y 1000 µl
- Puntas para micropipetas (blancas, amarillas, azules)
- Puntas de pipetas con filtro o desplazamiento positivos
- Tubos Eppendorf de 0.5ml y 1.5ml y de RCP
- Guantes desechables
- Gradillas para tubos de 0.5 y 1.5ml
- Películas Polaroid
- Viales de recolección y congelación de muestras
- Capilares (medición de concentración de ARN)
- Hojas de bisturí

5.- Metodología

5.1 Selección de la Muestra

Se llevó a cabo un estudio observacional, con una muestra de carácter opinático, debido a que estuvo condicionado a la participación de los pacientes.

A un grupo de 67 individuos provenientes de la consulta de Hepatología del Servicio de Gastroenterología del Ambulatorio Docente del Hospital Clínico Universitario de Caracas, todos con diagnóstico positivo para el Virus de Hepatitis C, por ELISA o ARN, se les realizó un interrogatorio de antecedentes, hábitos y un examen bucal clínico básico (observación clínica).

Los datos de los 67 pacientes participantes en el estudio fueron registrados en un formato elaborado previamente para tal finalidad.

Dentro de los factores que se evaluaron en cada paciente están:
Edad, sexo, posible ruta de infección, antecedentes familiares, tatuajes, alcoholismo, consumo de drogas, hábitos sexuales, exámenes realizados, tratamiento, acceso a cuidado bucal, examen extra e intrabucal básico, condición clínica periodontal.

Basados en la Escala Visual Básica (EVB) de Khurshudian (2003), se realizó una modificación que se denominó escala de valoración de la condición bucal, para estos pacientes, que se clasificó en tres grupos:

Buena:

Se consideró la condición bucal buena, cuando se observó: Ausencia clínica de sangrado, inflamación de las encías e irritantes locales tipo cálculo y detritos alimenticios, caries dental, uso o no de prótesis (fija o removible) en buen estado.

Regular:

Se consideró la condición bucal regular, cuando se observó: inflamación de las encías leve, irritantes locales tipo cálculo y detritos alimenticios moderados, ausencia de caries dental, uso o no de prótesis (fija o removible) estado, sin que causaran lesión, y ausencia clínica de caries.

Mala:

Se consideró la condición bucal mala, cuando se observó: inflamación de las encías de moderada a severa, irritantes locales tipo cálculo y detritos alimenticios de moderados a abundantes, presencia clínica de caries dental y cámaras pulpares expuestas al medio, uso o no de prótesis (fija o removible) en mal estado.

Se realizó un interrogatorio que consta de las siguientes preguntas: Nombre, Número de Historia, Edad, Antecedentes Quirúrgicos, Transfusiones, Familiares Hábitos de Alcohol, múltiples parejas, Drogas, Tatuaje, conducta sexual; además de identificar el método por el que se había realizado el diagnóstico de la infección y la carga, genotipo y exámenes como ecosonogramas y biopsias, así como si estaban sometidos a algún tipo de tratamiento. Se realizó un examen bucal en donde se observó la condición clínica bucal y la presencia o no de patologías bucales.

No se hizo distinciones referentes a edad, sexo, raza, nivel socioeconómico.

Del total de 67 pacientes, sólo 24 se ofrecieron para participar en el estudio del virus de Hepatitis C en saliva. Estos 24 pacientes completaron un formato de consentimiento informado (Anexo), aceptando su participación voluntaria en el protocolo de toma de muestra para la detección del genoma del viral en saliva.

Criterios de Exclusión:

Mujeres embarazadas, pacientes infectados con VIH-SIDA, VHB, VHA, Hepatitis Autoinmunes u otras enfermedades infecciosas.

5.2 Toma de la Muestra

Para la toma de muestra, se citaron los pacientes en ayunas y se les indicó que no realizaran ningún acto de higiene bucal como cepillarse los dientes o usar enjuagues en la mañana previa a la cita; de igual forma, se les indicó que no ingirieran ningún tipo de bebida o alimentos hasta la realización de la toma de muestra. A los 24 pacientes con Hepatitis C se les tomó muestras de saliva no estimulada; la saliva se colectó colocando un rollo de algodón dental (estéril) sublingual por un mínimo de 2 minutos o hasta que estuvo saturado de saliva (un aproximado de 1ml), se colocó en una inyectora estéril y se exprimió en un vial hasta completar 0.5ml aproximadamente, se congelaron las muestras a -70 °C, para luego ser procesadas.

6.- Procesamiento de la Muestra

6.1 Detección del ARN VHC en muestras de saliva

Para la detección de ARN VHC en saliva, las muestras fueron procesadas con el sistema comercial de Reacción en Cadena de Polimerasa VERSANT HCV GENOTYPE AMPLIFICATION KIT (LiPA) BAYER, el cual está diseñado para usar transcripción reversa y amplificación de la región 5' no traducida (untranslated o UTR) de Virus de Hepatitis C usando primers específicos para esa región.

Usando los "random primers" en el paso de la transcripción reversa se generan copias de ADN complementario a partir del ARN viral. El ADNc es amplificado usando dos "set de primers" para la nested-RCP produciendo un producto Biotinilado

6.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, se realizaron los siguientes pasos:

- a) Se tomaron 250 µl de saliva y se le añadieron 250µl de Trizol. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
- b) Se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezcló e Incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm 15 minutos.
- C) Luego, se transfirió el sobrenadante y se añadieron 500 µl de isopropanol. Se mezcló suavemente y se precipitó a -20 °C, por lo menos 10 minutos.
- d) Se llevó a centrifuga 10 minutos a 12000 rpm. Se dejó Secar.

6.3 Síntesis del ADNc

Para la síntesis de ADNc se realizaron los siguientes pasos:

Se resuspendió el pellet en la siguiente mezcla:

- 200 ng de random primers (concentración del stock 3 µg/µl) INVITROGEN
- 1,5µl de dNTP's Mix 10 mM
- Agua estéril tratada con DEPC hasta un volumen final de 12 µl

Luego:

a) Se calentó esta mezcla durante 5 minutos a 65 ° C. y se colocó en hielo para detener el proceso.

b) Se añadió la siguiente mezcla:

- 4µl de buffers First Strand 5X
- 2µl 0,1 M DTT
- 1µl de inhibidor ribonucleasa recombinante (Rnase out-40 U/µl).

c) Se mezcló e incubó a 42°C por 2 minutos. Se Añadió 1µl de RT (200U) y se incubó a 25°C por 10 minutos, y a 42°C por 50 minutos.

d) Se logró inactivar la reacción calentando a 70°C por 15 minutos.

6.4 Primera ronda de amplificación

Para la primera amplificación se realizó el siguiente procedimiento:

a) Se mezcló:

- 4,5µl de buffer Taq 10X
- 10µl outer HCV primers
- 0,75 µl de de dNTP's 10 mM
- 1U Taq polimerasa

- 5 μ l de $MgCl_2$ 25 mM
 - Agua destilada hasta completar 45 μ l
- b) Se añadieron 5 μ l de la mezcla de ADNc
- c) Se inició el programa de amplificación que consiste en colocara la muestra a:
- 94°C por un minuto
- 94°C por un minuto
- 55°C por un minuto
- 72°C por un minuto
- 72°C por un minuto
- } X40 CICLOS

6.5 Segunda amplificación

Para la segunda amplificación se realizó el siguiente procedimiento:

- a) Se mezclaron:
- 5 μ l de buffer Taq 10X
 - 10 μ l de nested HCV primers
 - 1 μ l de dNTP's 10 mM
 - 1U de Taq polimerasa
 - 3 μ l de $MgCl_2$ 25 mM (concentración final: 1,5 mM)
 - Agua destilada hasta completar 49 μ l (38,9 μ l)
- b) Se añadió 1 μ l de la primera amplificación
- c) Se amplificó siguiendo el mismo programa de la primera amplificación

7.- Genotipaje

Procesamiento de muestras de saliva de pacientes con Virus Hepatitis C con el kit INNOLIPA DE BAYER

7.1 Preparación de reactivos

- Todos los reactivos deben encontrarse a temperatura ambiente antes de usar.
- Se precalentó la solución de Hibridación (HS) y la solución Astringente (SW) por lo menos a 37 °C y no exceder la temperatura de hibridación. Es importante que todos los cristales se encuentren disueltos antes de usar.
- Se diluyó la solución de lavado (RS) 1: 5 en agua destilada o desionizada. Se preparó 8 ml por cada prueba más 10 ml en exceso.
- Se diluyó el conjugado (C) 1:100 en Diluyente del Conjugado (CD). Se preparó 2 ml por cada prueba más 2 ml de exceso. La solución puede ser preparada durante el lavado astringente.
- Se diluyó el Sustrato (S) 1:100 en Buffer Sustrato (SB). Preparamos 2 ml por cada prueba más 2 ml de exceso.

7.2 Genotipaje usando INNOLIPA HCV II. INNOGENETICS

Para el genotipaje se usaron tiras de nitrocelulosa las cuales tienen unidas de colas poly (T), que son específicas para el UTR 5' de los diferentes genotipos HCV.

Luego del paso de la hibridación, el ADN no hibridado fue eliminado mediante el lavado. La tira es incubada con un marcador conjugado de fosfatasa alcalina y estreptavidina, este se une al híbrido biotinilado "BCIP/ NBT cromogen" al colocar el sustrato, para formar un precipitado color púrpura a marrón cuando reacciona con el

complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina resultando en un patrón de coloración de bandas en la tira.

VERSANT HCV GENOTYPE AMPLIFICATION KIT (LiPA) BAYER tiene dos bandas control y 19 paralelos de prueba de AND, líneas que contienen secuencias específicas para genotipos de VHC del 1-6. La banda del control conjugado monitorea el color que desarrolla la reacción. La línea del control de amplificación mantiene pruebas universales que hibridizan al VHC amplicon. Los genotipos de Virus Hepatitis C están determinados por el alineamiento de las tiras de análisis con el VERSANT HCV GENOTYPE AMPLIFICATION KIT (LiPA) BAYER, leyendo y comparando la banda que acompaña las tiras de estudio con un sumario que permite hacer una interpretación.

7.3 Procedimiento

- Con la ayuda de pinzas, se removi6 el n6mero de tiras de INNO- LIPA HCV II a ser utilizadas e identificaron la misma por encima de la marca negra. Se debe incluir siempre una tira como control negativo (no agregar ADN).
- Se Determin6 el n6mero requerido de canales (1 por muestra) y se coloc6 en las bandejas.
- Se a6adieron 10 µl de soluci6n desnaturalizante (DS) en la esquina superior de cada canal. Es importante tapar el frasco inmediatamente despu6s de usar.
- Se a6adieron 10 µl de producto amplificado mezclando suavemente hacia arriba y abajo. Se dej6 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agit6 la soluci6n de hibridaci6n previamente calentada y suavemente se a6adieron 2 ml dentro de cada canal. Se mezcl6 suavemente teniendo cuidado de no contaminar muestras vecinas.

- Inmediatamente se colocó la tira con la línea marcada hacia arriba. Es importante que la tira se encuentre completamente sumergida en la solución; así como también el uso de guantes y pinzas.
- Se colocó la bandeja en el baño de agua con agitación a 50 grados C (aproximadamente a 80 rpm)
- Después de la hibridación se removió la bandeja del baño de agua.
- Se sostuvo la bandeja inclinada y se aspiró el líquido del canal, es preferible hacerlo con bomba de vacío.
- Se añadieron 2 ml de la solución astringente de lavado (SW) dentro de cada canal y se lavó balanceando la bandeja brevemente (10 a 20 segundos) a temperatura ambiente (20 a 25 grados C).
- Se aspiró la solución de cada canal.
- Se repitió el lavado.
- Finalmente se dejó incubar cada tira en 2 ml de solución astringente de lavado en el baño de agua con agitación a 50 °C por 30 minutos. Se cerró la tapa del baño de agua.
- Se diluyó el conjugado durante este paso.
- Todas las incubaciones que se llevaron a cabo a partir de este momento se realizaron a temperatura ambiente; así mismo es importante que tanto la tira como el líquido tengan un movimiento hacia delante y hacia atrás para lograr una tinción homogénea.
- Se lavaron cada una de las tira 2 veces por 1 minuto usando 2 ml de solución.
- Se añadieron 2 ml de conjugado a cada canal e incubar por 30 minutos en agitación.
- Se diluyo el sustrato antes de finalizar esta incubación.
- Se lavó cada tira 1 minuto usando 2 ml de solución de RS y se repitió una vez más usando 2 ml de 1 buffer sustrato (SB).

- Luego, se añadieron 2 ml de sustrato, se dejó incubar 30 minutos en agitación.
- Se detuvo el desarrollo de color lavando la tira 2 veces (2) con agua destilada en agitación por lo menos 3 minutos.
- Con la ayuda de pinzas se tomaron las tiras y se colocaron sobre papel absorbente para permitir que secase completamente antes de leer los resultados.
- Se guardaron en oscuridad según lo recomendado.

7.4 Análisis estadísticos

Las variables se analizaron a través de estadísticos descriptivos simples, análisis de frecuencias, tablas de contingencias y pruebas Chi-cuadrado de Pearson. Para todas las pruebas se escogió un nivel de significación del 5%. El procesamiento de los datos se realizó en hoja de cálculo Microsoft Excel y el paquete estadístico SPSS versión 10.0.

IV.- RESULTADOS

Población Estudiada

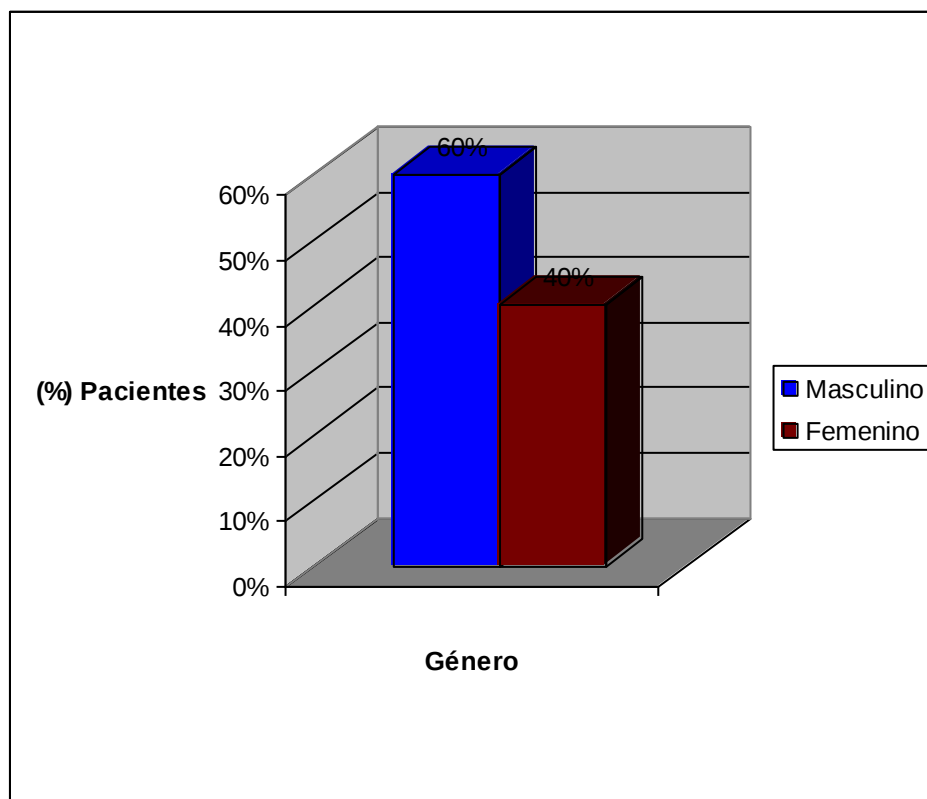
Para este estudio se evaluó la presencia de patologías así como la condición bucal de 67 pacientes que presentaban infección por Virus de Hepatitis C; de este grupo, 24 manifestaron su consentimiento para participar en el protocolo de toma de muestra para la detección del genoma viral en saliva de VHC.

El estudio se realizó en un grupo de pacientes que asistieron a la Consulta de Hepatología del Servicio de Gastroenterología del Ambulatorio Docente del Hospital Clínico Universitario. Caracas.

Se estudió una población de 67 pacientes VHC positivos, provenientes de la consulta de Hepatología del Hospital Universitario, Caracas, entre el año 2002 y 2004, de los cuales 60% (40/67) eran del género masculino y 40% (27/67) femenino, presentando una relación 2:1 (Gráfico 01).

Gráfico 01

Distribución de los pacientes infectados con el Virus de Hepatitis C según el género. HUC, Caracas, 2002-2004.

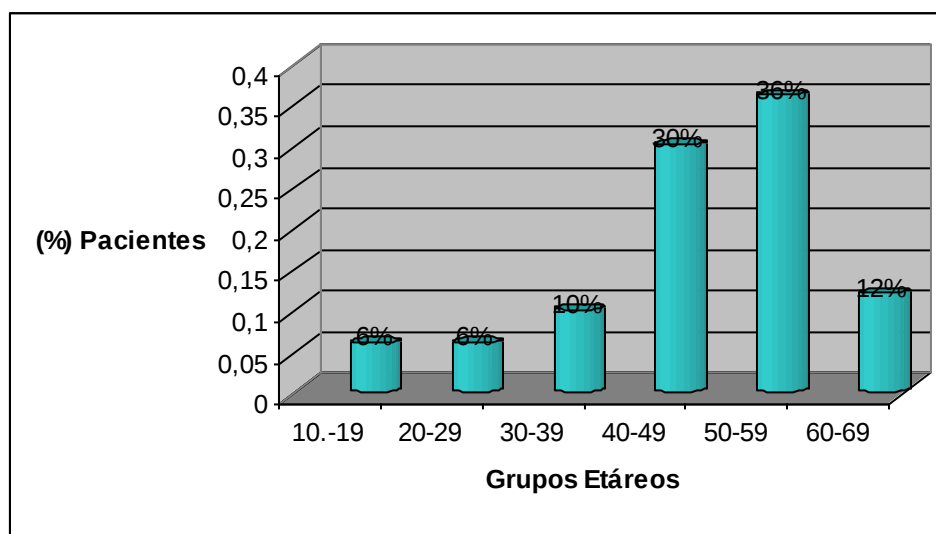


Fuente: Propia

En el Gráfico 02 se puede observar que el mayor número de pacientes infectados se ubicó en los rangos de edades comprendidas entre 40-49 (30%) y 50-59 con un 36%. También se presentaron 6% en el rango de 10-19 años. El grupo de pacientes evaluados presentó un rango de edad entre 10 años y 67 años siendo la edad promedio 46.6 ± 13.6 .

Gráfico 02

Distribución de los pacientes infectados con el Virus de Hepatitis C por edad. HUC, Caracas, 2002-2004.

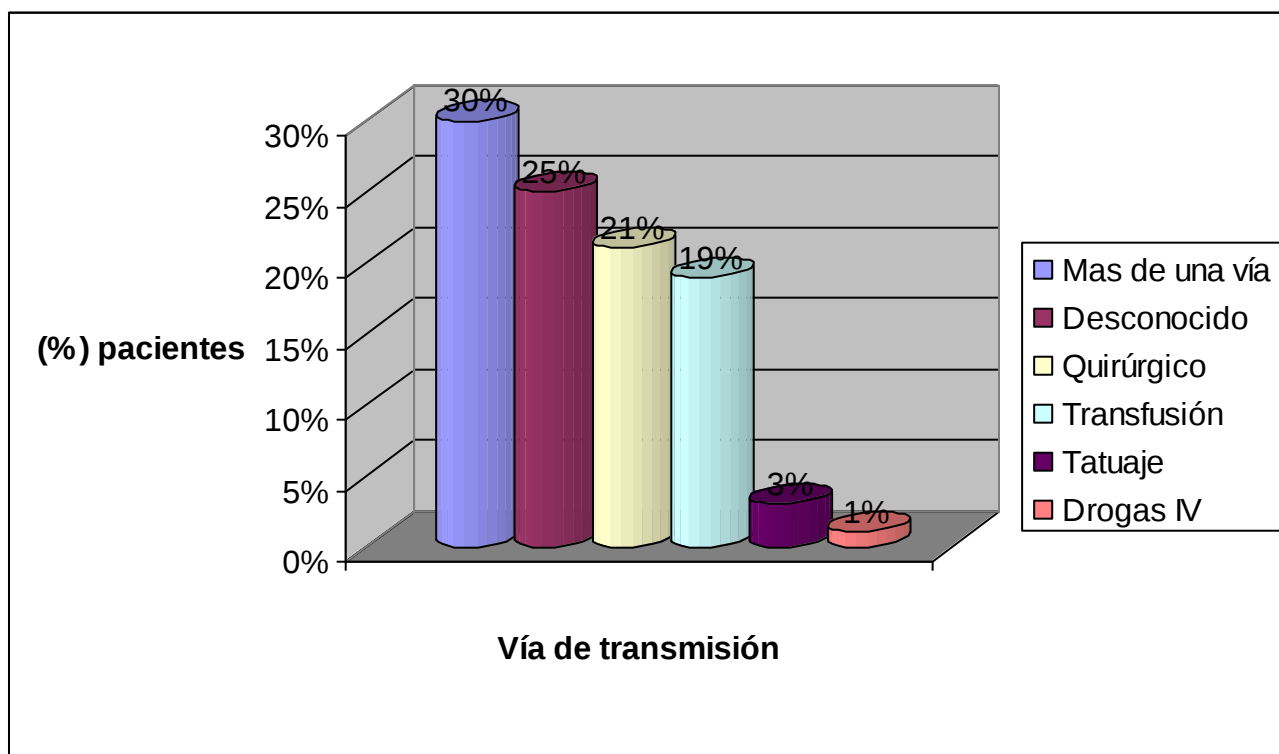


Fuente: Propia

En cuanto a la posible vía de transmisión de la infección del VHC, 21% (14/67) refirieron haberse contagiado posterior a tratamientos quirúrgicos; 20% (13/67) lo atribuyeron a transfusiones sanguíneas, 30% (20/67) lo adquirieron por más de una vía, el 25% (17/67) no conoce la ruta de infección, 3% (2/67) por tatuajes o maquillaje permanente y 1% (1/67) por uso de sustancias psicotrópicas intravenosas (Gráfico 03).

Gráfico 03

Vía de transmisión de los pacientes infectados de Virus de Hepatitis C. HUC, Caracas, 2002-2004.

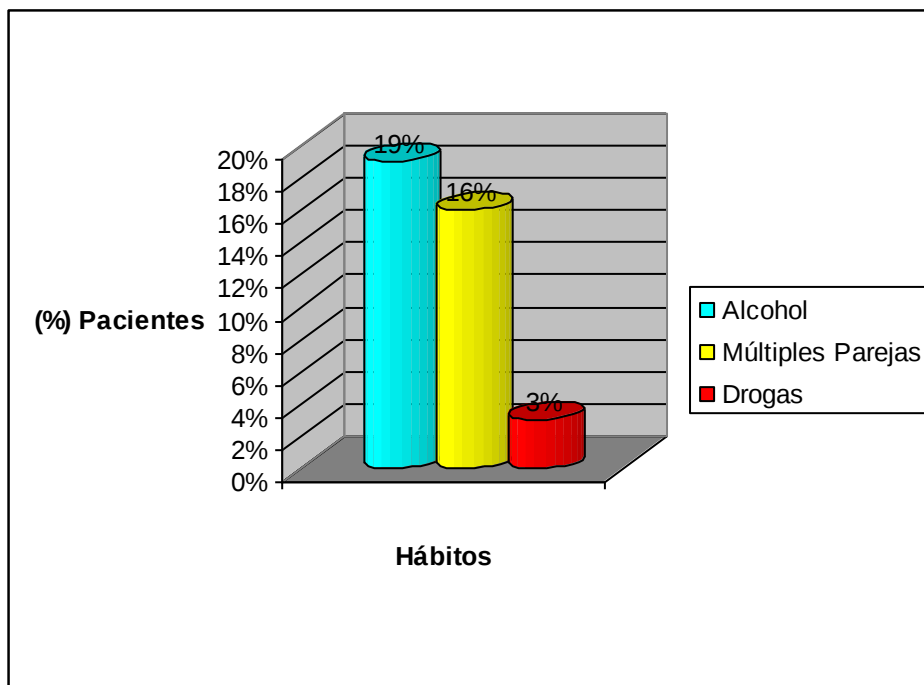


Fuente: Propia

Con respecto a los hábitos de los pacientes incluidos en el estudio, el 19% (13/67) refirió tener hábitos de consumo de alcohol, 16% (11/67) manifestó haber tenido relaciones sexuales con múltiples parejas y el 3% (2/67) usaban sustancias psicotrópicas inhaladas. Ninguno manifestó haber mantenido relaciones sexuales con parejas de su mismo sexo (Gráfico 04).

Gráfico 04

Distribución de los pacientes infectados con Virus de Hepatitis C en relación a los hábitos y la conducta sexual. HUC, Caracas, 2002-2004.



Fuente: Propia

Referente a la presencia de infección por el virus de Hepatitis C en el núcleo familiar el 7%(5/67) manifestó que algún miembro de la familia era portador del virus, de los cuales el 80% (4/5) refirió tener un hermano infectado y el 20% (1/5) la esposa (Tabla 01).

Tabla 01
Presencia de infección por el Virus de Hepatitis C en el núcleo familiar de los
pacientes. HUC, Caracas, 2002-2004.

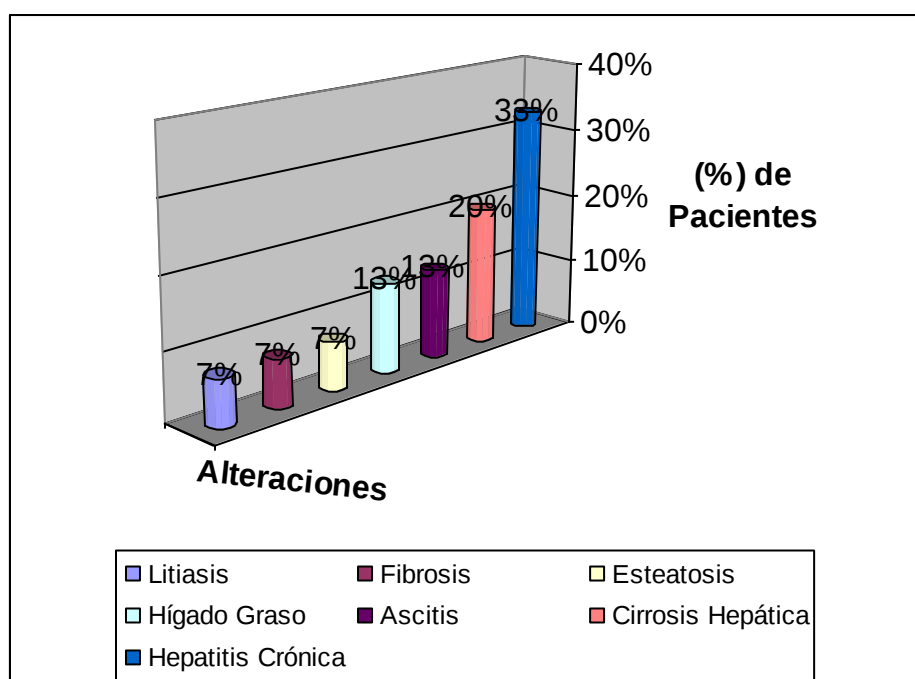
Parentesco	Pacientes	%
Hermano	(4/5)	80%
Cónyuge	(1/5)	20%
Total	(5/67)	7%

Fuente: Propia

Al evaluar los resultados de los exámenes complementarios de ecosonografía y biopsia por punción, se observó que el 22% (15/67) presentó algún tipo de alteración hepática, de estos el 33% (5/15) tenían Hepatitis crónica, el 20%(3/15) presentaron cirrosis hepáticas, 13% (2/15) mostraron hígado graso, un porcentaje similar de pacientes presentaron ascitis, esteatosis, y fibrosis representado en un 7%(1/15). En el 63%(42/67) restante no se observó enfermedad hepática (Gráfico 05)

Gráfico 05

Presencia de alteración o enfermedad hepática en los pacientes infectados con el virus de Hepatitis C. HUC, Caracas, 2002-2004.

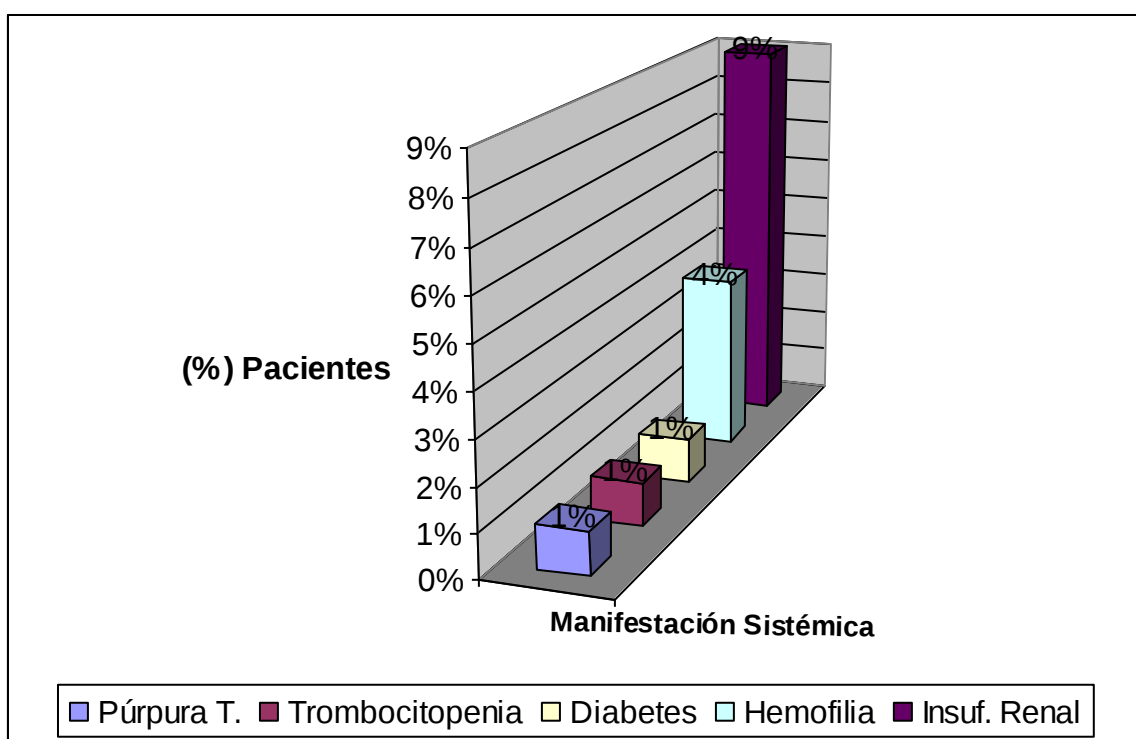


Fuente: Propia

En relación con la condición sistémica se observó que el 4% (3/67) eran hemofílicos, el 9% (6/67) tenían insuficiencia renal, uno era diabético, uno presentó púrpura trombocitopénica y el otro trombocitopenia (Gráfico 06).

Gráfico 06

Manifestaciones sistémicas o extra-hepáticas que presentaron los pacientes infectados de Virus de Hepatitis C. HUC, Caracas, 2002-2004.

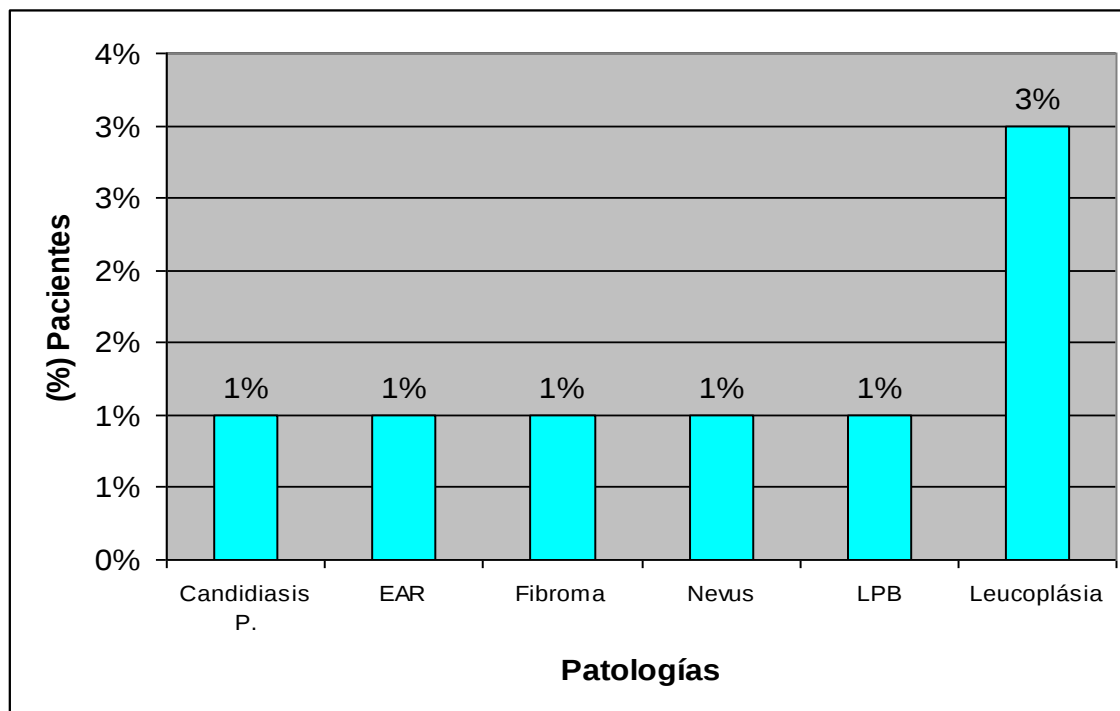


Fuente: Propia

Al examen clínico los pacientes evaluados presentaron entidades con las siguiente impresión diagnóstica: un paciente con Estomatitis Aftosas Recurrentes (EAR), 3% (2/67) con Leucoplasia, uno presentó Fibroma Traumático, uno Nevus, uno Candidiasis Pseudomembranosa y otro Liquefación Plano Bucal. Se corroboró sólo microscópicamente el diagnóstico de Nevus y microbiológicamente el de Candidiasis (Gráfico 07).

Gráfico 07

Distribución de los pacientes VHC positivos en relación a la presencia de lesiones bucales. HUC, Caracas, 2002-2003.



Fuente: Propia

PROTOCOLO DE HEPATITIS C EN SALIVA

**Evaluación de los pacientes infectados con VHC pertenecientes al protocolo de detección del Virus de Hepatitis C en Saliva mediante la técnica TR-RCP.
HUC, Caracas, 2004.**

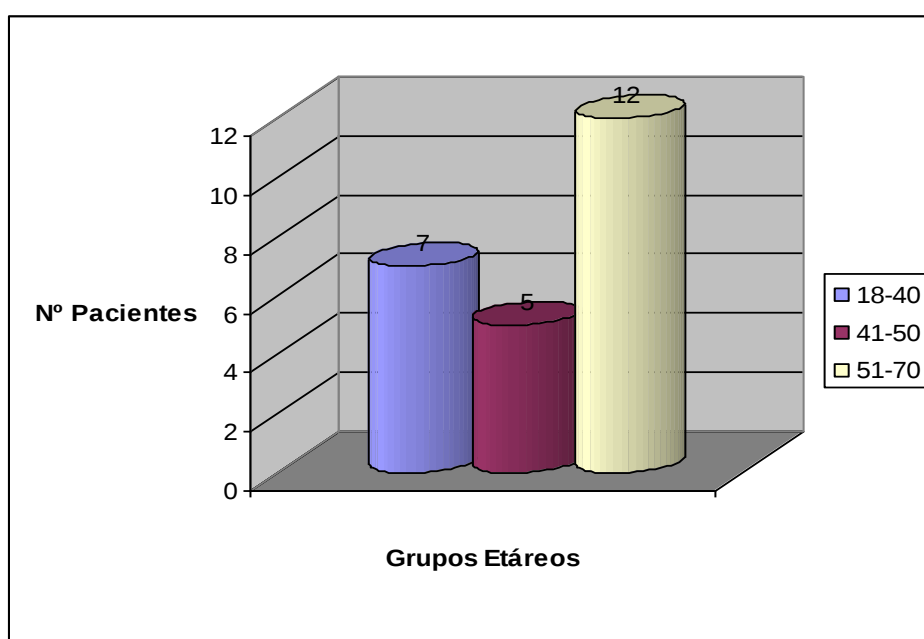
De los 67 pacientes evaluados, 24 participaron en el protocolo para la detección del Virus de Hepatitis C en saliva (**VHC/Saliva**), a los cuales se les tomó una muestra de saliva según el método anteriormente descrito.

El grupo en estudio se compone de 12 pacientes que pertenecían al género masculino y 12 al género femenino.

El grupo en estudio presentó un rango de edad entre 18 y 67 años, con un promedio de edad de 45.88 años $\pm$ 13.94 ($X \pm dt$), el 30% (7/24) se ubicó en el rango de edad entre 18-40, el 20% (5/24) en el rango de 41-50 y el resto 50% (12/24) entre 51-70 (Gráfico 08).

Gráfico 08

Distribución de los pacientes del protocolo (VHC/Saliva) por edad. HUC, Caracas, 2002-2004.



Fuente: Propia

Análisis Molecular del Virus de Hepatitis C en saliva de pacientes infectados, mediante la técnica TR-RCP. HUC, Caracas, 2002-2004.

El ARN extraído de la saliva de los pacientes (n=24) que fueron positivos para la presencia de genoma viral, mostraron una banda entre 260 y 300 pares de base (pb) característica de la amplificación de la región 5' delimitada por los oligonucleótidos iniciadores como resultado de la "nested RCP". Además se pudo observar una banda de 261 pb correspondiente al producto de amplificación del control positivo.

En las electroforesis de agarosa se pueden observar pacientes que fueron positivos y negativos en saliva para la presencia del virus de hepatitis C (Foto 1: A, B, C, D).

Análisis Molecular del genotipo del Virus de Hepatitis C de las muestras positivas en saliva mediante la técnica TR-RCP. HUC, Caracas, 2002-2004.

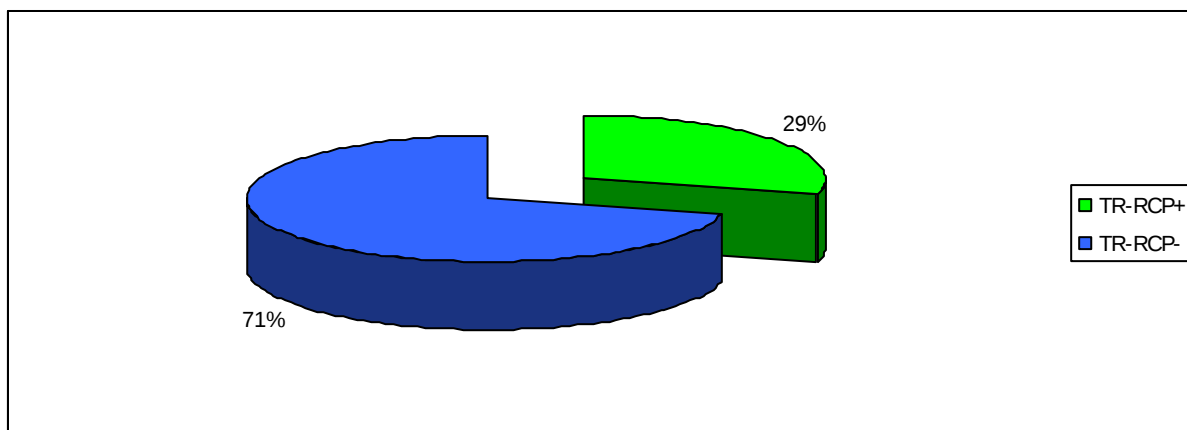
El genotipaje se realizó en las 7 muestras positivas empleando las tiras de nitrocelulosa del kit IMNOLIPA HCV, en la plantilla 1 se puede observar la escala predeterminada correspondiente a los tipos y subtipos virales molecularmente conocidos; en la misma se visualizan la tira de nitrocelulosa con dos bandas en la posición 5 y 6 correspondiente al genotipo 1a – 1b. El patrón 2 refleja una banda a nivel 9 y 11 siendo el genotipo 2a – 2c. En los patrones 3 y 4 se observaron bandas en la posición 5 y 7 correspondiendo el subtipo 1a y 1b respectivamente. En todas las tiras se detectó una banda a nivel 2 identificando el control positivo de cada una de las pruebas. De las 7 muestras de saliva positivas, se obtuvo que el 57% (4/7) presentaron el genotipo 1a/1b, mientras que los 3 restantes resultaron 1a, otro con 1b, y el último con sub-tipo 2a-2c.

En las muestras analizadas por la técnica de TR-RCP se obtuvo que de las 24 muestras de saliva provenientes de los pacientes infectados que asistieron al Servicio de Gastroenterología, entre enero 2003 y enero 2004, 7/24 resultaron positivas para la presencia de genoma viral en saliva (29%), mientras que 17/24(71%) fueron negativos (Gráfico 09).

Gráfico 09

Resultados de la detección del VHC en saliva mediante la técnica TR-RCP.

HUC, Caracas, 2002-2004

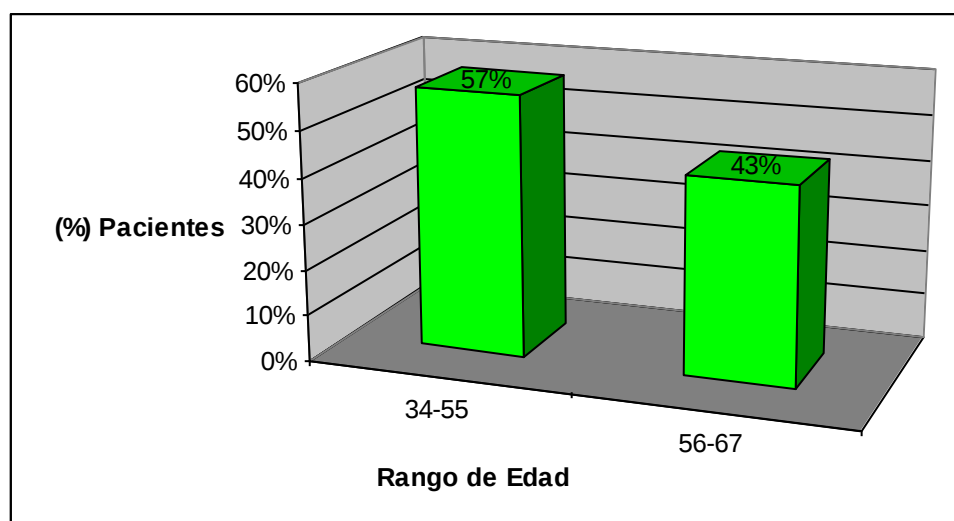


Fuente: Propia

En el grupo de siete pacientes, en cuyas muestras de saliva se detectó el genoma de VHC, el 57%(4/7) se ubicó en un rango de edad entre 34-55 años, seguido por el 43%(3/7) que se ubicó entre 56 – 67 años (Gráfico 10).

Gráfico 10

Distribución por edad de los pacientes VHC Positivos en saliva mediante la técnica TR-RCP. HUC, Caracas, 2002-2004.

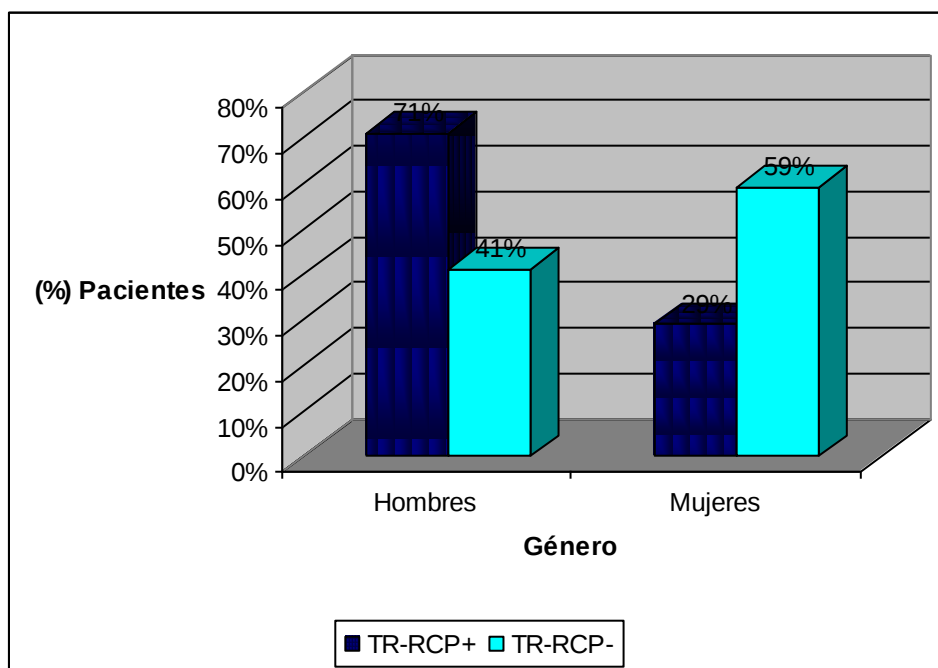


Fuente: Propia

Del total de los pacientes a los que se les detectó el Virus de Hepatitis C en saliva el 71% (5/7) pertenecen al género masculino y el 29% (2/7) al género femenino, en contraste con los pacientes negativos para el genoma viral, de los cuales el 41% (7/17) fueron del género masculino y el resto, 59%(10/17) al femenino (Gráfico 11).

Gráfico 11

Distribución por género de los pacientes VHC positivos en saliva mediante la técnica TR-RCP. HUC, Caracas, 2002-2004.

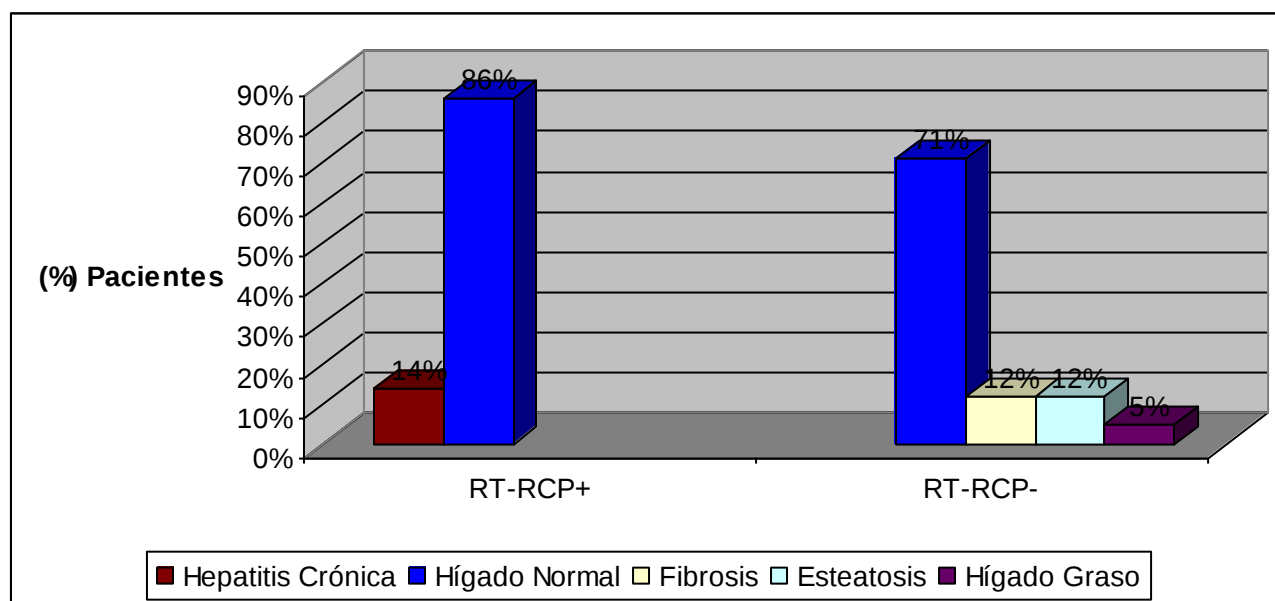


Fuente: Propia

Al evaluar los resultados de los exámenes complementarios realizados al tejido hepático de los pacientes VHC positivo en saliva, se observó que el 14% (1/7) presentó Hepatitis crónica y el 86% (6/7) un hígado aparentemente normal, en comparación los resultados de los pacientes a los que no se les detectó el virus que se distribuyó de la siguiente manera, 12%(2/17) presentaron fibrosis, 12%(2/17) presentaron esteatosis, solo el 5%(1/17) presentó hígado graso y al 71%(12/17) no se les observó alteración (Gráfico 12).

Gráfico 12

Presencia de alteración o enfermedad hepática en los pacientes VHC positivo en saliva mediante la técnica TR-RCP. HUC, Caracas, 2002-2004.

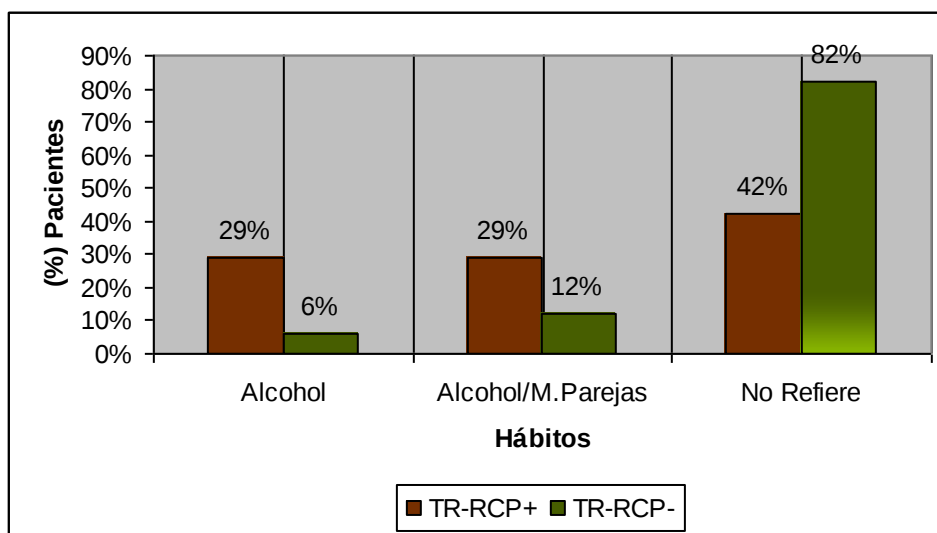


Fuente: Propia

En cuanto a los hábitos y la conducta sexual que refirieron los siete pacientes en los que se detectó ARN VHC, el 29% (2/7) refirieron hábitos de alcohol, 29%(2/7) manifestaron hábito de alcohol y haber tenido relaciones sexuales con múltiples parejas, el 42% (3/7) restante no manifestó estos hábitos; en comparación con los pacientes negativos para el genoma del Virus Hepatitis C en saliva el 6%(1/17) manifestó hábito de alcohol, el 12%(2/17) manifestaron los hábitos de alcohol y haber tenido relaciones sexuales con múltiples parejas, 82% (14/17) refirieron no tener estos hábitos. (Gráfico 13).

Gráfico 13

Distribución en relación con los hábitos y la conducta sexual de los pacientes Virus Hepatitis C positivos en saliva mediante la técnica TR-RCP. HUC, Caracas, 2002-2004.



Fuente: Propia

En la tabla 02 se aprecian los resultados referente al tipo de lesión bucal de acuerdo con la presencia del virus. De los 21 pacientes que no presentaron lesiones en cavidad bucal el 33%(7/21) fueron positivos para la detección del genoma viral en saliva, mientras que los 3 que tenían patologías bucales fueron negativos para el virus.

Tabla 02

Relación entre el tipo de lesión bucal y la detección del Virus de Hepatitis C en saliva mediante la técnica TR-RCP. HUC, Caracas, 2002-2004.

	Nevus		EAR
TR-RCP+	0	0	Total
TR-RCP-	1	2	7
Total	1	2	17

Fuente: Propia

En relación con la condición sistémica se observó que el 33% que no tenían manifestaciones sistémicas (7/21) fueron positivos para la detección del virus de hepatitis C en saliva, mientras que en los 3 pacientes que presentaban manifestaciones extrahepáticas no se observó presencia viral como se muestra en la Tabla 03

Tabla 03
Manifestaciones sistémicas o extra-hepáticas asociadas a los pacientes del protocolo VHC/Saliva. HUC, Caracas, 2002-2004.

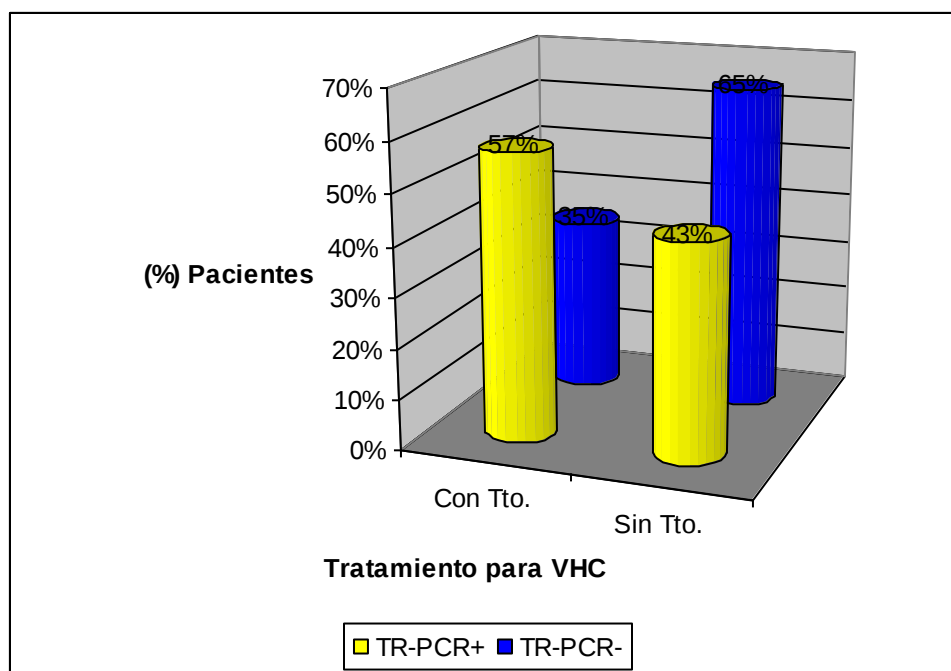
	Sin Manifestación	Con Manifestación		
		Hemofilia	Diabetes	Total
TR-RCP+	7	0	0	7
TR-RCP-	14	2	1	17
Total	24	2	1	24

Fuente: Propia

De este grupo se observó que el 57% (4/7) se encontraban recibiendo tratamiento, el 43%(3/7) no tomaba tratamiento para el Virus Hepatitis C, en comparación con el grupo a los que no se les detectó el genoma en el que se observó que el 35% (6/17) estaba recibiendo tratamiento para la hepatitis y el 65% (11/17) se encontraban sin tratamiento (Gráfico 14).

Gráfico 14

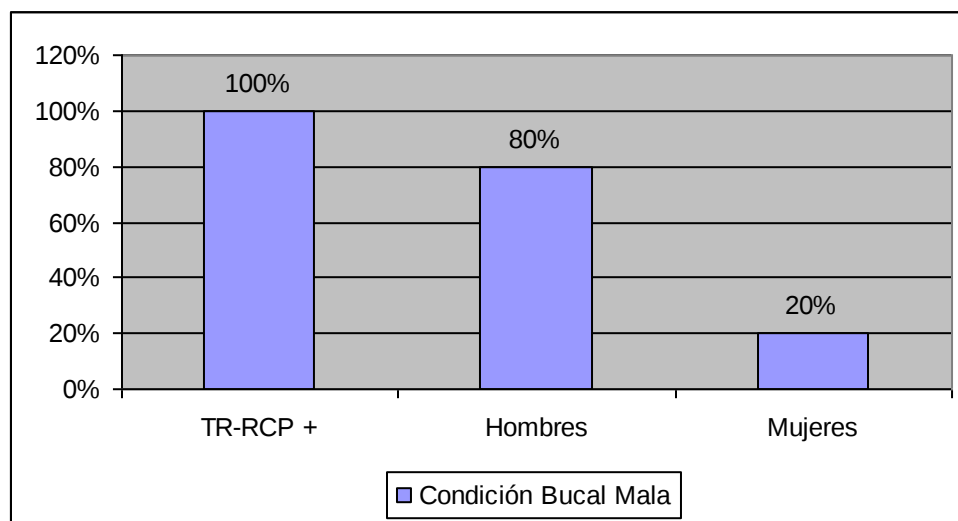
Distribución según tratamiento en relación a la terapia de los pacientes VHC positivos en saliva mediante la técnica TR-RCP. HUC, Caracas, 2002-2004.



Fuente: Propia

El examen clínico bucal, de los pacientes positivos en saliva, el 100% (7/7) presentó una condición bucal mala, mostrando significación estadística ($p > 0.05$), mientras que en el grupo que no se detectó el virus el 18% (3/17) presentaron una condición bucal buena y el 82% (14/17) regular. Se observó mejores condiciones bucales en mujeres que en hombres (Gráfico15).

Gráfico 15
Evaluación según la condición bucal y género
de los pacientes VHC positivos en saliva mediante la técnica TR-RCP. HUC,
Caracas, 2002-2004.



Fuente: Propia

En el grupo de 7 pacientes positivos para la detección del genoma viral en saliva, mediante la técnica TR-RCP, ninguno manifestó tener familiares que padecieran infección del Virus de Hepatitis C.

V DISCUSIÓN

La hepatitis es una inflamación del hígado que puede ser causada por alcohol, bacterias, drogas, traumas y virus, entre ellos el VHC pertenece a la familia *Flaviviridae*, siendo un virus pequeño con genoma ARN monocatenario; es hepatotrópico y linfotrópico que se replica directamente en el hepatocito (1), con una extraordinaria variabilidad genética que posiblemente le permite escapar de la respuesta inmunológica del hospedero. Se conocen varios genotipos de este virus (1, 10).

Las rutas de infección de este virus son principalmente por vía parenteral (1). Otros autores sugieren que existen otras maneras de contagio como accidentes laborales, transfusiones sanguíneas, hemodiálisis y compartir jeringas; esta última está en relación con el hábito de consumo de drogas intravenosas (7, 9, 11, 15, 17). Igualmente, Takamatsu y col (1990) refieren otros fluidos como portadores del virus, planteando la posibilidad de que la saliva sea una importante vía de contaminación por sus características y contenido. Por último, otros estudios sugieren que el contacto sexual y las relaciones sexuales con múltiples parejas pueden ser otra vía de contagio (15, 18). La transmisión vertical parece poco probable (1).

Clínicamente el paciente infectado con el VHC puede presentar síntomas gastrointestinales y constitucionales (19), aunque en algunos casos puede cursar inadvertida (1, 20, 21). En el 80% de los casos la enfermedad se hace crónica y se relaciona con cirrosis hepática y cáncer hepático. (20, 21)

El VHC puede estar relacionado con otras entidades extrahepáticas como Crioglobulinemia Mixta, Glomérulo nefritis Membranoproliferativa, Porfiria Cutánea Tardía, Enfermedad Tiroidea Autoinmune, Síndrome Proliferativo, Síndrome de Sjögren, Linfoma No Hodking, Diabetes Mellitus y Liquen Plano, siendo esta última la más estudiada en relación con la cavidad bucal. (2, 4, 6,14, 32)

La aparición de enfermedades hepáticas y extra-hepáticas por VHC ha estimulado la investigación en este campo del conocimiento, ya que se estima que el 3% de la población mundial, como lo registra la Organización Mundial de la Salud, está contaminada con el VHC; de allí la importancia que se le asigna a los estudios que buscan establecer de los diversos factores asociados con esta enfermedad infecto-contagiosa.

La investigación en relación con las vías de transmisión y las rutas de contagio de la infección por VHC, se ha incrementado desde la década de los años noventa, debido a los avances en técnicas de biología molecular. Sin embargo, los reportes conducen a afirmar que los resultados obtenidos hasta el presente no son categóricos en cuanto a las vías y mecanismos de transmisión, permaneciendo controversiales aún los relativos a las rutas de contagio.

Por otra parte, investigaciones llevadas a cabo confirman que con la aplicación de diversos métodos, siendo el PCR el más utilizado y específico, se puede aislar el VHC en la saliva de pacientes infectados, lo que resulta de suma importancia para alcanzar el objetivo del presente trabajo, permitiendo determinar el grado de asociación del VHC con la condición bucal y con la posible presencia de patologías bucales, así como su relación con hábitos de adicción, conductas sexuales y otros factores. (24)

En este estudio se realizó un análisis de las características de la población conformada por el grupo de 67 pacientes infectados con VHC que fueron evaluados en la consulta de Hepatología del Servicio de Gastroenterología, del Ambulatorio Docente del Hospital Universitario de Caracas.

El género de los sujetos estudiados no constituyó un factor discriminatorio para determinar la vía de transmisión mediante la cual hombres y mujeres se infectaron con VHC, debido a que, según las respuestas acerca de los antecedentes, las vías de contaminación fueron similares para hombres y mujeres. En cuanto a la posible vía de transmisión de la infección del VHC, 21% refirió haberse contagiado posterior a tratamientos quirúrgicos; 20% lo atribuyó a transfusiones sanguíneas, 30% lo adquirió por más de una vía, el 25% no conoce la ruta de infección, 3% por tatuajes o maquillaje permanente y 1% por uso de sustancias psicotrópicas intravenosas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Klein y col (1991); Wang y col, (1992); Fried y col, (1992); Young y col, (1993); Maticic y col, (2001). Sin embargo difieren de los reportados por Rapicetta y col (1992) con respecto a la transmisión por antecedentes quirúrgicos, ya que estos autores no encontraron relación entre la adquisición del VHC y cirugía efectuada a los pacientes.

Llama la atención que sólo uno (1) de los pacientes admitió haber usado drogas intravenosas y haber compartido jeringas, en tanto que en los reportes de Henderson y col (2001) y Van Doornum y col (2001), una alta proporción de sujetos a quienes se les detectó anticuerpos Anti- VHC, expresó haber usado drogas intravenosas, además de compartir jeringas. Probablemente la discrepancia de los resultados de este estudio, en el que se puede inferir que los hábitos de adicción a las drogas no se relacionan con la infección de Virus Hepatitis C, en comparación con los realizados fuera de Venezuela, obedezca a prejuicios para decir la verdad en relación

con este delicado tema de la drogadicción o al libre expendio de las jeringas en las farmacias.

Los resultados de este trabajo en cuanto al género coinciden con los reportados por Rapicetta y col (1992), quienes no encontraron relación estadística significativa entre el VHC y el género de los pacientes evaluados, es decir, esta infección se presentó por igual entre hombres y mujeres, aunque en el grupo estudiado se observó un mayor porcentaje de hombres con Hepatitis C.

El grupo etéreo, los pacientes presentaron un rango de edad entre 10 y 67 años; el promedio de edad fue de 46 años. Como puede observarse, el rango de edad de los pacientes fue bastante heterogéneo, destacándose que 5 tenían edades comprendidas entre 10 y 20 años, lo cual evidencia que adquirieron la enfermedad a temprana edad.

Sin embargo, Rapicetta y col (1992) encontraron en su estudio, de 1.484 muestras de suero provenientes de pacientes infectados con VHC, que el rango de edad en donde se agrupó una alta proporción de sujetos fue entre 50-59 años, reflejando una contaminación de los pacientes en edades más avanzadas.

El promedio de edad de los pacientes infectados (46 años) puede ser relacionado con el hecho de que el porcentaje que refirió transfusiones sanguíneas, las recibió en la década de los 80, época en la cual no existían pruebas moleculares de diagnóstico para detectar el virus, como lo confirma Maroto y col (2000).

La mayoría de los trabajos revisados para apoyar teóricamente esta investigación no enfatizan la edad de los sujetos como una variable importante para

establecer los rangos en donde predominan las infecciones por VHC, asunto que pudiera ser útil para orientar las acciones de prevención contra la infección.

Los hábitos y la conducta sexual de la población estudiada, el 19% refirió tener hábito de consumir alcohol, el 3% admitió el consumo de drogas por inhalación y el 16% manifestó haber tenido contacto sexual con múltiples parejas. Cabe destacar que ninguno de los sujetos reportó haber mantenido relaciones sexuales con parejas de su mismo sexo. Acerca del consumo de alcohol, Rasicetta y col (1992) no consiguieron asociación entre VHC y este tipo de adicción en los pacientes que estudiaron.

Autores como Klein y col (1991) y Alter y col (1997) aseguran que el contacto sexual y las relaciones homosexuales podrían estar involucrados en el proceso de contagio. En el presente estudio se reflejó que las conductas sexuales tienen poca asociación como vía de transmisión de esta enfermedad, esto se apoya en el hecho que muy pocos de los pacientes refirieron mantener o haber mantenido relaciones sexuales con múltiples parejas, y ninguno manifestó relaciones con personas de su mismo sexo.

Cuando se solicitó información acerca de otros miembros del núcleo familiar infectados por VHC, sólo el 7% manifestó que algún familiar era portador del virus, lo cual sugiere que a través de la transmisión horizontal es muy poco probable el contagio de VHC en los miembros de un mismo grupo familiar, sin embargo cabe destacar que de los 5 miembros familiares infectados 4 resultaron ser hermanos y solo 1 fue cónyuge.

La presencia de alteración o enfermedad hepática en los pacientes con VHC se determinó mediante exámenes complementarios al tejido hepático, tales como

ecosonograma y biopsia hepática con punción; se observó que el 22% presentó algún tipo de alteración hepática, de estos 33% tenían Hepatitis Crónica, el 20% Cirrosis Hepáticas, 13% mostró hígado graso, igual porcentaje presentó ascitis, esteatosis, litiasis y fibrosis, en el grupo restante representado por el 63% no presentó alteración hepática. Como puede observarse, es alto el número de pacientes que no presentó problemas hepáticos.

En lo concerniente a las manifestaciones sistémicas o extra-hepáticas asociadas a los pacientes VHC positivos, se encontró que el 9% padecía de insuficiencia renal, el 4% eran hemofílicos, solo uno era diabético, otro presentaba púrpura trombocitopénica y otro trombocitopenia.

En vista que estos pacientes están permanentemente expuestos a requerir transfusiones sanguíneas y diálisis, es lógico pensar que estos procedimientos exponen a los pacientes a la infección con VHC; por consiguiente, es importante que se profundice en estudios que consideren estas variables.

La evaluación de la cavidad bucal de los pacientes infectados con Hepatitis C permitió determinar que sólo 7 pacientes (9%) presentaron entidades sugerentes de patológicas, de las cuales un paciente presentó Estomatitis Aftosa Recurrente, el 3% presentó Leucoplasia, uno Fibroma Traumático, uno Nevus, el otro Candidiasis Pseudomembranosa y por último uno presentó Liquen Plano Bucal.

Recientemente un número de estudios han sugerido una fuerte asociación entre la infección del Virus Hepatitis C y la presencia de Liquen Plano Bucal (LPB), (2, 20), esto se debe a lo observado en este estudio realizado con pacientes afectados por la infección por el VHC, que presentaron una alta incidencia de LPB. También se

ha reportado una aumentada prevalencia de infección por este virus en grupos de italianos con lesiones de Liquefación Plano cuando se comparó con la población normal local, sugiriendo que estos dos desórdenes van estrechamente relacionadas, además los autores mencionan a la conexión que existe con el alelo del complejo de mayor histocompatibilidad (HLA-DR6), presente en pacientes que padecen las dos patologías en Italia. Esta característica genética probablemente predispone a la mencionada asociación, lo que podría explicar la razón por la cuál en la población de nuestro estudio, no se observó dicha manifestación en cavidad bucal relacionada con el VHC. Probablemente los factores geográficos y genéticos promueven su aparición y distribución.

En el presente estudio un bajo porcentaje, el 8%, de los pacientes presentaron lesiones bucales, lo que podría indicar que la infección por el Virus de Hepatitis C no predispone al desarrollo de estas entidades. Sin embargo, un estudio realizado por Henderson y col (2001) en el Reino Unido, reportaron un número de anomalías de la mucosa bucal observadas en pacientes, entre los cuales encontraron Queratosis Friccional, Candidiasis Hiperplásica, Queilitis Angular, Pigmentación de la mucosa bucal, Petequias Hemorrágicas, Estomatitis Aftosa Recurrente, inflamación de la salida del conducto de la glándula sublingual. Estos autores encontraron que el 20% de la población evaluada presentó LPB.

Algunas de las anomalías de la cavidad bucal observadas en este trabajo coinciden con las reportadas por Henderson y col (2001). Tomando en cuenta que existe un escaso número de estudios que apoyen la relación entre VHC y diversas lesiones bucales. Se hace necesario incrementar las investigaciones específicas con respecto a las lesiones en las instituciones dispensadoras de salud bucal.

La vía de transmisión del Virus Hepatitis C establecida, es la diseminación percutánea, incluyendo transfusiones sanguíneas, sin embargo un gran número de casos no tienen una ruta discernible de exposición parenteral. De hecho existen estudios que muestran que aproximadamente el 50% de los casos desconocen exposición parenteral (4). La presencia del virus en fluidos del cuerpo y la transmisión por contacto sexual han sido bien documentados en Hepatitis B, mientras que siguen siendo incierto para el Virus C, debido a que las evidencias para la transmisión sexual de la Hepatitis C provienen de los estudios epidemiológicos realizados en las parejas sexuales de los pacientes con Hepatitis C.

En los casos de adquisición no parenteral de la infección del Virus de Hepatitis C, se hace necesario plantear otras rutas de diseminación del virus distintas a la vía de transmisión sexual.

En la última década varios investigadores han reportado la presencia del genoma viral en saliva reportado por Takamatsu y col (1990); Klein y col (1991); Liou y col (1992); Chen y col (1995) lo que podría proveer las bases biológicas para la transmisión de este virus por saliva contaminada, pudiéndose convertir en una ruta de transmisión en algunos casos donde no existe antecedente.

En el presente trabajo empleando técnicas de alta sensibilidad y especificidad como lo es la TR-RCP se pudo determinar la presencia del genoma viral del Virus Hepatitis C en 29% de las muestras de saliva provenientes de pacientes infectados con este virus.

Datos que reflejan un mayor número de pacientes positivos en saliva (50%) fueron reportados por Liou y col (1992) en un estudio de 14 pacientes, de los cuales 7

presentaron ARN-VHC en saliva, resultados que se correlacionan fuertemente con un alto nivel de viremia en pacientes con Hepatitis C aguda y crónica.

Estos autores plantean que los mecanismos de aparición del Virus de Hepatitis C en saliva todavía no se han podido dilucidar, debido a que existen evidencias que indican la presencia de ARN-VHC en saliva en ausencia de sangre oculta, y también habiendo descartado la contaminación de la saliva por sangre, lo que permite sugerir que ocurre una transudación de fluidos que contienen el virus desde la circulación general hacia los fluidos del cuerpo, en lugar de ocurrir una replicación activa del virus en el sitio de la secreción, esto podría explicar la baja eficacia de la transmisión del VHC no parenteral por las evidencias de infecciones de parejas reportadas, en los trabajos realizados con las esposas de pacientes infectados por Everhart y col, 1990.

Existen diferentes publicaciones en las que se reporta que se ha aislado el ARN VHC tanto en saliva como en fluido gingival (3, 4, 6, 9, 15), al punto de considerar que el VHC tiene relación con la enfermedad periodontal ya que se aisló en fluido gingival. (11).

Estudios realizados han demostrado que el líquido gingival o fluido crevicular es un exudado inflamatorio, no un trasudado continuo, en donde hay un paso de materiales desde los vasos sanguíneos hacia el tejido conectivo a través del epitelio del surco. Este fluido está compuesto por bacterias, células epiteliales descamadas, y leucocitos que migran a través del epitelio del surco. Se encuentra correlación entre los componentes y la gravedad de la inflamación, así mismo se ha reportado la presencia de neutrófilos en los vasos sanguíneos del tejido conectivo adyacente que bajan atravesando hacia el epitelio del surco gingival. (28)

La enfermedad periodontal en las diferentes etapas induce a la migración de células; en algunos casos se ha atribuido un continuo transudado de suero hacia la cavidad bucal a través de la unión de la encía marginal con el diente. Desde que se inicia la inflamación, la sangre contenida en el fluido crevicular puede reflejar actividad inflamatoria local y contener sangre periférica que es transportado a la boca desde el fluido crevicular atravesando la encía (11). En este mismo estudio se reporta que el 47% de las células somáticas en el surco gingival migran constantemente en periodontos sanos y en inflamados. Estos autores reportan un dato curioso, es que la sangre está presente en 50% de los pacientes que estudiaron, aún estando sano y sin lesiones visibles de la mucosa bucal.

En la década de los 90 Young y col (1993), detectaron el ARN VHC de células sanguíneas mononucleares periféricas, y señalan que ocurre replicación viral; estas células cuando están infectadas, migran hacia el periodonto en los procesos de inflamación (9, 17), en este último trabajo reportaron que en una investigación con 50 pacientes con hepatitis crónica y con un elevado número de anticuerpos anti-VHC y presencia de ARN-VHC, en donde se estudiaron CMPS, saliva y suero, se estableció que 7 pacientes fueron positivos para la presencia del genoma viral en células, saliva y suero, 5 sólo en células, 18 en saliva y suero, 16 sólo en suero y 4 en ninguna de las tres, todo lo cual evidencia que en los pacientes con hepatitis crónica, la presencia del ARN en CMPS y en suero, no es correlacionable.

Entidades clínicas como la enfermedad periodontal, uso de prótesis mal adaptada, la presencia de caries y/o exposición de la cámara pulpar al medio, así como procedimientos de cirugía bucal y todos aquellos que generen traumas, heridas o lesiones que induzcan al sangrado, podrían incrementar sustancialmente el riesgo a la exposición del virus en la práctica odontológica.

A pesar que diferentes autores reportan la presencia del virus en saliva (3, 4, 5, 6, 15), Maticic y col (2001), sugieren la presencia de sustancias inhibitorias de la replicación del virus en la saliva, probablemente esto pudiera explicar por que la totalidad de las muestras analizadas en nuestro estudio dieron positivas.

El 29% presentó una condición bucal mala dado que tenía enfermedad gingival clínica avanzada, y/o presencia de irritantes locales tipo cálculo o placa abundante y/o prótesis en malas condiciones, y/o caries dentales y cámaras pulpares expuestas al medio. En el examen clínico se observó, en general, mejores condiciones bucales en las mujeres que en los hombres.

Es importante resaltar que en el presente se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de VHC 100%(7/7) en saliva y la condición bucal clasificada de mala. No se aisló el virus en pacientes cuya condición bucal se clasificó como regular o buena. De lo expuesto se sugiere que cuando está presente una mala condición bucal es posible detectar el ARN viral en pacientes infectados con Hepatitis C.

En cuanto al genotipo, Henderson y col (2001) en el Reino Unido reportaron que en un estudio realizado con 76 muestras de suero positivo para ARN viral, el genotipo más común fue el 1a seguido por el 3. En la presente investigación se observó que de las 7 muestras positivas, el 57% presentaron genotipo 1a/1b, uno con 1a, otro con 1b, y el último con sub-tipo 2a-2c, esta diferencia podría ocurrir gracias a los factores genéticos y geográficos.

El análisis estadístico realizado para determinar la presencia de VHC en saliva y su asociación con diferentes factores que caracterizan al grupo estudiado, no se

obtuvo asociación entre la presencia del VHC en saliva y el género, edad y la condición de haber tenido relaciones sexuales con múltiples pareja, sin embargo, un mayor número de pacientes que consumían alcohol resultaron positivos para VHC en saliva, encontrándose una moderada asociación entre VHC en saliva y el consumo de alcohol.

Un dato relevante en la asociación que se observó en este estudio, con relación a la ingesta de alcohol, esto podría estar relacionado con el proceso de replicación del virus, y la eficacia de los medicamentos. En contraposición, Rapicetta y col, (1992) reporta que no observó relación con este hábito.

Al hecho de que los pacientes recibieran o no tratamiento, Maticic y col (2001), reportan que la terapia con interferón que están recibiendo los pacientes puede reducir el número de partículas en suero y saliva, sin embargo en el presente estudio se consideraron pacientes que recibían tratamiento y pacientes que no, siendo un dato que no fue estadísticamente significativo.

Van Doornum y col (2001), reportaron que la presencia del virus es independiente de la carga viral, en contraposición al trabajo efectuado por Maticic y col (2001), en el que sugiere que no se encontró ARN en muestras provenientes de pacientes con baja carga viral. En esta investigación, realizada con pacientes del Hospital Clínico Universitario, no fue determinada la carga viral ni la presencia de células fraccionadas; sin embargo el hecho de que las muestras positivas provinieran de pacientes con malas condiciones bucales y que en los pacientes que presentaron una mejor condición bucal no se aisló el virus, permite relacionar que las malas condiciones bucales asociadas a la migración de CSPM, podrían implicar a la saliva, como una posible ruta de infección.

Con respecto al cuidado bucal, Komyama y col, 1991, detectan el ARN VHC por RCP en la saliva de pacientes que padecen esta enfermedad y que presentan descuido dental, sugiriendo así que esta condición podría estar implicada con la presencia del virus.

En otro orden de idea, cabe destacar que Henderson y col (2001), enfatizaron los problemas que encontraron los pacientes al buscar atención odontológica; informan que pacientes infectados por el virus fueron discriminados por los odontólogos, quienes no brindaron la atención profesional demandada.

Es importante destacar que estudios seroepidemiológicos realizados por Chen y col (1995), indican que el odontólogo tiene un alto riesgo a infectarse con el VHC sobre todo en procedimientos quirúrgicos o los que impliquen sangrado.

Con respecto a la variabilidad reportada en las investigaciones, cabe destacar que los resultados podrían diferir de otros estudios, debido a lo heterogéneo de los métodos que se aplican para la recolección y el procesado de las muestras de saliva, así como la sensibilidad que puedan tener la técnicas empleadas para la detección y genotipaje.

A diferencia de otros estudios, el ARN-VHC en saliva es bajo comparado con el suero, hecho que ha demostrado Young y col (1993) por la ausencia de productos de amplificación del virus en la electroforesis de la primera amplificación, en contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio en donde se observó genoma viral en la mayoría de las muestras de saliva en la primera ronda de amplificación lo que permite inferir que existe una elevada carga viral en los pacientes.

Todo lo antes expuesto resalta la importancia epidemiológica de estos estudios, debido a que sugiere que las secreciones no pueden ser excluidas cuando se consideran los posibles mecanismos para la transmisión del virus, sin embargo, la presencia del virus en saliva no es concluyente para determinar el grado de infectividad y podría ser precipitado concluir que es capaz de transmitirse mediante este mecanismo.

En cuanto al tema de bioseguridad se debe recordar que el uso de equipos de alta velocidad como la turbina y el scaler en la presencia de fluidos corporales, como la sangre y la saliva, genera aerosoles de microorganismos y sangre. En Venezuela existe poco material informativo al respecto, es probable que por esta razón los aerosoles no se hayan considerado en su justa medida como posibles eventos de riesgos en la salud. Sin embargo, cuando los pacientes están infectados por virus y otros patógenos la generación de aerosoles puede significar una potencial vía de transmisión para los odontólogos y asistentes.

En investigaciones realizadas fuera de país, como la de Bennett y col, (2000), se sostiene que, de persistir los aerosoles infecciosos por tiempos prolongados en los consultorios odontológicos, se incrementa el riesgo y puede convertirse en algo nocivo en las áreas de espera y para los pacientes subsecuentes.

Debido a que el Virus de Hepatitis C puede estar presente en la saliva de pacientes con hepatitis crónica que están bajo tratamiento para enfermedades dentales, el odontólogo debe estar alerta de la posible infección vía saliva debido al contacto durante el tratamiento.

Los riesgos se pueden disminuir utilizando barreras de bioseguridad, la mayor cantidad de material desechable, así como reduciendo el fluido sanguíneo utilizando anestesia local con vasoconstrictores.

En Latinoamérica y concretamente en Venezuela, cabe señalar la escasez de estudios dirigidos a la detección del VHC en cavidad bucal, razón por la cual es importante iniciar una línea de investigación en nuestro país con la finalidad de determinar la presencia del virus Hepatitis C en saliva, además de aportar datos que fortalezcan las bases biológicas para establecer a la saliva como una posible ruta de infección, así como de todos aquellos aspectos que puedan relacionarse con la enfermedad, vías de transmisión y las implicaciones que esto acarrearía en el campo de la atención odontológica.

VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Un mayor número de individuos del género masculino presentó la infección por el Virus de Hepatitis C.

La presencia de la infección por el Virus de Hepatitis C en el núcleo familiar de los pacientes infectados fue baja.

La transmisión horizontal en los miembros de las familias de los pacientes infectados se presentó en los hermanos.

Los pacientes infectados con el Virus de Hepatitis C presentaron una baja incidencia de lesiones hepáticas y de manifestaciones extrahepáticas.

En la población estudiada un escaso número de pacientes presentaron lesiones en cavidad bucal.

Existe una relación estrecha entre la presencia del Virus Hepatitis C en saliva y la mala condición bucal de pacientes portadores del virus.

No se aisló el VHC en saliva de los pacientes que presentaron una condición bucal regular o buena.

La mala condición bucal se observó con una marcada elevación en hombres más que en mujeres y esto podría deberse a una actitud social de descuido.

En las muestras positivas en saliva para el Virus de Hepatitis C, se observó con mayor frecuencia el genotipo 1a/1b, un paciente estaba infectado con el genotipo 1a, otro con 1b, y el último con sub-tipo 2a-2c, esta diferencia podría ocurrir gracias a los factores genéticos y geográficos.

Existe una asociación entre la ingesta de alcohol y la infección del VHC, hecho que podría estar relacionado con el proceso de replicación del virus y la eficacia de los medicamentos.

La mayoría de los pacientes fueron contagiados en procedimientos quirúrgicos por transfusiones sanguíneas, antecedente importante a la hora de hacer el interrogatorio en la consulta odontológica.

La vía de transmisión de la infección no presentó una asociación con la conducta de mantener relaciones sexuales con múltiples parejas.

Ninguno de los pacientes positivos para el VHC en saliva tenía otros miembros del núcleo familiar infectados con este virus.

En la población estudiada la lesión de Liquen Plano Bucal no se encontró asociado a la infección del VHC, ya que un solo paciente la presentó.

VII REFERENCIAS

- 1.- Maroto Vela MC, Bernal Zamora MC, y Quirós Roldán E. Virus de la hepatitis. En: Liébana Ureña J. Microbiología Oral. McGraw – Hill Interamericana. 2000; pp. 329-347.
- 2.-Carozzo, M. Oral health in patients with hepatitis C virus infection: an underestimated problem?. Oral Diseases. 2001; 7:267-270.
- 3.-Takamatsu K, Koyanagi Y, Okita K, Yamamoto N. Hepatitis C virus RNA in saliva. The Lancet. 1990; 336:1515.
- 4.-Liou TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL: Detection of HCV RNA in Saliva, Urine, Seminal Fluid and Ascites. Journal of Medical Virology. 1992; 37:197-202.
- 5.-Couzigou P, Richard L, Dumas F, Schouler L, Fleury H. Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. Gut, sup. 1993; s59-s60.
- 6.-Chen M, Yun ZB, Sällberg M, Schavarcz R, Bergquist I, Berglund HB, Sönnernborg A. Detection of Hepatitis C Virus RNA in the Cell Fraction of Saliva Before and After Oral Surgery. Journal of Medical Virology. 1995; 43:223-226.
- 7.-Fried MW, Shindo M, Fong TL, Fox PC, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM: Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology. 1992; 102: 1306-1308.
- 8.-Puchhammer-Stöckl E, Mor W, Kundi M, Heinz FX, Hofmann H, Kunz C. Prevalence of Hepatitis C Virus RNA in Serum and Throat Washings of Children with Chronic Hepatitis. Journal of Medical Virology. 1994; 43: 143-147.
- 9.-Young KC, Chang TT, Liou TC, Wu HL. Detection of Hepatitis C Virus RNA in peripheral Blood Mononuclear Cells and in Saliva. Journal of Medical Virology: 1993; 41: 55-60.
- 10.-Arrieta J, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M, Manzarbeitia F, Oliva H, Mariscal D, Carreño V. In Situ Detection of Hepatitis C Virus RNA in Salivary Glands. American journal of Pathology. 2001; 158: 259-264.

- 11.-Maticic M, Poljac M, Kramar B, Seme K, Brinovec V, Meglic-Volkar J, Zakotnik B, Skaleric U. Detection of Hepatitis C virus RNA From Gingival Crevicular Fluid and Its Relation to Virus Presence in Saliva. J Periodontol. 2001; 72:11-16.
- 12.-Fawcett DW. Tratado de Histología. México: Interamericana Mc Graw-Hill. 1990; pp.683-720.
- 13.-Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. 12ª Edición. México: Salvat Editores, S.A. 1990; pp.1-1209.
- 14.-Eversole L R. Cavidad bucal y dientes. En: Robbins S, Kumar V. Patología Humana. 4ª Edición en español. México: Mc Graw-Hill. Interamericana. 1987; pp. 501-513.
- 15.-Klein R S, Freeman K, Taylor P E, Stevens C E. Occupational risk for hepatitis C virus infection among New York City dentist. The Lancet. 1991; 338: 1539-42.
- 16.-Wang JT, Wang TH, Lin JT, Sheu JC, Lin SM, Chen DS. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with post-transfusion hepatitis C infection. The Lancet. 1991; 337-48.
- 17.-Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin JT, Chen DS. Hepatitis C Virus RNA in Saliva of Patients with Posttransfusion Hepatitis and Low Efficiency of Transmission Among Spouses. Journal of Medical Virology. 1992; 36:28-31.
- 18.-Alter MJ. Epidemiology of Hepatitis C. Hepatology. 1997, Sep. 26 (sup11): 62s-65s.
- 19.-Bass N, Van Dyke R. Enfermedades del Hígado y del Sistema Biliar. En: Cecil. Compendio de Medicina Interna. 2ª. Edición en español. México: Interamericana McGraw-Hill. 1991; pp.352-384
- 20.-Henderson L, Muir M, Mills PR, Spence E, Fox R, McCruden EAB, Bagg J. Oral health of patiens with hepatitis C virus infection a pilot study, Oral Diseases. 2001; 7:271-275.
- 21.-EASL. International Consensus Conference of Hepatitis C. París, 26-28 Feb. Journal of Hepatology.1999; 30: 956-961.

- 22.-Rapicetta M, Attili A, Mele A, De Santis A, Chionne P, Cristiano K, Spada E, Giuliani E, Carli L, Goffredo F, Capocaccia L. Prevalence of Hepatitis C Virus Antibodies and Hepatitis C Virus – RNA in an Urban Population. *Journal of Medical Virology*. 1992; 37: 87-92.
- 23.-Rapley, R. Polymerase Chain Reaction. En: Rapley R y Walker J M. *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press Inc, Totowa, NJ 1998; 305-325.
- 24.-Van Doornum GJJ, Lodder A, Buimer M, Van Ameijden EJC, Bruisten S. Evaluation of Hepatitis C Antibody Testing in Saliva Specimens Collected by Two Different Systems in Comparison with HCV Antibody and HCV RNA in Serum. *Journal Medical Virology*. 2001; 64: 13-20.
- 25.-Santos Gil I y Sanz Sanz J. Treatment with interferon and ribavirin of chronic of hepatitis C in HIV-infected patients. *An Med Interna*. 2004 Aug; 21 (8): 369-72
- 26.-Chang YJ y Byun KS. Treatment of chronic hepatitis C. *Korean J Gastroenterol*. 2004 Dec; 44 (6): 301-7.
- 27.-Bennett A M, Fulford M R, Walker J T, Bradshaw D J, Martin M V, Marsh P D. Microbial aerosols in general dental practice. *British Dental Journal*. 2000; 189:664-667.
- 28.-Carranza F. *Periodontología Clínica de Glickman*. 7ª Edición en español. México: Interamericana McGraw-Hill. 1993; pp. 15-30; 104-116.
- 29.-Abe K, Inchauspe G. Transmission of hepatitis C by saliva. *The Lancet*. 1991; 337: 248.
- 30.-Mendel I, Muraine M, Riachi G, Forzli FE, Bertin C, Colin R, Brasseur G, Buffet-Janvresse C. Detection and Genotyping of the Hepatitis C RNA in Tear Fluid From Patients with Chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology*. 1997; 51: 231-233.
- 31.-Khurshudian A. A pilot study to test the efficacy of oral administration of interferon- α lozenges to patients with Sjögren Syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral End*. 2003;95:38-44.

32.-Komiyama K, Moro I, Mastuda Y, Morshed S, Nishioka M, Hayashi N, Shikata T. HCV in saliva of chronic hepatitis patients having dental treatment. The Lancet. 1991; 338: 572-573.

ANEXO

Caracas, ____ de _____ 2004

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____, mayor de edad y titular de la cédula de identidad N°_____, en mi condición de paciente o representante de _____, en la consulta de Hepatología del Servicio de Gastroenterología del Ambulatorio Docente del Hospital Universitario del Caracas, hago constar que he sido invitado(a) por el Odontólogo Marco Aurelio Luna Avellaneda, estudiante del Postgrado de Medicina Estomatológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, a participar en el trabajo de investigación titulado:

Protocolo para la Detección del Genoma del Virus de Hepatitis C en Saliva (VHC/Saliva)

Me han sido explicados las incomodidades y riesgos y entiendo los beneficios que implica mi participación en el mencionado trabajo de investigación. Entiendo igualmente que mi participación en este estudio es voluntaria y que puedo retirarme del mismo, sin que esto afecte de ninguna manera la calidad de la atención y del tratamiento médico al cual voy a ser sometido(a).

Los datos recogidos sobre mi persona o sobre mi representado (a) serán tratados con la más absoluta confidencialidad y no podrán ser divulgados fuera del contexto científico para el cual fue diseñado el presente trabajo de investigación.

Paciente/Representante