

Progresos en Pediatría: *Medicina molecular*

Las hepatitis virales y la virología molecular

Dres. ALBERTO ROSETO* y CHRISTIAN BRECHOT**

ARCH ARG PEDIATR / 1998 / VOL. 96:

23

PARTE I

Penetración viral en la célula

Seguiremos, en este capítulo, los pasos que recorren los virus, vistos desde una perspectiva molecular. La hepatitis C nos dará otro ejemplo, – como los rotavirus en *Arch Arg Pediatr* N° 6, 1997– de lo conocido y comprendido sobre este virus, que produce varias patologías hepáticas.

Retomando la virología molecular, hemos visto que los virus utilizan diferentes receptores para introducirse y replicarse en una célula específica, en general, de tejido y especie. Después de que un virus se liga a su receptor, el próximo paso es penetrar en la célula que le sirve de huésped. Varios caminos alternativos son utilizados por los virus para hacerlo. Una vez fijado a su receptor, un virus sin envoltura tiene un limitado número de opciones: es trasladado a través de la membrana o invaginado por endocitosis (ejemplo del rotavirus). Esas vacuolas son acidificadas por una “bomba de protones” o invaginadas por endosomas dentro de la célula, en un intento de digerir los componentes virales. Cabe destacar aquí, que el fin último de la penetración viral es dejar libre dentro de la célula, el genoma con las proteínas necesarias para su replicación. Así, muchos virus adaptan sus proteínas para trabajar en bajo pH y facilitar la tarea antes señalada. Otros ejemplos son los poliovirus y los adenovirus. Los virus con envoltura, como influenza, rhabdovirus, herpesvirus, retrovirus, son internalizados en vacuolas y se fusionan con la pared celular de la vacuola como consecuencia de la interacción entre las proteínas ligantes, el receptor celular y las proteínas fusionantes de los virus.

La combinación de este conjunto proteico virus-célula permite liberar la nucleocápside en el citoplasma.

La replicación viral

Una vez que la nucleocápside se encuentra en el interior de la célula, sigue el período de eclipse, en el que no hay partícula viral completa (el virus se desvestió para replicarse y todavía no se ha completado). En las células eucariontes este período dura de unas pocas horas a unos pocos días. En los virus de las bacterias es mucho más breve. En la etapa siguiente, en una infección aguda, nuevas partículas infecciosas aparecen en forma creciente en las células. Es la fase logarítmica de producción viral. Esta nueva progenie de virus es usada para hacer más virus, hasta que toda la maquinaria metabólica celular es dedicada solamente a la producción del virus infectante. Esta amplificación resulta en un incremento logarítmico y se llama transcripción secundaria viral. Siempre en una infección aguda viral, la lisis y muerte celular es la etapa que sigue. Siguiendo la clasificación viral que ya vimos, daremos ejemplos de virus patógenos humanos para cada genoma ADN o ARN y sus diferentes y variadas estrategias replicativas.

Replicación de los virus con genomas ADN

En general tienen genomas de más de 350.000 pb, que les permiten tener una nucleocápside de estructura y función completas. Producen sus propias enzimas específicas, haciéndolos más independientes del metabolismo celular. Es más, producen enzimas que posee la célula eucarionte, y de esta manera no son dependientes del metabolismo celular ni del estado fisiológico en que se encuentran las células. Los virus las usan cuando las necesitan. Virus con genoma altamente complejo, como los poxvirus y los herpesvirus, se replican en el citoplasma y en el núcleo celular,

* Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), Francia. Area de Medicina Molecular, Hospital Posadas.

** Unidad 370 del Inserm. Biología Celular-Hepatología, CHU Necker. Hospital Necker. París, Francia.

respectivamente. El primero, como un “segundo núcleo” en el citoplasma y el otro, como un “mininúcleo” en el interior del núcleo celular. Los grandes virus ADNds tienen distintas fases en su replicación. La producción de sus proteínas es secuencial, rítmica y controlada. Los promotores de sus genes son frecuentemente controlados por grupos de proteínas virales o celulares que responden a estímulos específicos.

Existen también virus con genoma ADN, patógenos humanos, como el de la hepatitis B y el parvovirus, que tienen genomas mucho más pequeños que los ADNds, 3200 pb y 4500 a 6000 bases respectivamente. Sólo el parvovirus “se aprovecha” o necesita de la maquinaria metabólica celular en su totalidad para poder replicarse. El virus de la hepatitis B, como veremos luego, tiene una forma replicativa intermediaria entre los virus ADN y los retrovirus (ARN). Su integración al genoma celular no es una condición necesaria a su replicación, aunque puede hacerlo, como es el caso de ciertos hepatocarcinomas, con los que este virus está asociado (*Gráficos 1 B y 2 A-B*).

Replicación de los virus con genoma ARN

En general los virus con genomas ARN tienen un genoma mucho más pequeño que los virus ADN. Los genomas de los virus ARN de los vertebrados son unas 10 veces más pequeños que los de los virus ADN. Una muy importante razón para que esto ocurra en la naturaleza viral, es que la síntesis de ARN no es corregida en un “proof-read” por la célula; en cambio la replicación de un virus ADN es chequeada y corregida como si se tratara del ADN celular. Por eso, el rango de la mutación de los virus ARN es muy alto (un error o cambio de la base original cada 1.000 a 10.000 copias). Es casi improbable encontrar una copia nueva igual al ARN genómico de origen. Se puede decir que, al menos por una base, ningún virus ARN tiene la garantía de ser igual a su descendencia. Nace así el concepto de cuasiespecie, donde gráficamente el virus salvaje (o wild-type) está en el centro de una nube en la cual las prolongaciones más alejadas representan mutantes minoritarios y con muchas diferencias, y las más cercanas al centro, los mutantes que más conservan la secuencia del virus salvaje.

En todos los organismos vivientes las moléculas de ADN tienen dos hebras (strands) complementarias que se denominan antiparalelas o de sentidos opuestos, de 5' a 3' y de 3' a 5' (*Arch Arg Pediatr* 1997; 95 (1)). Las hebras de ADN que tienen la misma secuencia y sentido que tendrá el ARNm son las hebras positivas. Para que esto ocurra, la ARN polimerasa II fabrica el

ARNm (que siempre es positivo) sirviéndose del molde de la otra hebra del ADN, que se denomina negativa. Para los ARN se guardó el mismo criterio. Esto sirvió para clasificar a los virus. Así, se llaman virus ARN de hebra simple positivos (single strand+) cuando tienen la misma secuencia del ARNm (es decir, se sirven como ARNm cuando entran a la célula y son traducidos en proteínas como cualquier ARNm celular) y en ese caso son infectantes con el genoma solo; es el caso del poliovirus y los virus de hepatitis A y C. Del mismo modo, se llaman virus ARN de hebra simple negativos (single strand-) cuando tienen la secuencia complementaria opuesta al ARNm que deben producir. Finalmente, también se encuentran los virus ARN de doble hebra (ej. los reovirus tienen una hebra positiva y otra negativa) (*Gráfico 1A*).

Como la cantidad de virus que se producen es del orden de 10^9 - 10^{10} en la fase aguda de una infección, esa misma cantidad hace que las mutaciones deletéreas no sean las mayoritarias y así la cepa salvaje se conserva. Sin embargo, ante la presión ejercida por el sistema inmunitario o las drogas, los virus mutan en el sentido de obtener ventajas en su replicación (es decir, para no ser alterados por los anticuerpos neutralizantes o las drogas). Esta frecuencia de error en la transcripción del genoma ARN explica por qué algunos virus tienen este genoma segmentado, puesto que al ser largo y continuo aumenta la posibilidad de error en la copia. Los genomas ARN segmentados (*Gráfico 2*) ayudan a la mezcla de los genes. Esta mezcla, llamada recombinación (intercambio de secuencias con un ácido nucleico similar), es habitual y normal en las moléculas de ADN, desde el núcleo de una célula eucarionte hasta las bacterias y los virus. Las moléculas de ARN no tienen mucha oportunidad de intercambio genético, los segmentos genómicos lo facilitan. Así, los virus de la influenza (*Orthomyxoviridae*) tienen 7 segmentos (influenza C) u 8 segmentos (influenza A y B) de ARN. Los virus influenza tienen un alto grado de variación genética. Esto es, cuando la modificación ocurre en codones de ciertos aminoácidos de las proteínas que generan la producción de anticuerpos, se habla de “antigenic drift” (derivación antigénica). Cuando el intercambio de segmento es total se habla de “antigenic shift” (cambio o traslado antigénico). Esto último es el intercambio completo de genes entre dos virus. Esto ocurre en la naturaleza en los animales reservorios de estos virus (aves y porcinos).

Siempre un ARN no segmentado y largo tienen un alto grado de variación en su genoma. El virus de HIV es un excelente ejemplo. Es no segmentado y tiene dos cápsides del mismo genoma ARN de

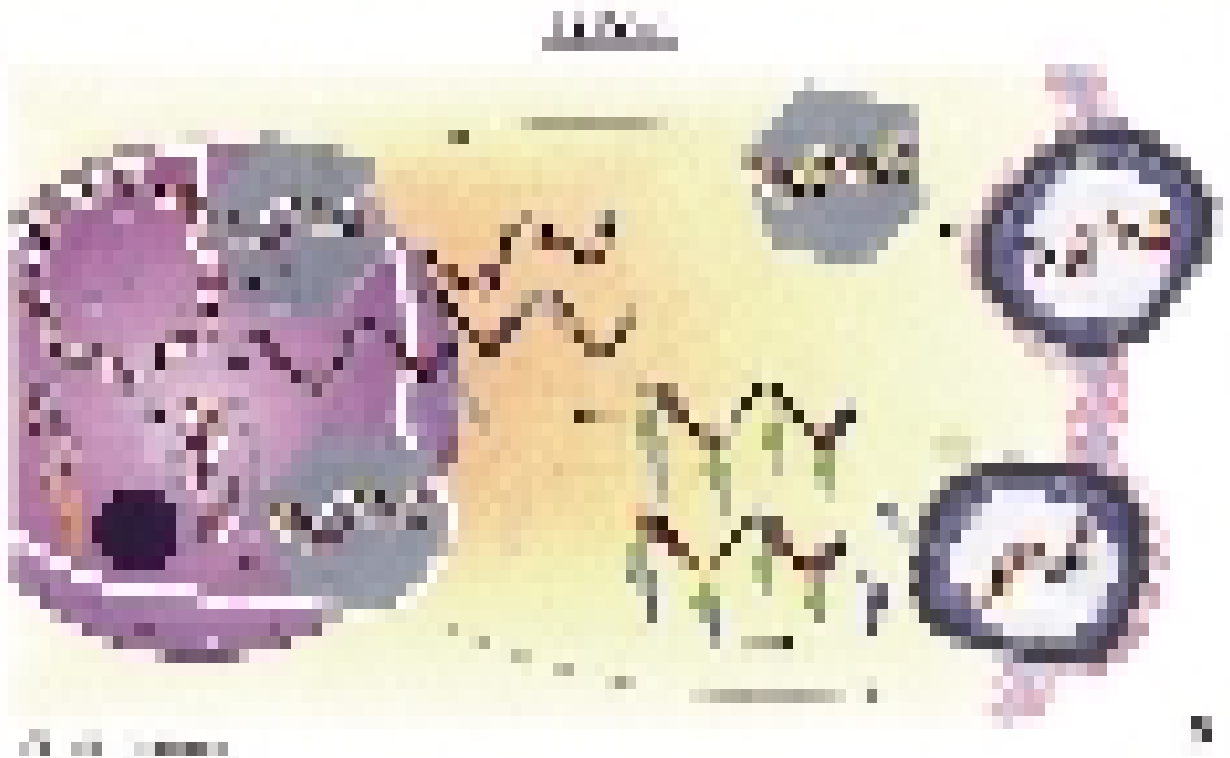
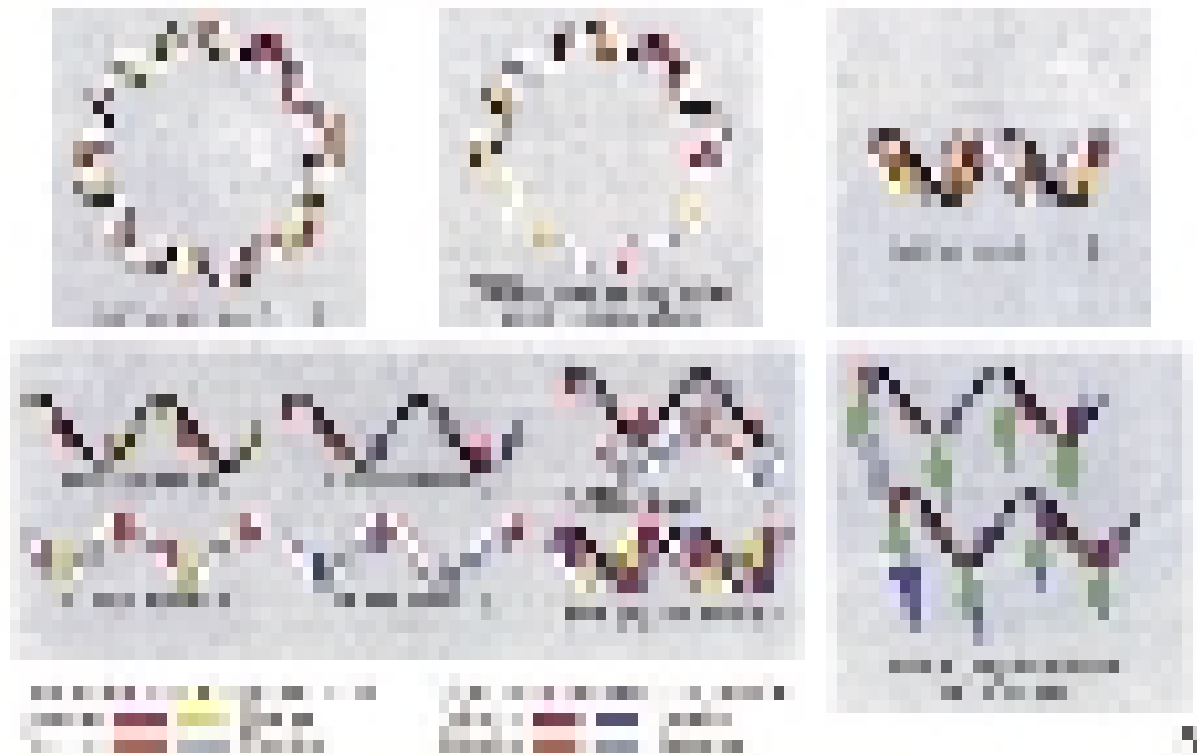


GRÁFICO 1
Replicación de los virus ADN

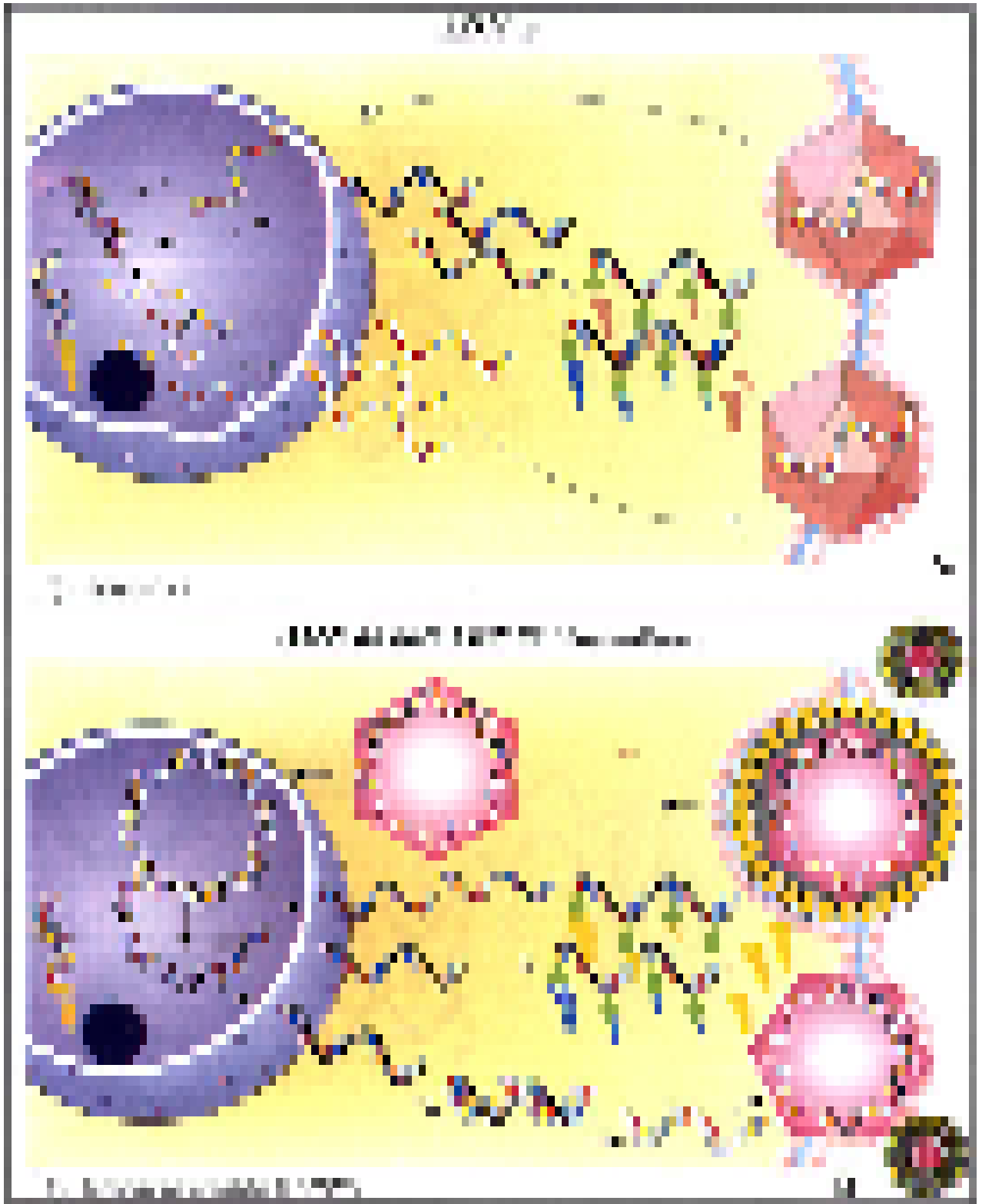


GRÁFICO 2

Replicación de los virus ADN

GRÁFICO 1**1 A**

1. La molécula de ADNds (doble strand) o doble hebra; la hebra de color negro es positiva. La hebra de color blanco es la hebra complementaria, negativa. Siempre esos colores significarán esos sentidos o polaridad de las hebras, sea en las moléculas de ADN simple o doble o las moléculas de ARN simple o doble hebra.
2. En la hebra de ADNds, la hebra positiva es la que tiene la secuencia igual a la que tendrá el ARNm (éstos serán siempre positivos). La hebra negativa es complementaria al ARNm, que es producido cuando la ARN polimerasa "lee" la hebra negativa. La hebra negativa del ADN es como el negativo de una fotografía y las fotos que se hacen son los positivos, en este caso, los ARNm.

1 B: Replicación de los virus con genomas ADNds

Los herpesvirus nos sirven como ejemplo de esto. Después de que el virus entra en las células, las proteínas de sus envolturas y cápside alteran el metabolismo celular y permiten la síntesis del primer grupo de ARNm (virales) y sus correspondientes proteínas. Se las llama alfa proteínas o "immediate early" (IE) proteínas y sus funciones son principalmente regulatorias. Ellas permiten la producción del segundo grupo, llamado beta proteínas o "early" proteínas (E). Sus funciones están ligadas principalmente a la síntesis de los nuevos ADNds. También estas early proteínas, junto al nuevo ADNds viral, producen las gamma proteínas o "late" proteínas (L) que son esencialmente las proteínas estructurales de los virus nacientes. Cuando las nuevas partículas infectan otras células termina la producción de las IE proteínas. El ciclo viral está completo. La síntesis de ADN requiere primers (generalmente de ARN) para iniciar la transcripción. Una vez iniciada ésta, múltiples copias del mismo genoma son producidas. Los ADNds se circularizan (normalmente son lineares) y se unen uno tras otro (se conocen como concatámeros), los cuales son cortados exactamente por unidad durante el ensamblado del virus. Esta forma de copiar el ADNds es común entre estos virus y es un sistema relativamente simple de copiar por la ADN polimerasa, que se desplaza con el primer cada vez que termina de copiar un genoma y formar un círculo. Producidas las IE, E y L proteínas y terminado el ensamblado, éstas empujan la membrana nuclear haciendo un brote y así pasan al citoplasma encerradas en vacuolas que son transportadas a la membrana celular para su salida definitiva de la célula.

GRÁFICO 2**2 A: Replicación de los virus con genoma ADNss**

Todos los virus con este genoma son pequeños y con ADNss corto. El más pequeño de estos virus de los vertebrados es el circovirus, que infecta a los porcinos y tiene 1.759 bases. El más grande es un fago de las bacterias, con casi 8.500 bases. El parvovirus B19 es el ejemplo de esta clase de virus mejor conocido en los humanos. Su genoma es de 4.500 a 6.000 bases. En general, para los parvovirus humanos, el sentido del genoma de estos ADN lineares es negativo. Pero otros parvovirus pueden encapsidar una u otra polaridad con igual frecuencia como el AAV (Adenovirus Asociado), y otros pueden tener el genoma de polaridad negativa (70%) y (30%) de polaridad positiva, como el parvovirus bovino. En el parvovirus humano pueden encontrarse genomas de polaridad positiva.

Una vez que penetra a la célula (su receptor es la glicoproteína del grupo sanguíneo P), el genoma es copiado en el núcleo y se forma un ADNds (es la llamada forma replicativa "RF"). Esta RF es usada para producir el ARNm (el genoma ADN ss negativo le sirve de molde), que sale del núcleo correspondiente como cualquier ARNm celular para traducir las proteínas en el citoplasma y la progenie de los nuevos ADNss. El parvovirus, por su tamaño, es muy limitado en cuanto a la autonomía de su duplicación. Necesita de la maquinaria replicativa de la célula que infecta y ésta debe encontrarse en las fases replicativas de su ciclo celular y no en GO (*Arch Arg Pediatr* N° 5, 1997). Por eso, en la línea eritroide infecta, sobre todo, a las células precursoras. El genoma codifica para dos E proteínas no estructurales y no más que para tres L proteínas estructurales.

2 B: Replicación viral de los virus ADNds que utilizan un ARN intermediario

El único virus humano que tiene este tipo de replicación es el virus de la hepatitis B (HBV). En las plantas, el *Caulimoviridae* usa la misma estrategia. El genoma del HBV es un ADNds en un 50% a 80%, esto quiere decir que tiene una hebra ADN positiva (más corta y variable en su longitud), y una hebra ADN negativa (más larga, que mide alrededor de 3.200 bases). El receptor de la inmunoglobulina A le sirve de receptor. Dentro de la célula, la nucleocápside viral entra al núcleo complementando al mismo tiempo en su interior las dos hebras de ADN y quedando como un virus ADNds completo. Luego comienza la síntesis de los ARNm positivos (es decir, que son las hebras complementarias a la hebra de ADN negativo del virus).

Múltiples ARNm son así producidos y al menos hay tres tipos diferentes que van a sintetizar las cuatro proteínas conocidas del HBV: Core (C), polimerasa transcriptasa inversa, (P), proteína de superficie (S) y la proteína (X) transactivadora. El ARN de sentido positivo es copiado en el citoplasma en un ADN de sentido negativo por la (P) polimerasa-reversa. A partir de este ADN negativo, la misma enzima (P) hace una copia de ADN positivo que varía de 1.700 a 2.800 bases. Siempre la síntesis de esta copia positiva se detiene antes de completar la transcripción de las 3.200 bases, por eso esa hebra no es completamente circular en el virión. Esta etapa de transcripción por la enzima viral (P), (ARN positivo (\emptyset ADN negativo (\emptyset ADN positivo) que efectúan los *Hepadnavirus* es un misterio biológico. (El virus de Hepatitis B sería una etapa intermedia en la filogenia de los retrovirus). La cápside se forma a partir de las proteínas C que se generan en el retículo endoplásmico (RE) y es envuelta por las glicoproteínas S.

La proteína X tendría una función de transactivación de algunos genes celulares, y sería esencial en la transformación celular hepática que ocurre en algunos casos de HBV.

Los *Hepadnaviridae* tienen un genoma pequeño, por eso utilizan ciertas regiones del genoma para producir más de una proteína.

Esta táctica es utilizada en todo el reino viviente, con diferencias moleculares. En el caso de la hepatitis B, las diferentes proteínas son traducidas a ARNm, con tamaños diferentes pero que partieron del mismo lugar en el momento de transcribirse la molécula de ADN de la hebra negativa. Estas variaciones en el tamaño de los ARNm son también producidas por diferencias en el punto de transcripción y terminación para los genes C y S.

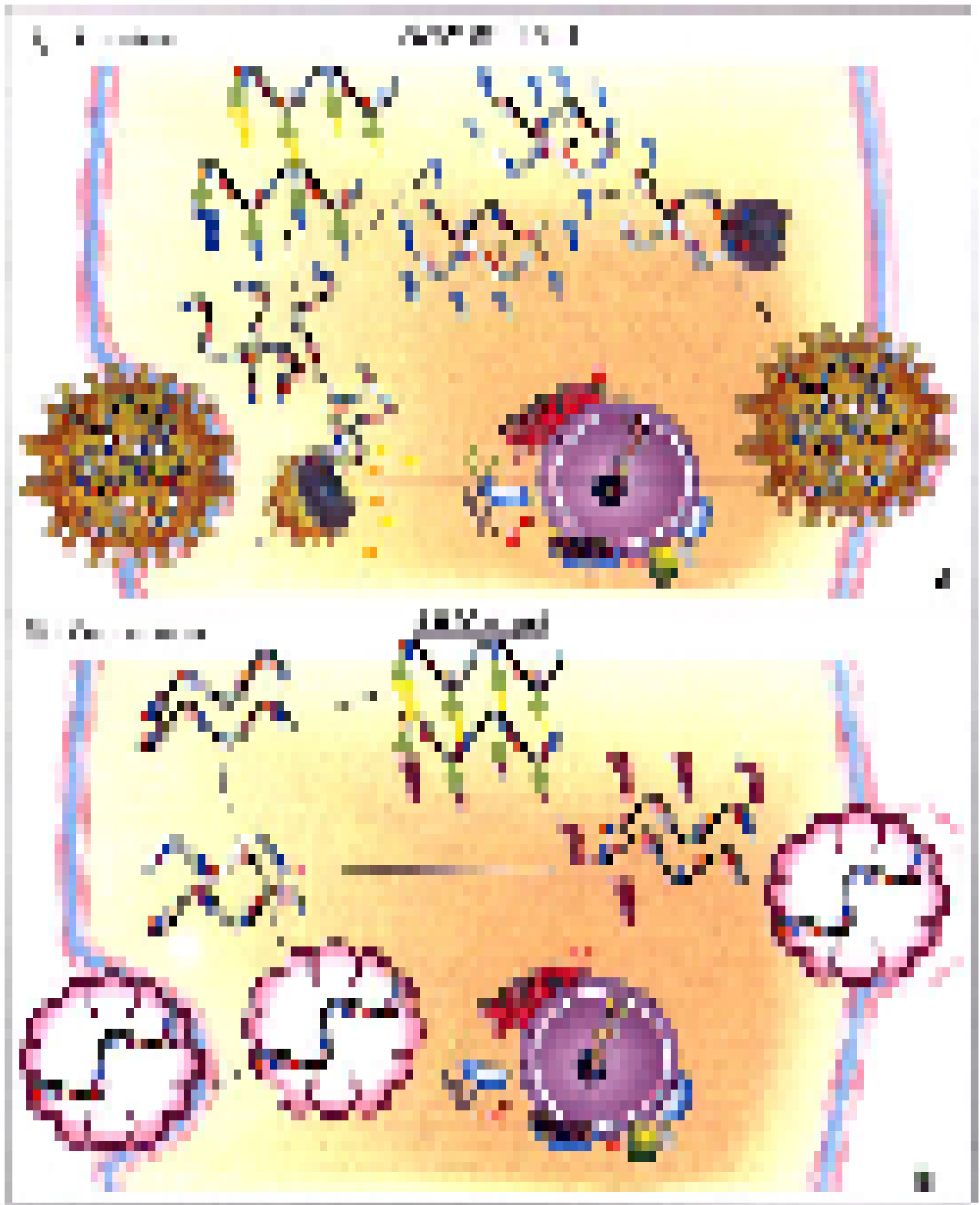


GRÁFICO 3
Replicación de los virus ARN

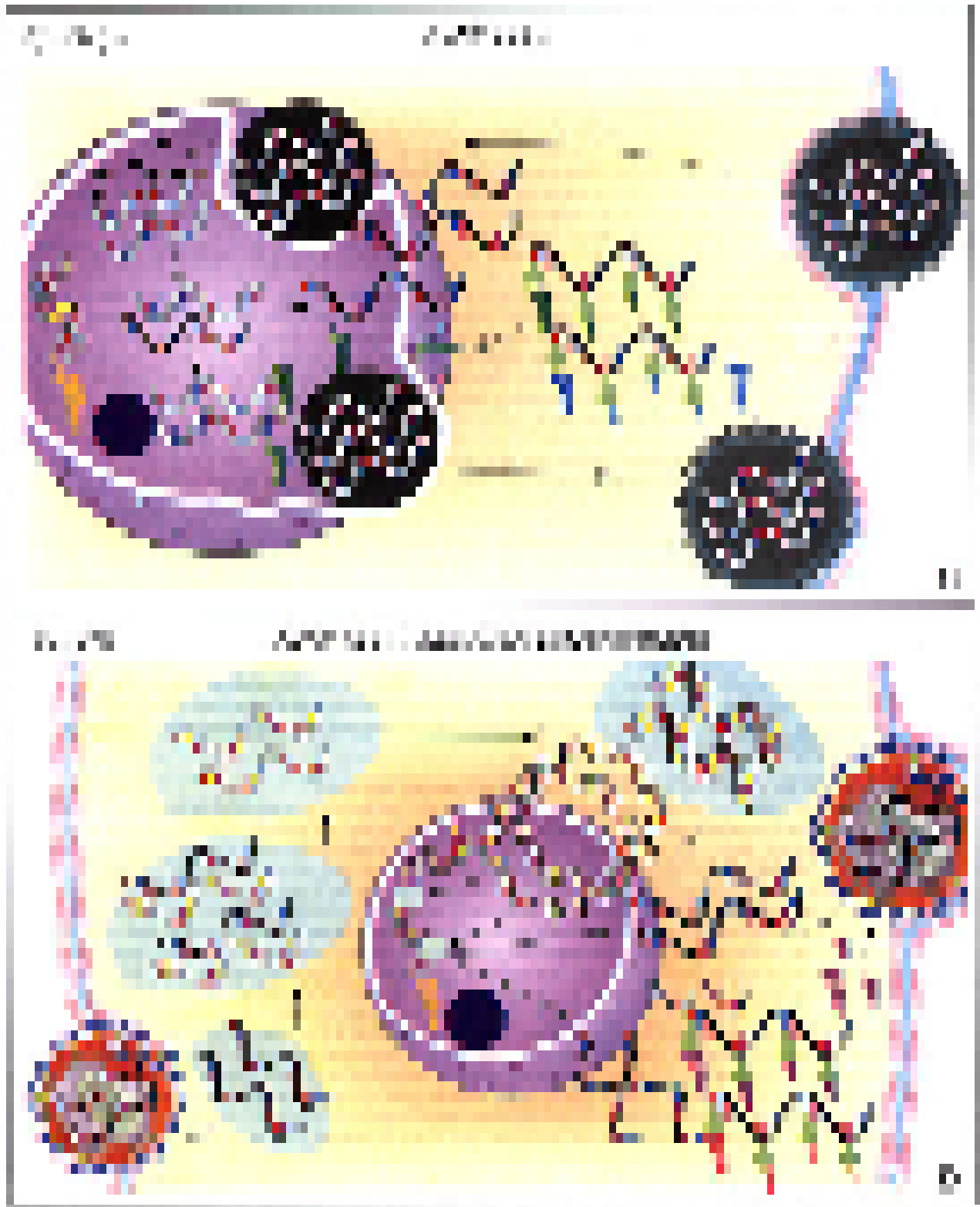


GRÁFICO 4
Replicación de los virus ARN

GRÁFICO 3**3 A: Replicación viral de los virus con genoma ARNds**

En *Arch Arg Pediatr* N° 6, 1997, vimos las etapas y estructuras que entran en juego en la producción viral de los *Reoviridae* (como en el Rotavirus). Después de entrar en la célula estos virus con ARNds son digeridos en los endosomas, algunos quedan enteros y otros son liberados en el citoplasma. El ARNds del virus digerido es el que está en condiciones de transcribirse, dentro del core (las cápsides externa e interna ya fueron digeridas). Allí, en el core, es transcrito por una polimerasa (ARN polimerasa ARN dependiente). El doble ARN consta de una hebra positiva y una hebra negativa. Sólo esta última es transcrita y produce un ARN positivo (en este caso un ARNm) que es liberado del core, mientras la hebra positiva queda intacta. Estos ARNm (los ARNm siempre son positivos) son producidos en forma secuencial en dos grupos. La eficacia de los promotores de cada segmento (en este caso hablamos de segmento porque el ARN de los *Reoviridae* es doble y segmentado), regula la cantidad de ARNm de cada uno de ellos sobre los otros. Así, la hebra ARN negativa produce un ARNm positivo que es utilizado para fabricar las proteínas y la hebra positiva de ARN de esos futuros nuevos virus.

Desde el interior de los nuevos virus una sola transcripción del ARNm positivo da un ARN con sentido negativo, que sirve a su vez para producir nuevos ARNm(+) y proteínas.

La hebra positiva ARN es pues un ARNm, con el 5' Cap (grupo -5' metil guanilato) ligado (como en el ARN de los eucariontes), aunque carece del poli A 3' terminal, también presente en casi todos los ARNm de los eucariontes. El 5' Cap le sirve a los ARNm en la formación del complejo proteico para traducirse en proteínas, los ARNm sin 5' Cap aparecen al final del ciclo viral reemplazando a los primeros. Esto también influye y hace detener la síntesis de los ARNm celulares que, como dijimos, tienen 5' Cap y así se detiene la síntesis proteica celular (y también la del ADN y el ARN) llevando a la lisis celular. Finalmente los ARN sin 5' Cap son los únicos "sobrevivientes" de la infección viral de los rotavirus en una célula, los que se traducirán preferencialmente en proteínas y formarán nuevos virus.

3 B: Replicación de los virus con genoma ARNss con sentido positivo

Los virus con un genoma ARNss con sentido positivo son infecciosos por sí mismos. En efecto, el ARN funciona como un ARNm y la célula lo trata como si fuera uno más. Hay muchos virus de este tipo. El poliovirus es un ejemplo. El virus entra a la célula, no tiene necesidad de llevar su enzima (ARN polimerasa ARN dependiente). En los ribosomas celulares, el ARN genómico es totalmente traducido en una sola poliproteína, (cabe destacar que el ARN viral no tiene Cap en 5' pero tiene una Vpg pegada al final de la molécula que le sirve para ligarse a los ribosomas).

La poliproteína es cortada en varios sectores y así salen las proteínas estructurales y no estructurales del virus. Son producidas en forma equivalente, pero como la enzima polimerasa no se necesita en la misma cantidad que las otras proteínas que forman el virus, puesto que una misma molécula se utiliza en múltiples ciclos, éstos tienen que ser regulados. Para producir unas proteínas estructurales, la polimerasa copia un ARN viral con sentido negativo que queda unida al ARN viral positivo y forma así un ARNds transitorio (llamado replicativo intermediario [RI]), asociado al retículo endoplásmico. Así se replica muchas veces el ARN negativo para pasar a ser positivo, para, a su vez, producir más proteínas del virus y el propio ARN genómico positivo que llevarán los virus descendientes. De esta forma, con pocas moléculas de polimerasa se hacen muchas proteínas de las nuevas cápsides.

GRÁFICO 4**4 A: Replicación viral de los virus con genoma ARNss con sentido negativo**

Como los ARN negativos son opuestos y complementarios a los ARNm (positivos), no pueden traducirse como estos últimos y requieren una ARN polimerasa ARN dependiente para copiarse en ARNm. La enzima polimerasa está dentro de la nucleocápside de estos virus. Estos, una vez dentro, producen ARNm y copias de ARN virales para las proteínas y genomas de los nuevos virus. Durante este proceso una variedad de ARNds intermediarios tipos RF y RI son producidos y los diferentes ARNm producen una sola proteína a la vez, en lugar de una sola poliproteína, como los virus ARNss positivos y a diferentes velocidades y cantidades. A pesar de tener genomas pequeños y poco complejos, estos virus regulan la producción de sus proteínas. Como éstas son pocas, pueden cumplir varias funciones; el mismo segmento genómico puede codificar por varias proteínas diferentes, por ej. los paramixovirus (sarampión), ortomixovirus (gripe). Otro problema es que, como los virus influenza tienen dividido el genoma en 8 segmentos y mientras puedan regular la cantidad de segmentos y ARNm en el momento de la replicación, no se conocen índices de que puedan regular también la presencia de los 8 segmentos necesarios en cada nuevo virus. Esto lo solucionan encapsidando 12 segmentos o más y así alcanzar un 15% de partículas infecciosas (completas) en la progenie. Además, una célula puede ser infectada por más de un virus, los que incrementan sus chances de infección. Algunos grupos de virus ARNss tienen genomas con los dos sentidos (ambisense), positivos y negativos, en diferentes segmentos de su genoma. Los *Arenaviridae* y los *Bunyaviridae*, que utilizan globalmente la misma estrategia de los virus a ARNss negativos, usando la ARN polimerasa viral, hacen los ARNm, antes que las copias de los nuevos genomas que serán encapsidados.

4 B: Replicación de los virus ARNss con sentido positivo que usan genomas ADN intermediarios

Los retrovirus son los únicos miembros de esta clase de virus. El HIV es el más conocido. Aunque, detalles importantes difieren entre las diferentes maneras de replicarse de los retrovirus, las particularidades fundamentales son las mismas.

1. Replican su genoma ARNss pasando por un genoma ADNds intermediario. Este flujo inverso de información del ARN al ADN da el nombre a los retrovirus.
2. Son los únicos virus con segmento ARNss diploides (tienen dos copias del mismo genoma), que son las dos replicadas de la misma manera a cada ciclo viral completo.

(Continúa en la página siguiente)

más de 10.000 bases. El hecho de transcribirse en ADN (las dos copias) por la enzima transcriptasa inversa el total de genoma y la menor precisión de esta enzima, en especial, aumenta el índice de variación de este virus. En verdad, la replicación de un genoma ARN no ocurre en ninguna célula procarionte ni eucarionte viviente y representa un problema esencial a esta clase de virus.

En efecto, mientras los virus con genoma ADN pueden tener y producir sus propias ADN polimerasas, si no las tienen pueden utilizar las de las células. Las células no tienen ARN-ARN polimerasas-dependientes y así los virus ARN pueden utilizar muy poco las enzimas celulares. Esto hace que los virus con genoma ARN produzcan una enzima para copiar su ARN, que no existe en otro lado o si tienen muy pequeños genomas deben encontrar el camino para utilizar las enzimas celulares disponibles destinadas a otros fines, para cumplir esta función de replicar el ARN. Además, los genomas de los virus ARN pueden ser, como ya vimos, de hebra simple o doble (ss o ds strand). Cuando el genoma es ss puede tener un ARN con sentido positivo, sentido negativo o con una mezcla de ambos en la misma molécula de ARN (ambisense) (*Gráficos 3A y B, Gráficos 4 A y B*).

PARTE II

HEPATITIS VIRALES

Panorama general

Actualmente se han identificado cinco virus que producen hepatitis viral: A (VHA), B (VHB), C (VHC), D (VHD) y E (VHE). Aún no está bien demostrado el rol del virus G (VHG). Existen, además, otras enfermedades virales conocidas capaces de causar, en ciertas circunstancias, afecciones hepáticas: la fiebre amarilla, el citomegalovirus, el virus herpes y el virus Epstein Barr, entre otras. En estos casos, el compromiso hepático suele acompañar al compromiso de otros órganos (no es el hígado el blanco principal de la infección).

Los virus de las hepatitis

Virus A: pequeño virus desnudo, 27 nm, ARN, 7.480 nucleótidos, familia de los *Picornavirus*.

Virus B: virus con envoltura, 42 nm, ADN: 3.200 pares de bases de nucleótidos, familia de los *Hepadnavirus*.

Virus C: virus con envoltura, 50-60 nm, ARN, 10.000 nucleótidos, emparentado con la familia de las *Flavivirus*.

Virus D: pequeño virus (viroide y virus satélite a la vez) con envoltura HBs, 36 nm, ARN, 1.679 nucleótidos, sin familia.

Virus E: virus desnudo, 32-34 nm, ARN, 7.600 nucleótidos, emparentados con la familia de los *Calcivirus*.

Transmisión

Transmisión entérica: hepatitis A y B.

Transmisión parenteral: hepatitis B, C y D.

Transmisión sexual: hepatitis B, C y D.

Transmisión madre-hijo: sobre todo hepatitis B y muy probablemente hepatitis C.

Transmisión entérica o fecal-oral

Se produce fundamentalmente por la ingestión de bebidas o alimentos contaminados, contacto con materia fecal, manos sucias y moscas. Los niños, las comunidades pobres, el hacinamiento y, en general, las malas condiciones de higiene constituyen los principales grupos y factores de riesgo.

Transmisión parenteral

Está dada por el virus presente en la sangre y, en un nivel muy pequeño, en numerosas secreciones como la saliva, el esperma y las secreciones vaginales. La principal fuente de contagio es la transfusión con sangre y derivados sanguíneos. La transmisión no transfusional se produce por trasplantes de órganos, hemodiálisis, pinchazos con jeringas (toxicómanos, profesionales de la salud) y todo contacto con sangre contaminada sobre lastimaduras cutáneas al que están expuestos los trabajadores de la salud o los familiares de un

(Viene de la página anterior)

- Tienen la enzima que cumple esta función, la transcriptasa inversa (RT) y que trabaja en el espacio (como una montura doble) entre las dos moléculas de ARN, que están ligadas con proteínas entre sí.
 - Una vez copiados en ADNds, éstos en lugar de quedar como episomas libres fuera del genoma de la célula eucarionte, se integran como si fuera un módulo completo de ADNds con varios genes, en cualquier lugar del genoma eucarionte. Estos es lo que se llama provirus; la enzima que cumple esa función de integración es la integrasa (también propia a los retrovirus). A partir del genoma infectado, se copian sus nuevos ARNss, hacen sus ARNm, que a su vez se traducen en proteínas y el virus ensamblado sale de la célula para infectar otra.
-

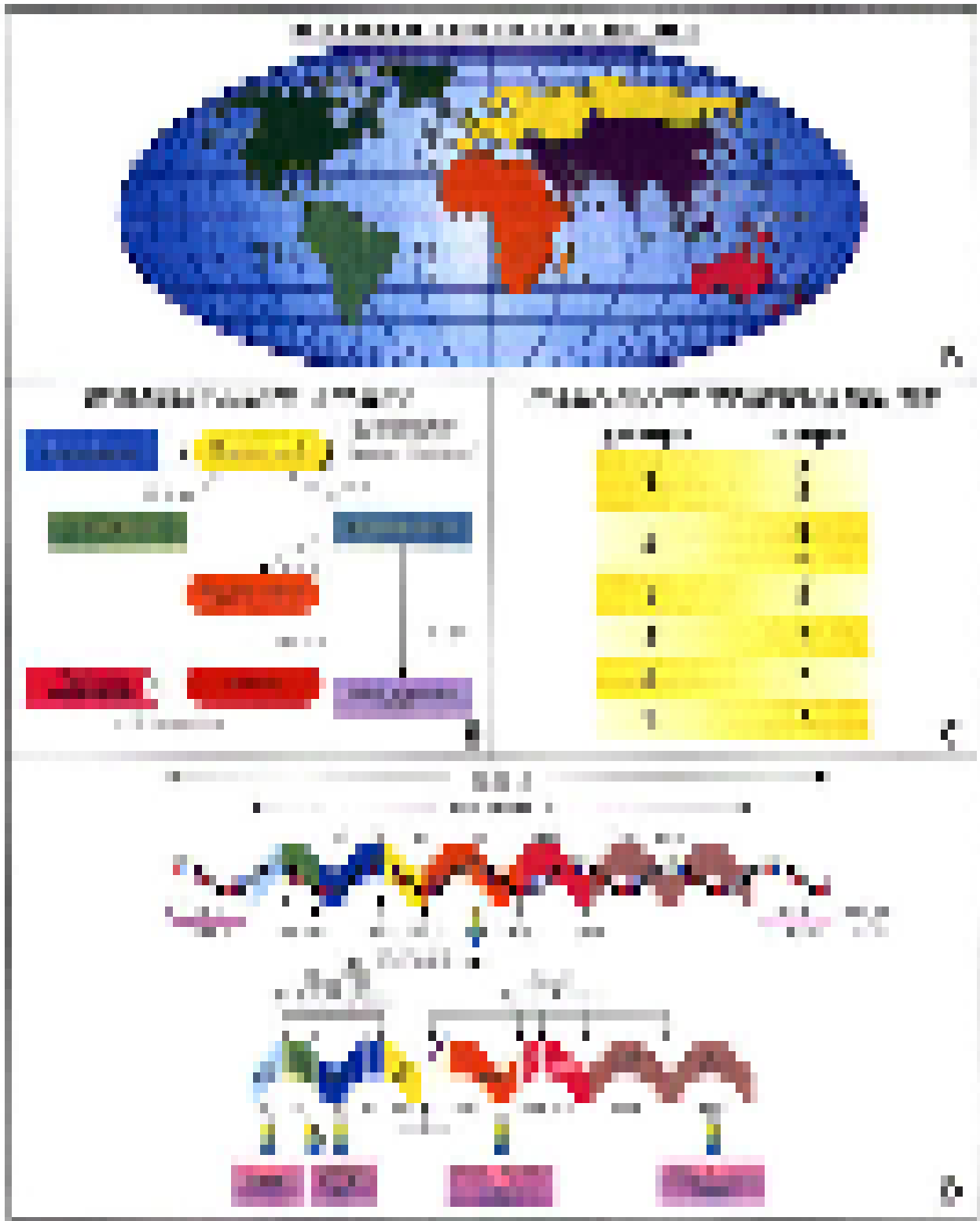


GRÁFICO 5
Esquemas de la clínica, epidemiología y estructura molecular de la hepatitis C (HCV)

GRÁFICO 5**5 A:**

La distribución geográfica de los genotipos y subtipos (genosubtipos) del HCV.

5 B:

La historia natural de la infección por HCV y los porcentajes de cada patología clínica.

5 C:

La clasificación más aceptada de los genotipos y subtipos es la de Simmonds. En forma esquemática, cuando dos cepas tienen una homología de secuencia de más del 90%, pertenecen al mismo subtipo al interior de un genotipo. Cuando la homología es del orden del 80% pero menor que el 90% las cepas pertenecen a dos subtipos diferentes dentro del mismo genotipo. Finalmente, pertenecen a genotipos diferentes cuando su homología no supera el 70%. Estas homologías se establecen teniendo en cuenta la secuencia completa de los genomas. El análisis de regiones estables de ese mismo genoma establece árboles filogénicos superpuestos y las secuencias de las regiones más variables de ese mismo genoma han permitido la clasificación y epidemiología molecular de otros virus.

5 D:

El genoma del HCV y la producción de sus proteínas. Esta figura ilustra la organización del genoma del HCV con el tamaño completo. En los cuadros de diferentes colores se señala el ARN, que es transcrito en una sola proteína y en las extremidades 5 a 3 del genoma, las regiones que no son transcritas (llamadas 5' a 3' UTR [untranslated region]) por los ribosomas celulares. La poliproteína recién producida es cortada por enzimas celulares y virales en el citoplasma del hepatocito. Las enzimas celulares (proteasas, signal peptidasas) dan lugar a las proteínas estructurales (C procápside y E1, E2 [envelope]) y las enzimas virales (serina proteasa) producen las proteínas no estructurales (serina proteasa, helicasas, ARN polimerasa, NS 5 B).

portador del virus.

Transmisión sexual

La hepatitis B está reconocida como una verdadera enfermedad de transmisión sexual (ETS). La transmisión homosexual es conocida; sin embargo, actualmente los contactos heterosexuales son incriminados y los sujetos con múltiples contactos sexuales constituyen el grupo de mayor riesgo.

La transmisión sexual del virus de la hepatitis C está bien establecida, pero es de escasa trascendencia.

Transmisión madre-hijo

Está bien establecida para la hepatitis B durante el parto, aunque raramente durante el embarazo. Esto ha sido bien estudiado en las zonas hiperendémicas. La probabilidad de que una madre HBs y HBe positiva transmita el virus a su hijo varía del 25% en África al 85% en Extremo Oriente.

La transmisión vertical de la hepatitis C aún no está suficientemente documentada.

Distribución geográfica

Las hepatitis virales están distribuidas en todas las regiones del mundo. Las prevalencias y los aspectos epidemiológicos varían para cada variedad y para cada región. Las hepatitis virales de transmisión enteral son endemoepidémicas en las regiones de bajo nivel socioeconómico, principalmente en las zonas tropicales. En ellas, la hepatitis

afecta especialmente a los niños y la mayoría de los adultos tienen anticuerpos. En los países occidentales más desarrollados se observa lo mismo que con la poliomielitis en los años 60: fuerte disminución de la endemia de hepatitis A, aparición más frecuente en los adultos entre 30 y 40 años, con formas clínicas más graves que las que se producen en el niño.

La hepatitis E es grave para las mujeres embarazadas, quienes desarrollan frecuentemente formas mortales en África y formas de enteritis deshidratantes en Asia. Recientemente, han sido descritas epidemias de esta forma de hepatitis en México, en América del Norte y en Japón.

Las hepatitis virales de transmisión parenteral (principalmente la B) afectan a 2.000 millones de personas en el mundo. El número de portadores se estima en 500 millones y la mortalidad anual en 2 millones. La distribución geográfica es desigual; se pueden distinguir tres tipos de regiones.

- Regiones de fuerte endemia (Asia del Sur, África intertropical y China): toda la población está en contacto con el virus y hay un 10% de portadores crónicos.
- Regiones de mediana endemia (región del Mediterráneo): infección del 50% de la población con un 5% de portadores crónicos.
- En los países de baja endemia, los grupos de riesgo están representados por los toxicómanos, los hemofílicos y los homosexuales.

Las personas portadoras del virus B pueden

presentar coinfección o sobreinfección por virus D. La infección por virus D, si bien está presente en el mundo entero, tiene una fuerte prevalencia en toda la región del Mediterráneo, en el Oriente Medio, en África del Oeste, en ciertas regiones del Amazonas y en algunas islas del Pacífico Sur. En estas regiones, 80% de los portadores del virus B sufren coinfección por el virus D.

La distribución de la hepatitis C aún no es bien conocida, pero parece seguir una distribución paralela a la de la hepatitis B. La prevalencia de los anticuerpos antihepatitis C en la población general está evaluada entre el 0,5 y el 1% en Europa Occidental y en EE.UU. Sin embargo, las cifras son más elevadas en África negra, cercanas al 10%, mientras que en Asia, la hepatitis C está menos presente que la hepatitis B: 0,3 a 2% en Taiwán y 1,5 a 2% en Japón. En esos países, los grupos de riesgo para la hepatitis C son las personas que recibieron sangre, los toxicómanos, el personal de salud y los sujetos que no tienen pareja estable. En realidad, estos grupos de riesgo son comunes a los tres virus de transmisión parenteral.

Cuadro clínico

Las cinco infecciones por estos virus no pueden ser distinguidas por el cuadro clínico. La evolución de las hepatitis virales es extremadamente variable. Los cinco tipos pueden presentarse como una forma de hepatitis aguda sintomática o totalmente inaparente. La duración de la incubación varía desde algunas semanas a meses:

- Hepatitis virales de corta incubación:
 - VHA: 15 a 40 días, media 20 días.
 - VHE: 20 a 32 días.
- Hepatitis virales de larga incubación:
 - VHB: 30 a 150 días, media 75 días.
 - VHC: 30 a 120 días, media 50 días.

Cuadros de hepatitis fulminante, con insuficiencia hepatocelular y una tasa de mortalidad del 90%, ocurren en el 1% en las hepatitis A, en el 1% en las hepatitis B y en 2-10% en las hepatitis D. La infección con virus E se complica con hepatitis fulminante, principalmente en las mujeres embarazadas (10% de los casos). La frecuencia de hepatitis fulminante debidas al VHC es de difícil apreciación pues la muerte del paciente ocurre antes de la seroconversión.

Las hepatitis B, C y D pueden llevar al estado de portación crónica con o sin hepatitis crónica (10% por el VHB; 70-80%, cuando hay sobreinfecciones por VHD y 30-70% por el VHC). La mayoría de estas hepatitis crónicas son asintomáticas; se detectan por una elevación moderada de las

transaminasas que, por definición, persiste después de 6 meses del cuadro agudo.

Las hepatitis crónicas tienen una evolución variable: algunas curarán después de muchos años y otras (20-30% de las hepatitis B y C y 60-70% de las hepatitis D) evolucionan a cirrosis en 20 a 40 años.

Una complicación más tardía (20-50 años) es la aparición de carcinoma hepatocelular, que está asociado a la infección por virus B, pero también por virus C.

Las características clínicas y epidemiológicas no son más que elementos de orientación para el diagnóstico etiológico o para el seguimiento de una hepatitis viral. Sólo los estudios de los marcadores serológicos y la biología molecular permitirán un diagnóstico que, asociado al estudio histológico, darán un pronóstico preciso para el manejo terapéutico de las hepatitis crónicas.

Nuevos virus identificados en las hepatitis virales

Merece destacarse que el descubrimiento de nuevos agentes virales implicados en hepatitis no A, no B, no C, no D y no E ha sido bien establecido durante el año 1995 y no sería raro esperar la caracterización de varios otros agentes.

Nomenclatura

HGBV-A y HGBV-B: son dos virus aislados en monos tamarinos infectados experimentalmente con plasma de un cirujano (GB) que se contaminó operando, (de allí las iniciales del virus) y que había tenido hepatitis aguda en 1967. Son virus ARN de la familia *Flavivirus*; no se conoce su forma por microscopía electrónica y su secuencia y número de bases es de 9.034.

Los virus HGBV-C: virus ARN perteneciente a la familia *Flavivirus*, asimilado, por la constitución de sus genes, al grupo HCV, pero de secuencia nucleotídica muy diferente. Por lo tanto, no se trata de un nuevo genotipo. Es candidato a ser el virus G (HGV), por ahora llamado HGBV-C. Sus características principales son:

Transmisión: el contagio detectado por vía parenteral (transfusión, hemodiálisis) está bien documentado, aunque otras vías serían posibles.

Distribución geográfica: ha sido detectado en pacientes de África, Canadá, EE.UU., Japón y Europa. En Francia, la incidencia de portadores en la población sana sería de hasta el 1% y del 3% en pacientes con hemodiálisis.

Cuadro clínico: en general, se sabe poco sobre los cuadros clínicos de estos virus. Fueron des-

criptos como persistencias virales en suero en algunos casos, pero la inflamación del hígado no está documentada por patología clínica ni por alteraciones bioquímicas (elevación de ALT). Mutaciones, y por consiguiente genotipos diferentes, han sido señaladas como posible causa de un caso de hepatitis fulminante. Sin embargo a la hora actual (marzo 1998) no se les puede atribuir ninguna patología específica en estos virus.

HEPATITIS C

La infección por el HCV es un problema mayor de la salud mundial. Con los datos disponibles, la prevalencia promedio de sujetos infectados es de 1% a 2%. Esto hace unos 350 millones de personas infectadas en la Tierra. La característica mayor del HCV es el alto grado (60% a 80%) de infecciones crónicas con riesgo de hepatitis crónicas activas, cirrosis y hepatocarcinoma. Hay todavía muchas incertidumbres en cuanto a la historia natural de la infección por HCV en la hepatitis viral fulminante sola en ausencia de infección conjunta con el virus de la hepatitis B (HBV). También es difícil definir un estado clínico de portador asintomático, definido por una histología hepática normal a pesar de la replicación viral existente. Sería, sin embargo, una minoritaria condición, ya que la mayoría de los infectados crónicos muestran una hepatitis crónica activa de severidad variable.

El genoma del HCV y su ciclo viral

El HCV pertenece a la familia de los *Flaviviridae* (compuesta por los *Flavivirus* y los *Pestivirus*). Es un virus ARNss con sentido positivo. Tiene un promedio de 9.400 bases. Tiene dos regiones no codificantes en los extremos 5' y 3' y, en el medio, un largo fragmento de su genoma (open reading frame), que codifica 3.010 a 3.030 aminoácidos de una sola poliproteína. Esta poliproteína es procesada en el citoplasma y genera las proteínas estructurales (S) y no estructurales (NS), gracias a las enzimas celulares y virales respectivamente (*Gráfico 5 D*).

La estructura molecular de las partículas es poco conocida. La falta de un cultivo celular *in vitro* impide conocer más sobre el ciclo replicativo así como sobre la formación morfológica del virus. Las partículas virales circulan libres (baja densidad en el plasma, ligadas a las VLD lipoproteínas) o ligadas a las HDL lipoproteínas e inmunoglobulinas (plasma de alta densidad). Las secuencias de las proteínas E1 y E2, así como de la proteína de la cápside (C), fueron deducidas del secuenciado genómico (fue el primer virus en conocerse su genoma antes que su

visualización al ME) con la estrategia de la genética inversa. Esto posibilitó la síntesis de péptidos y la producción de proteínas recombinantes, con las que se fabrican las pruebas de 1ª, 2ª y 3ª generación, cada vez más específicas y sensibles. La proteína del core o cápside (C) tiene influencia sobre varias y diferentes proteínas celulares. En su N terminal contiene un "banding", dominio que liga el ARN genómico viral para su encapsidación. Esta misma secuencia tiene un potencial ADN banding y controlaría la regulación de varios genes virales y celulares.

Las proteínas NS y las envolturas (E1 y E2) están localizadas en el citoplasma de la células, al igual que la proteína C, aunque esta última ha sido localizada en el núcleo. En todas ellas están presentes fosforilaciones y glicosilaciones. Ratitas transgénicas que expresan la proteína C, muestran patologías como la esteatosis hepática. Todo sugiere la participación de estas proteínas en las diferentes manifestaciones clínicas del HCV. La multiplicación del HCV se refleja con la medición del ARN genómico (carga viral) a medida que transcurre la infección crónica y muchos años después, la cirrosis y el carcinoma hepático.

En esto es diferente a la hepatitis B, en la cual la multiplicación viral se detiene cuando se desarrolla la cirrosis. La cantidad de virus en una infección crónica oscila entre 10^5 a 10^7 moléculas de ARN por ml y los estudios cinéticos en enfermos tratados con interferón muestran que puede haber una producción diaria de 10^{10} viriones y con alto recambio de virus (turnover).

La relación con la cantidad de virus, en el curso de las diferentes patologías nunca ha sido bien establecida (esto contrasta con el HIV), aunque el aumento en enfermos inmunodeprimidos y en los coinfectados con HIV, es correlacionado con la severidad de la hepatitis crónica. La carga viral intrahepática no se conoce bien.

Los mecanismos de la replicación viral del virus HCV no son bien conocidos. No hay evidencias de un ADN viral intermediario. Como en el caso de los flavivirus y los pestivirus, probablemente el HCV pasa por un ARNss negativo intermediario. Muchos conocimientos de laboratorio se han obtenido a partir de líneas celulares infectadas de linfocitos B y T, células de carcinomas hepáticos (HuH7) y células fetales hepáticas humanas. Hoy se sabe que la inyección de ARNss en hígados de monos chimpancés produce una viremia de virus completos de HCV, asemejándolos en este aspecto al poder infeccioso que tienen los ARNss positivos solos de los picornavirus, como ya vimos en la *Parte I (Gráfico 3B)*.

La variabilidad genética del HCV

El genoma del HCV es muy variable: hay un cambio de base cada 1.000 bases, en un área geográfica por año. La variación ha sido vista a todo lo largo del genoma codante, pero es predominante a nivel de las secuencias que codifican por la E2 proteína, en el interior de la cual hay una región hipervariable (HVR1). Menos variabilidad se encuentra en las regiones que codifican por la NS5A y proteína C. Sin embargo, las extremidades 5' no codantes son altamente estables y conservadas cuando se comparan diferentes cepas aisladas. La metodología usada para clasificar está basada en las regiones NS5A, E1 y C y no en todo el genoma (lo que sería más lógico para la mayor posibilidad de comparación). Los HCV se clasifican en genotipos, subtipos y aislamientos que difieren en 30%, 20% y 10%, respectivamente, en la homología de las regiones del genoma antes dicha. Así se conocen 3 genotipos principales y 14 subtipos. Con una comparación más extensa de los genomas, habría 3 a 7 genotipos y unos 54 subtipos (*Gráfico 5 A*). La marcada diferencia genómica entre los genotipos, permitió establecer su divergencia en el tiempo, que oscila entre 500 a 2000 años, mientras que algunos subtipos podrían haber aparecido hace más de 300 años, después de una infección endémica en un área geográfica determinada.

A estas marcadas diferencias que existen entre los tipos y subtipos se agrega la gran variabilidad de un mismo virus, en un mismo paciente, debido a las mutaciones puntuales, sobre todo en la región HVR1. Así las cuasiespecies circulantes son enormes, a partir de un primer virus, pero las diferencias son mínimas para poder ser consideradas como nuevos genotipos.

Los mecanismos moleculares de la persistencia del HCV

El fenómeno más importante, después de la infección por HCV es la infección crónica. Los mecanismos moleculares de la persistencia y fisiopatología del HCV estarían en relación a:

- 1) Variabilidad genética, con ello el virus crea mutantes permanentes que escapan al sistema inmunitario (escape mutants). Así los anticuerpos y los linfocitos citotóxicos específicos contra las proteínas S y NS dejan de ser actuales en permanencia. Es por eso que la resolución espontánea de la infección no es frecuente en la naturaleza. Así, la inmunidad específica generada por los linfocitos B y T llega "tarde".
- 2) La presencia de HCV en las células extra-

hepáticas, sobre todo en monocitos, podría representar un nicho de fuentes productoras y transportadoras de virus.

- 3) No se demostró aún claramente una relación de haplotipos de HLA de clase II, con una mayor o menor resistencia a la infección crónica.
- 4) La inducción de citoquinas, moléculas de la familia de los factores necróticos tumorales (TNF) e interferones, formaría parte de las moléculas que influyen en la persistencia de la replicación viral.

En la evolución fisiopatológica molecular de la enfermedad, es claro que desde el punto de vista del virus, la cantidad de virus circulante (carga viral), el tipo de virus (genotipo viral) y la complejidad de su genoma (cuasiespecies virales) son los parámetros más importantes a tener en cuenta en el momento del tratamiento o al considerar un pronóstico de evolución. Así, el genotipo 1b y una elevada carga viral han sido asociados a una pobre respuesta al interferón α y el genotipo a una buena respuesta con valores biológicos retornando a los normales, respectivamente (estudio realizado en Francia).

En Japón, en pacientes con alto grado de heterogeneidad en su población viral (cuasiespecies), también se asocia a una pobre respuesta al interferón α .

El genotipo del HCV y la severidad de la lesión hepática

No es claro si un genotipo (y subtipo) en especial de HCV favorece la cirrosis y el carcinoma hepatocelular o si están asociados al modo de contaminación, por ej.: el tipo 3 es más frecuente en los drogadictos.

El genotipo 1b, es sospechado de estar asociado a la evolución de hepatitis crónicas activas, cirrosis y hepatocarcinoma, sugiriendo ser más virulenta la evolución de la infección. Estos datos surgen de estadísticas de transplantados hepáticos que se reinfectan en 90% y constituyen casi un modelo experimental. En efecto, se conoce exactamente el momento de la contaminación del nuevo órgano, la evolución de genotipo, cuasiespecies y carga viral, la medición de anticuerpos y linfocitos, que son estudiados secuencialmente.

Si bien la derivación de HCV a cirrosis y cáncer es claramente observada, poco se sabe de los mecanismos moleculares que inciden en la transformación celular.

Como muchos factores predisponentes a la cancerización, el ciclo de inflamación crónica,

necrosis celular, regeneración, fibrosis y cirrosis ocurre en la infección crónica con HCV. Así también, la pobre y buena respuesta al tratamiento con interferón de los genotipos 1 b y 2 respectivamente hace sospechar un rol preponderante en la transformación celular del primero.

Conocer el genotipo y el ciclo viral completo del virus ayudará a comprender su persistencia, resistencia o sensibilidad a los tratamientos existentes. Parece lógico suponer que el tratamiento veloz (con antivirales eficaces que aún no están completamente desarrollados) podría actuar bajando el número de variantes virales y la cantidad de virus, reduciendo la inflamación hepática activa y su círculo vicioso.

PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

Por lo dicho anteriormente, son varias las líneas de trabajo científico que se desarrollan en la lucha contra el HCV.

En lo básico, el conocimiento de la respuesta inmunológica natural y las variaciones del genoma

del HCV, tanto en el plano individual como en los diferentes medios geográficos, ayudarían a la construcción de una vacuna. También el cultivo del virus in vitro (esto es casi una regla para todos los virus de las hepatitis que infectan el hepatocito y no se pueden cultivar todavía in vitro) ayudará a comprender el ciclo viral y en consecuencia, nuevos blancos para la síntesis de moléculas antivirales. En ese campo, la reciente cristalización de las proteínas (complejo de proteasas NS3 y NS4) y las otras que vendrán, serán los moldes para las moléculas antiproteasas o contra las otras proteínas, esenciales para la replicación viral. Las armas disponibles hasta el presente: el interferón y la rivabirina (que neutraliza la ARN polimerasa viral), tienen resultados limitados.

En lo que concierne al diagnóstico, la medicina molecular, gracias a la determinación de la carga viral, el genotipo y el secuenciado de segmentos del genoma de HCV, ayuda a vigilar la evolución de un tratamiento, evaluar el pronóstico y seguir la epidemiología molecular de este virus. ■

GLOSARIO

HVR1: Hipervariable región 1. Esta sigla se aplica a cualquier genoma viral de cualquier virus. Molecularmente significa que es una región donde las mutaciones superan la media de otras regiones, medianamente o completamente estables.

Citoquinas: Es un término genérico que involucra cuatro grupos de proteínas solubles que permiten la interacción entre las células (sobre todo las ligadas al sistema inmunitario). Los cuatro grupos son: las interleuquinas, los interferones, los factores de crecimiento de las células hematopoiéticas y los factores necrosantes de tumores (TNFs)

Interferones (INFs): Es un grupo de proteínas que aumentan la inmunidad antiviral y que pueden modificar la respuesta inmunitaria al cáncer. Se conocen cinco clases de INFs: alfa (α), beta (β), gamma (γ), omega (ω) y tau (τ). Según su

estructura molecular y funcionalidad biológica, se agrupan en: tipo I: alfa (α), beta (β), omega (ω) y tau (τ); el tipo II: integrado sólo por gamma (γ). Cualquier célula infectada por un virus puede producir INFs tipo I, sobre todo el INF α , en tanto que sólo los linfocitos T pueden producir el INF γ , cuando son advertidos de la presencia de cualquier agente infeccioso, además de los virus, o de células cancerosas.

Tumor Necrosis Factor (TNF): Los factores necrosantes de tumores son uno de los grupos de citoquinas, producidos por macrófagos mastocitos y linfocitos alfa (α) producidos por los macrófagos y los TNF β producidos por los linfocitos T.

Helicasas: Constituyen una gran familia de enzimas con actividad ATPasa (hidrolizan el ATP), que catalizan la separación progresiva y regular de dos hebras de ADN o ARN, rompiendo las

ligaduras entre los hidrógenos de las purinas y las pirimidinas. Las funciones en las que participan las helicasas son variadas; replicación y reparación del ADN, el splicing del ARNm, la regulación de la transcripción y la traducción.

Proteasas: Las proteasas son una familia de enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas. Son enzimas que hidrolizan las proteínas. Hay dos tipos: las exopeptidasas y las endopeptidasas.

Las primeras cortan uno a uno los aminoácidos a partir de las extremidades NH_2 o COOH de las proteínas. Las segundas actúan en diversos sitios al interior de la secuencia de la proteína. A modo de recuerdo, las enzimas se dividen en seis grandes grupos: 1) oxidorreductasas; 2) transferasas; 3) hidrolasas; 4) liasas; 5) isomerasas y 6) ligasas.

BIBLIOGRAFIA

- Fields B, Knipe D, Howley P, eds. Fundamental virology. 3rd ed. New York: Lippincot Rowen, 1996.
- Kaplan JC, Delpech M. Biologie moleculaire et medicine. Medicine Sciences Flammarion. 2nd Edition 1994.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Laurence Ziparsky S, Matsudaira P, Donnell J. Molecular cell biology. Scientific American Books. Third Edition 1995.
- Pelmont J. Enzymes, catalyseurs du monde vivant. Press Universitaires de Grenoble. 2nd. Edition 1995.

*Investigar es ver lo que otros ven
pero pensar lo que otros no piensan.*

HANS KREBS