



Acta Científica

de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 6 N° 1 - 2 - Año 2000 ISSN 1315-1746 Depósito Legal pp 199202DF899 Suscrita a Lilacs, Asereme, Bireme

HEPATITIS VIRALES

Biología de los Virus de Hepatitis

Variabilidad genética del virus de la Hepatitis B y sus implicaciones

Infección oculta por el virus de la Hepatitis B, (VHB)

Biología Molecular del virus de Hepatitis C

Marcadores Serológicos en las Hepatitis Virales

Diagnóstico Clínico de las Hepatitis



Editorial

Luego de un receso involuntario se reanuda la publicación de la presente Revista. Quiénes se encargan de su edición tuvieron que realizar grandes esfuerzos para superar los escollos derivados de la situación económica que afecta al país. Actualmente, se adelantan planes para tratar de obviar los problemas surgidos y garantizar que la revista «Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas» llegue a todos con la frecuencia planificada.

Pese a lo económico expuesto en el párrafo anterior la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas avanzó en su programa de trabajo, especialmente en lo referente a homologar conocimientos para tratar de implantar normas que permitan desarrollar un programa de seguridad operativa para los Servicios de Bioanálisis; ya existen conclusiones al respecto y el año próximo debe ser una realidad el normar varios aspectos referentes a instrucciones al paciente y formas de reporte en el área de la Bacteriología. Se incrementará el trabajo para lograr hacer lo mismo en la parte de la Bioquímica y Hematología. De igual manera, se ha realizado una labor para tratar de incrementar la participación del Bioanalista en el campo de la investigación científica, ese trabajo deberá reflejarse en los congresos y jornadas de la Sociedad, así como también, en el contenido de los próximos números de esta Revista.

Hay optimismo para alcanzar las metas programadas dentro del plan de seguridad operativa, pero existe preocupación porque siempre son pocos los que trabajan para lograr los objetivos propuestos y de allí, el mayor esfuerzo a realizar para concretarlos. Tal vez por esto viene a nuestra mente una y otra vez el recuerdo del espíritu tesonero y creador de muchos de los miembros fundadores de la Sociedad quienes aún son cantera de fe. De igual manera con gran dolor recordamos a los muy valiosos que ya se han ido al cambio del infinito, dentro de estos últimos, en el lapso de receso en la publicación de la presente Revista se halla Carmen Llatas de Szczerban. Ella nos dejó en octubre de 1997 y fue digno ejemplo por su tesón, coraje, fe y optimismo no sólo en el ámbito profesional sino también en los difíciles momentos vividos por causa de la enfermedad que minó su organismo. Su labor se digna de encomio, por sus buenos oficios se incluyó el área de Genética en el I Congreso Venezolano de Bioanálisis en 1981, en el cual se distinguió como expositora, posteriormente por su empeño e intermedio, reconocidos conferencistas actualizaron a los Bioanalistas en lo que era noticia para la época respecto al proyecto genoma humano. Siempre al servicio de una causa ayudaba en la edición de esta Revista o en las tareas propias de la Junta Directiva de la S.V.B.E., todavía al final de sus días sacaba fuerzas de donde no las había para asistir a la asamblea de dicha Sociedad, vaya este recuerdo como homenaje póstumo a quien fue pilar fundamental para el desarrollo de nuestra profesión.

Con el mismo cariño que tiene en el recuerdo la Lic. Llanas de Szczerban, rendimos tributo al Dr. J.J. Gutiérrez Alfaro, quien fue reconocido médico microbiólogo, Director de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela y profesor de muchos bioanalistas. Por coincidencia él también se fue en un mes de octubre pero esta vez del presente año, ambos deben estar en el camino de luz que sin lugar a dudas han de recorrer quienes dejaron huella en este mundo por su afán de superación, apego al quehacer científico y en especial por el aspecto ético de su labor diaria. Sea el ejemplo de ellos faro que por el camino de la esperanza nos conduzca al puerto donde se logren los más preciados sueños.

Josefina Guariguata
Presidente
Junta Directiva de la S.V.B.E.

BIOLOGÍA DE LOS VIRUS DE HEPATITIS

Dra. Flor Pujol, Ph. Sc.

Laboratorio Biología de Virus. CMBC.

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)

RESUMEN

El alfabeto que conforman los virus causantes de hepatitis ha crecido en forma significativa en estos últimos años. Estos virus pertenecen a familias virales muy distintas y se dividen además en virus de transmisión entérica y de transmisión parenteral. Antes de 1989, se conocían el VHA, picornavirus de transmisión entérica y sin mayores secuelas, el VHB, hepadnavirus de transmisión parenteral, con secuelas de cirrosis y cáncer de hígado y el VHD, deltavirus que requiere una co-infección por el VHB para poder replicarse en forma efectiva y responsable de muchos casos de hepatitis fulminantes. En 1989, se descubre por técnicas de biología molecular, el VHC, hepacivirus miembro de la familia flaviviridae, de transmisión parenteral y cuya infección está asociada a secuelas similares a las del VHB. En 1990 se identifica el VHE, virus de transmisión entérica. El VHF es un término reservado a un virus de transmisión entérica, cuya identificación en la India es todavía controversial. En la búsqueda del virus responsable de hepatitis post-transfusional no A hasta no E, entre 1995 y 1996 se describe el denominado VHG, de transmisión parenteral, utilizando herramientas cada vez más novedosas de biología molecular, aunque este virus no parece causar hepatitis. Más recientemente se identifican el TTV (1997) y el Sen-V (2000), de nuevo por técnicas de biología molecular. ¿Será alguno de estos virus al fin el responsable de las hepatitis post-transfusionales no A hasta no G?...

PALABRAS CLAVE: VIRUS DE HEPATITIS, BIOLOGÍA MOLECULAR, TRANSFUSIÓN, REPLICACIÓN, GENOMA, VIRIÓN, EPIDEMIOLOGÍA, VIROLOGÍA.

SUMMARY

The alphabet comprising the hepatitis viruses (HV) has considerably expanded in the last few years. Hepatitis viruses belong to different families and are divided according to their mode of transmission; either parenteral or enteric. Before 1989, only 3 HV were known: HAV, an enteric picornavirus; HBV, an hepadnavirus of parenteral transmission and associated to severe sequelae like cirrhosis and hepatocellular carcinoma; and HDV, a deltavirus which requires HBV coinfection and is responsible for many cases of fulminant hepatitis. In 1989, thanks to the use of genetic engineering techniques, HCV was discovered. This virus is an hepacivirus member of the family Flaviviridae, and is associated to severe sequelae like HBV. The molecular discovery of HCV was followed one year later by the cloning of the enteric HEV, using a similar approach. HFV is a term reserved for a viral entity whose identification is controversial. In the sake for the virus responsible for post-transfusion hepatitis non-A to non-E, between 1995 and 1996, and using more sophisticated techniques, HGV was identified; however this virus does not seem to cause hepatitis. More recently, TTV (1997) and Sen-V (2000) were discovered, again using molecular biology tools. Will any of these viruses be held as the real responsible for post-transfusion hepatitis non-A to non-G?...

WORDS KEY: HEPATITIS VIRUS, MOLECULAR BIOLOGY, TRANSFUSION, REPLICATIONS, GENOME, VIRION, EPIDEMIOLOGY, VIROLOGY.

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 5-12

Aceptado para su publicación junio de 2000

INTRODUCCIÓN

Tipos de hepatitis virales

Se conocen en la actualidad al menos 5 virus que causan hepatitis (Tabla 1). Estos pertenecen a distintas familias y se dividen en virus de transmisión entérica (transmisión por aguas y alimentos contaminados) y de transmisión parenteral (las transfusiones sanguíneas, la drogadicción, la promiscuidad sexual, la hemofilia y la hemodiálisis, son entre otros los factores de riesgo). En general, las infecciones por virus de transmisión parenteral son más graves, ya que muchos de estos virus pueden persistir, con secuelas graves para el hígado¹.

Recientemente, se han descrito otros nuevos candidatos para engrosar el alfabeto viral, más la adjudicación definitiva de alguno de estos virus dentro del grupo es todavía controversial. Esta revisión pretende resumir algunos aspectos relevantes de la biología de estos virus y del estado actual de la investigación en ellos.

Virus de la hepatitis A (VHA)

El VHA, virus de transmisión entérica, es altamente endémico en países en vías de desarrollo, aunque la prevalencia de anticuerpos en ciertos sectores socioeconómicos de estos países parece haber disminuido en estos últimos años^{2,3}. Este virus pertenece a la familia *Picornaviridae*. Ciertas características únicas en su replicación hacen que el VHA pertenezca a un género distinto, hepatovirus, dentro de esa familia¹.

El virión no presenta envoltura lipídica y posee un diámetro de 27 nm. El genoma del VHA consiste en un ARN de 7,5 Kb (7500 bases) de polaridad positiva –es decir, capaz de servir directamente como ARN mensajero– que codifica para una poliproteína de aproximadamente 2200 aminoácidos¹ (Figura 1). Es uno de los pocos virus causantes de hepatitis que ha sido

adaptado a cultivo en forma eficiente por el momento, lo cual ha permitido la producción reciente de una vacuna inocua y efectiva^{1,4}. Uno de los aspectos más relevantes de la investigación actual sobre esta vacuna consiste en evaluar la duración de la respuesta protectora. Estudios preliminares parecen indicar que esta vacuna inactivada provee una protección de larga duración.

Virus de la hepatitis B (VHB)

Aproximadamente 350 millones de personas en el mundo están infectados en forma crónica con el VHB y más de un tercio de la población mundial ha sido infectada por este virus⁵, encontrándose las mayores prevalencias para esta enfermedad en el sudoeste Asiático y en África ecuatorial y del sur¹. Venezuela presenta un nivel de prevalencia intermedia (1-5%), con 4 focos de alta endemicidad: Amerindios del Edo. Amazonas, del Edo. Delta Amacuro, de la Sierra de Perijá (Edo. Zulia) y un foco más recientemente descrito en el Edo Barinas⁶⁻⁸.

El VHB es un hepadnavirus; es el único virus causante de hepatitis identificado en forma definitiva hasta la fecha, cuyo genoma esté compuesto por ADN. El virión posee un diámetro de 42 nm, presenta una envoltura lipídica y su genoma consiste en un ADN circular, parcialmente de doble hebra, de aproximadamente 3200 pares de bases. Esto se debe a un fino aprovechamiento del material genético, donde son usados distintos marcos abiertos de lectura y sitios de iniciación de la transcripción para generar 7 proteínas virales. Es interesante destacar entre estas proteínas la polimerasa viral, que presenta homología con las transcriptasas reversas de los retrovirus. En efecto, si bien este virus está compuesto por un genoma de tipo ADN, durante la replicación se forma un intermediario ARN que es transcrito a ADN, mediante esta polimerasa con actividad de transcriptasa reversa^{1,9} (Figura 2).



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

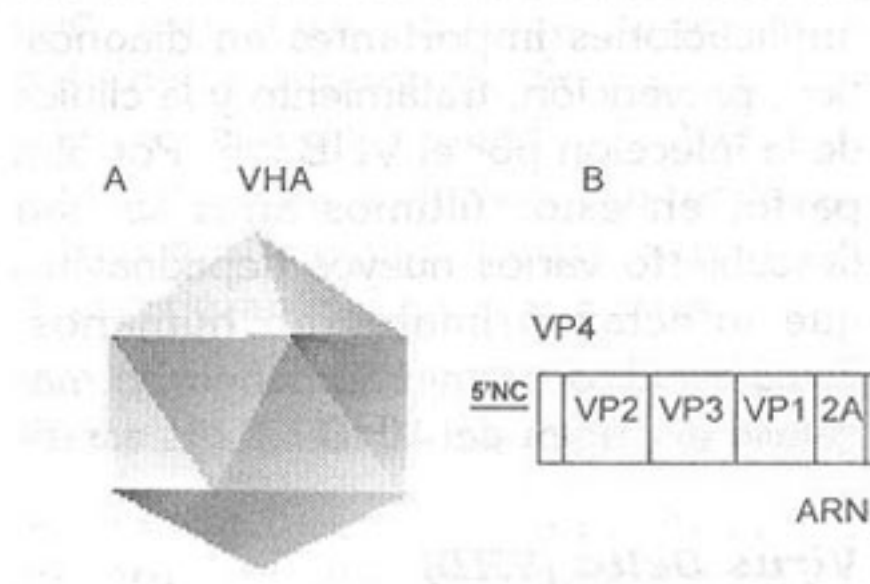
Biología
de los Virus
de Hepatitis

Virus	VHA	VHB	VHC	VHD	VHE
Género	Hepatovirus	Hepadnavirus B	Hepacivirus	Deltavirus	?
Familia	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	?	
Genoma	ARNsc	ADNdc	ARNsc	ARNsc	ARNsc
Replicación	+ ARN	+ ARN intermediario	+ ARN	- ARN	+ ARN
Modo de transmisión	Fecal-oral	Percutáneo, venéreo	Percutáneo	Percutáneo	Fecal-oral
Periodo de incubación (días)	20-37 (15-49)	60-110 (25-160)	35-70 (21-84)	Aparentemente comparable al tipo B	10-56
Serología	Desarrollo temprano de anticuerpos IgM y de IgG durante la convalecencia	El antígeno AgsHB y anticuerpos anti-HBc aparecen tempranamente y persisten en portadores.	Anti-VHC aparecen de 6 semanas a 9 meses.	Anti-VHD aparecen tardíamente y son de corta vida.	Anticuerpos IgM usualmente son detectados dentro de los 26 días de ictericia; anticuerpos IgG persisten indefinidamente.
Curso	No progresa a una enfermedad crónica del hígado	La hepatitis crónica se desarrolla en el 5-10% de los adultos y en un 80-90% de los niños.	La hepatitis crónica se desarrolla en el 70-90% de los casos.	>95% de resolución de la coinfección con VHB; la infección crónica es común si la superinfección por VHD se encuentra presente en portadores crónicos de VHB.	No progresa a una enfermedad crónica del hígado
Mortalidad	0-0.2% hepatitis fulminante	0.3 al 1.5%	Desconocido	2-20% para hepatitis aguda. >70% entre los Amerindios.	1-2% en la población general. 10-15% en mujeres embarazadas.

Tabla 1
Características de las hepatitis virales

Existen otros miembros dentro de la familia *Hepadnaviridae*, causantes de hepatitis en diversas especies de aves y mamíferos. Estos virus han servido de modelo experimental en el estudio de la patogénesis de esta enfermedad, en particular en el potencial oncogénico de estos virus. Una característica única de esta familia consiste en que por cada virus circula un gran número de partículas vacías, de forma esférica o alargadas, compuestas por el denominado antígeno de superficie o antígeno Australia (AgsHB). Esta característica ha facilitado enormemente la detección de este virus por medio del diagnóstico serológico y el desarrollo de una vacuna altamente inocua y efectiva contra este agente viral¹.

El VHB se transmite esencialmente por la vía parenteral. Ya que este virus puede circular en altas concentraciones en



sangre, la transmisión percutánea, nosocomial y horizontal ha sido también documentada¹. La transmisión vertical ocurre principalmente en países del suroeste Asiático. Mientras que la tasa de cronicidad en adultos es de un 10%, un 90% de los niños infectados a partir de madres portadoras, no remiten de la enfermedad, debido probablemente a un fenómeno de tolerización en el útero^{10,11}. Un alto porcentaje de los individuos crónicamente infectados desarrolla cirrosis y otras lesiones severas del

Figura 1
Esquema de una partícula viral (A) y del genoma del VHA (B).

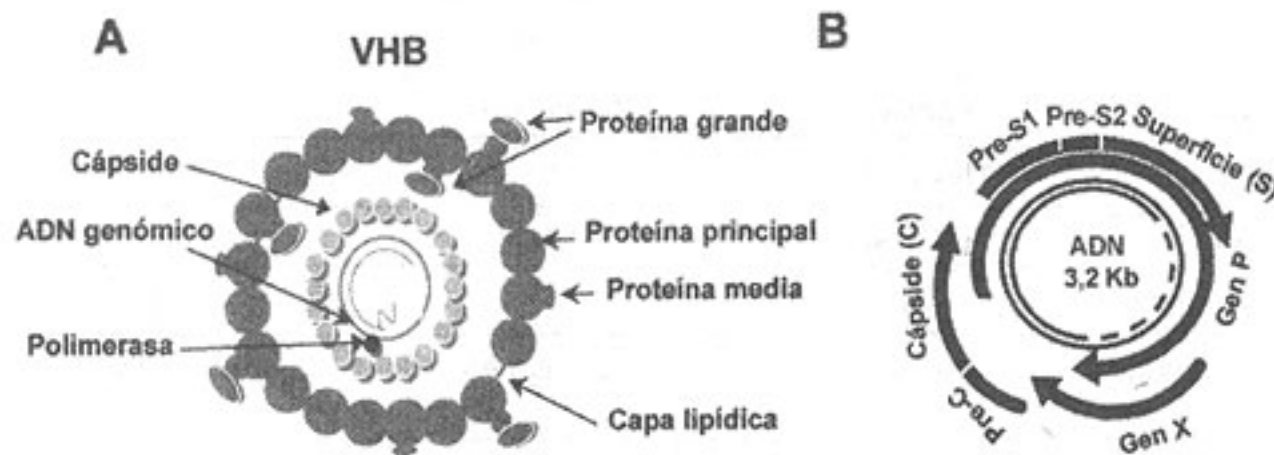


Figura 2

Esquema de una partícula viral infectiva (A) y del genoma del VHB (B). Nótese el alto grado de aprovechamiento del material genético gracias al solapamiento de los marcos abiertos de lectura. Un total de 7 proteínas es codificado en el genoma viral: los antígenos de superficie en su forma larga, mediana y pequeña (iniciando la traducción en pre-S1, Pre-S2 y S, respectivamente), los antígenos e y cápside (iniciando en pre-C y C respectivamente) la polimerasa viral y la proteína transactivadora X.

hígado como carcinoma primario de este órgano¹. En cuanto al desarrollo de cáncer, existen evidencias epidemiológicas y moleculares que demuestran el potencial oncogénico de este virus^{1,12}.

Uno de los temas de mayor relevancia en la actualidad en el campo de la hepatitis B es el estudio de las variantes virales. La característica de la replicación de este virus a través de la transcripción reversa de un intermediario ARN le confiere un potencial de variabilidad genética mayor que la de los virus ADN¹³. Este grado de variabilidad es sin embargo menor en general que la de los virus ARN, debido al alto grado de solapamiento entre los distintos marcos abiertos de lectura de este compactado genoma. Las variantes del VHB tienen implicaciones importantes en diagnóstico, prevención, tratamiento y la clínica de la infección por el VHB^{14,15}. Por otra parte, en estos últimos años se han descubierto varios nuevos hepadnavirus que infectan primates no humanos. Estos estudios permitirán definir en más detalle el origen del VHB^{13,16}.

Virus Delta (VHD)

Las primeras evidencias de existencia del virus Delta fueron obtenidas a mediados de los años 70 por Mario Rizzetto, un gastroenterólogo italiano. Alrededor de 1980, experimentos de transmisión en chimpancés muestran que se trata de un patógeno defectivo que requiere la coinfección con el VHB. El VHD está asociado a formas más severas de hepatitis agudas y crónicas, siendo responsable de las hepatitis fulminantes de los Amerindios Yukpas¹⁷ y Yanomamis¹⁸.

Este agente ha sido clasificado dentro del género deltavirus, sin haber sido adjudicado todavía a alguna familia viral. El VHD presenta similitud en su organización genómica y su mecanismo de replicación con los viroides y en particular con los virus satélites de plantas. Al microscopio electrónico se observan partículas heterogéneas en tamaño, de 30-40 nm de diámetro, cuya envoltura consiste en el antígeno de superficie del VHB. El genoma está constituido por un ARN sencillo de 1,7 Kb, siendo éste el genoma del virus animal más pequeño conocido hasta la fecha. Este virus posee un interesante mecanismo de replicación en círculos que son escindidos por una actividad catalítica endógena del ARN viral, denominada ribozima^{1,19} (Figura 3).

Uno de los aspectos más interesantes de la infección por el VHD es la complementación que existe entre este virus y el VHB y como ciertas combinaciones de genotipos de ambos virus son responsables de un alto número de hepatitis fulminantes. Este es el caso por ejemplo del VHD genotipo III que circula en Sur América combinado con el genotipo F del VHB²⁰. En Venezuela circula igualmente el genotipo III del VHD pero también ha sido introducido el genotipo I²¹.

Virus de la hepatitis C (VHC)

En 1989, se descubre por técnicas de biología molecular, el VHC, responsable de la mayoría de los casos de hepatitis post-transfusional no A - no B²². El VHC es un virus de 55 nm de diámetro que presenta envoltura lipídica y posee un genoma compuesto de una cadena lineal positiva de ARN de 9,4 Kb, con una organización similar a la de los flavi y pestivirus, por lo cual pertenece a un nuevo género, hepacivirus, de la familia *Flaviviridae*. Este ARN de polaridad positiva codifica para una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, que luego es procesada por proteasas virales y hospederas para generar 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales^{1,23} (Figura 4).



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología
de los Virus
de Hepatitis

La transmisión del VHC es esencialmente por la vía parenteral, siendo la transmisión sexual y vertical más limitada que la observada para el VHB. Existen evidencias epidemiológicas de que este virus está igualmente asociado a carcinoma hepatocelular, aunque los mecanismos moleculares son aún desconocidos¹.

En estos últimos años ha habido un considerable interés en la identificación del receptor para el VHC. En 1998 se identificó a la molécula CD81 como la proteína que unía a la glicoproteína E2 del VHC con alta afinidad²⁴. Sin embargo, más recientemente se demuestra que la interacción de la glicoproteína de envoltura con esta molécula no es seguida de internalización y por ende no conllevaría a la penetración del virión²⁵. El receptor de la lipoproteína de baja densidad o LDL ha sido también propuesto como un mecanismo indirecto de entrada del virus a la célula²⁶.

El obtener una vacuna efectiva contra el VHC reviste muchas dificultades debido al alto grado de variabilidad que presenta este virus y al escaso conocimiento que se tiene sobre la respuesta inmunitaria efectiva contra este agente. Actualmente se dispone de un tratamiento combinado con Interferón (IFN) y Ribavirina (un antiviral) mediante el cual se alcanza hasta un 50% de remisión en pacientes infectados con ciertos genotipos del VHC. Un tratamiento probablemente más eficaz está siendo actualmente ensayado, que consiste en el uso de un IFN de más larga duración, el IFN pegilado²⁷. Así mismo, en estos últimos años se ha logrado la cristalización de dos proteínas no estructurales del VHC, la proteasa NS3 y la polimerasa NS5. Estos estudios apuntan hacia el desarrollo de antivirales con miras a terapias combinadas similares a las disponibles para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)²⁸.

Virus de la hepatitis E (VHE)

En 1990 se identifica en forma definitiva (ya se conocía su existencia), de nuevo

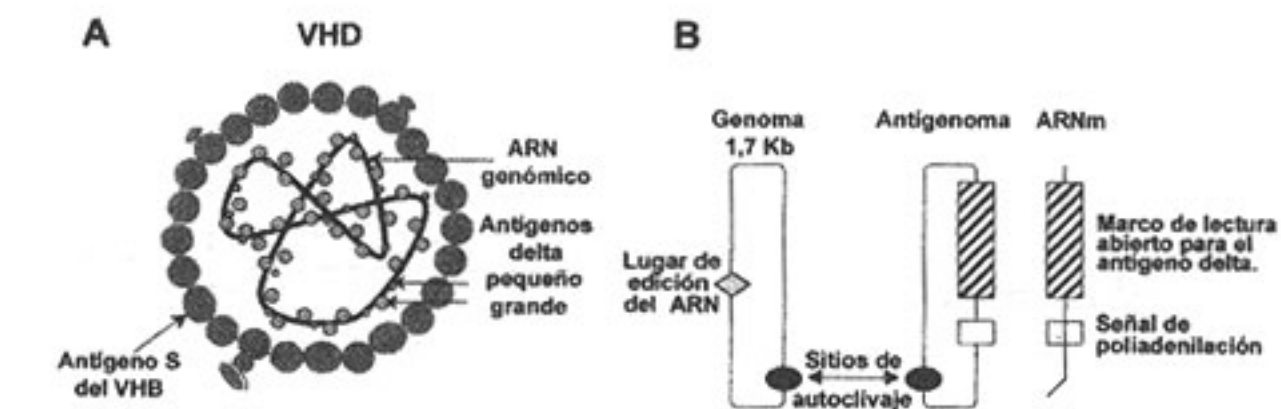


Figura 3

Representación esquemática (A) y genoma (B) del VHD. A: Este virus está conformado por un ARN que codifica una única proteína, el antígeno delta (AgHD). El ARN del HDV y el AgHD se encuentran rodeados por el antígeno de superficie del virus de hepatitis B (AgsHB). B: Los ARNs del VHD. Estos ARN sufren edición (para convertir el codón de terminación del AgHD pequeño en un triptófano y permitir así la síntesis de la proteína grande con 19 ó 20 aminoácidos adicionales), autoclave, autoligación y poliadenilación.

por técnicas de biología molecular, el VHE, virus de transmisión entérica. El VHE es un virus con simetría icosaédrica, un diámetro de 32 nm y posee un ARN de cadena sencilla de 7,5 Kb (Figura 5). Una de las características más importantes de esta infección es que es responsable de un alto porcentaje de hepatitis fulminantes en mujeres embarazadas. La organización genómica de este virus, compuesta por 3 marcos abiertos de lectura, recuerda a la de los calicivirus, aunque ciertas características de su genoma no permiten su clasificación dentro de ninguna de las familias de virus ARN de polaridad positiva conocidos hasta la fecha^{1,29,30}.

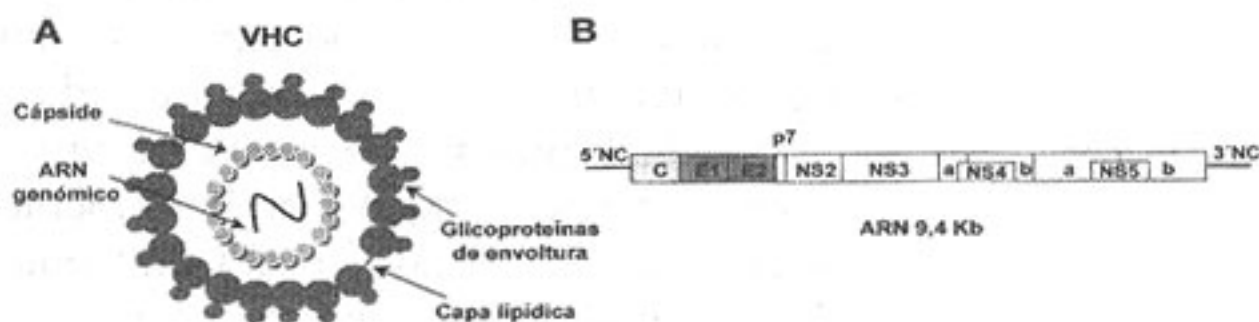
Una característica interesante y recientemente descubierta del VHE es que este virus parece tener una naturaleza zoonótica. Se han descubiertos virus relacionados al VHE en cerdos y más recientemente en roedores; esto significa que podría existir un reservorio animal para este virus^{31,32}.

Virus No A- No B- No C- No D- No E

Se piensa que existe aún un cierto número de casos de hepatitis aguda y crónica que no pueden ser atribuidos a ninguno de los virus causantes de hepatitis identificados hasta la fecha. Se postula que existen al menos otros dos virus causantes de hepatitis, uno de

Figura 4

Esquema de una partícula viral (A) y del genoma del VHC (B).



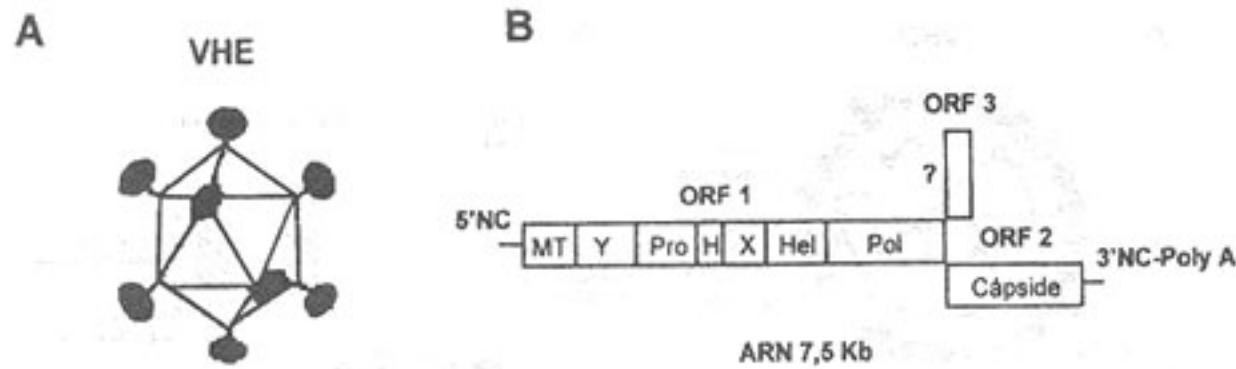


Figura 5

Esquema de una partícula viral (A) y del genoma del VHE (B). El genoma comprende 3 marcos abiertos de lectura (ORF). MT: metiltransferasa. Y: dominio Y. Pro: proteasa. H: región rica en prolina. Hel: helicasa. Pol: polimerasa

transmisión entérica y otro de transmisión parenteral. El virus de la hepatitis F (VHF) sería un virus de transmisión entérica³³ cuya identificación es controversial.

Recientemente se han identificado, de nuevo por técnicas de biología molecular, el virus de la hepatitis G (VHG), también denominado virus GBV-C, relacionado con la familia Flaviviridae (Figura 6A). Este virus es de transmisión parenteral y la infección puede persistir durante varios años en el hombre. La patogenicidad asociada a este virus y en particular su hepatotropismo son todavía controversiales^{1,34}.

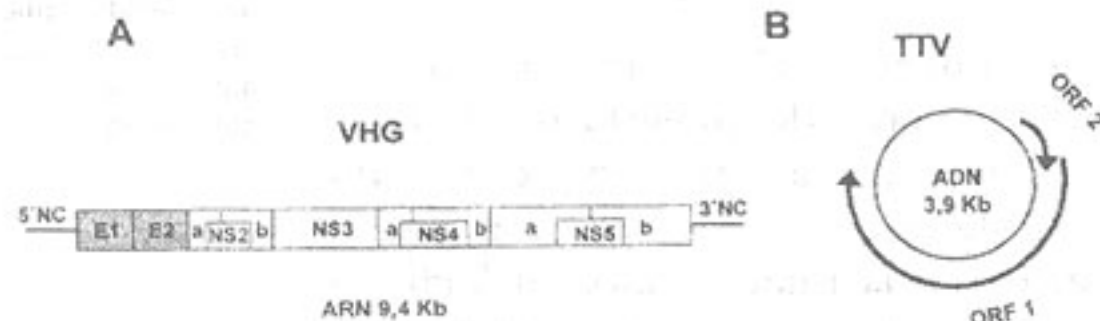


Figura N° 6

Genoma del VHG (A) y del TTV (B).

Este virus está ampliamente distribuido en el mundo¹. En Venezuela, este virus circula aún en comunidades relativamente aisladas como los Amerindios³⁵. El análisis de secuencia de diferentes aislados del VHG sugiere la existencia de al menos 4 genotipos distintos, con una distribución geográfica característica³⁶. La caracterización molecular de aislados del VHG en poblaciones amerindias ha mostrado la circulación del genotipo 3, similar al genotipo presente en el continente Asiático^{37,38}. La circulación de un genotipo asiático del VHG en poblaciones amerindias apoya la hipótesis de que este virus podría ser muy antiguo y probablemente haber sido introducido en el Continente Americano con los primeros pobladores

humanos hace unos 10.000 - 30.000 años. Aunque esta hipótesis pueda ser controversial, el largo tiempo de co-evolución del VHG con su huésped podría ser una de las razones por las cuales este virus no parece ser patógeno al hombre. En esta línea de idea, existen evidencias sorprendentes de que la coinfección por el VHG sería un factor pronóstico positivo para los pacientes infectados con el VIH³⁹.

En la búsqueda del virus responsable de las hepatitis post-transfusionales no A hasta no E, se identifica más recientemente el TTV, de nuevo por técnicas de biología molecular⁴⁰ (Figura 6B). Aunque parece estar asociado a hepatitis post-transfusionales, este virus no parece ser tampoco el responsable de las hepatitis de etiología no conocida⁴¹. Este año recientemente se describe un nuevo agente, el SEN-V: ¿será éste al fin el responsable de la hepatitis post-transfusionales no A hasta no TTV?... Las evidencias preliminares sugieren que algunos casos de infección por SEN-V podrían estar asociados con hepatitis pero podría ser un evento casual, como ocurre con otras infecciones causadas por virus no hepatropos, como el citomegalovirus o el virus de Epstein-Barr. Esto no forzosamente significa que el SEN-V sea el tan buscado nuevo virus de hepatitis⁴².

Al parecer estos virus agrupan un número considerable de especies virales que infectan tanto a humanos como a numerosos animales^{43,44}; quizá algunos de los tipos/especies tengan importancia en la generación de hepatitis.

CONCLUSIONES

En resumen, en estos últimos años ha ocurrida una cadena de descubrimiento de nuevos virus y grupos virales, mas la identificación de los agentes etiológicos desconocidos causantes de hepatitis no parece haber sido alcanzada. Hace algunos años un autor se hacía la pregunta: ¿existirán suficientes letras en el alfabeto para nombrar a los virus



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Biología de los Virus de Hepatitis

causantes de hepatitis? ⁴⁵. Actualmente es quizá pertinente hacer la pregunta: ¿tendrá nuevos miembros el grupo de los virus de hepatitis? Existen evidencias crecientes de que muchas de las hepatitis sin etiología podrían ser debidas a virus que ocasionalmente causan hepatitis o bien a infecciones ocultas ocasionadas por virus ya conocidos, como es el caso del VHB.

Es indudable la importancia que ha tenido la biología molecular en este campo, tanto a nivel de la identificación, del diagnóstico, del tratamiento y del estudio de estos virus que en su mayoría son difíciles de cultivar (46). Este grupo viral presenta una serie de curiosidades virológicas, tales como un virus ADN que posea un intermediario ARN en su replicación y por ende necesite una transcriptasa reversa (VHB), un virus satélite de un virus animal (VHD), un virus ARN con capacidad de persistir en el organismo sin integración de su genoma (VHC) y un virus sin cápside (VHG). Todas estas características hacen de este grupo viral un sistema de estudio complejo y muy interesante, de suma relevancia en la salud mundial.

REFERENCIAS

- Zuckerman A.J., Thomas H.C.: "Viral Hepatitis". 2d Ed. Churchill Livingstone, London, 1998.
- Pujol F.H., Rodríguez I., Martínez N., Borberg C., Favorov M.O., Fields H.A. y cols. "Viral hepatitis serological markers among pregnant women in Caracas, Venezuela: implication for perinatal transmission of hepatitis B and C". *GEN*, 1994; 48:25-28.
- Tanaka J.: "Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America". *Vaccine* 2000. 18(S1): S57-S60.
- Bader T.F.: "Hepatitis A vaccine". *Am. J. Gastroenterol*, 1996; 91:217-222.
- Zuckerman A.J.: "More than one third of world's population has been infected with hepatitis B virus". *Br. Med. J*, 1999; 318: 1213A.
- Torres J.R.: "Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America". *Gut*, 1996; 38:S48-S55.
- Torres J.R., Machado I.V.: "Special aspects of hepatitis B virus and delta-virus". *Infect. Dis. Clin. North. Am*, 1994; 8:13-27.
- Betancourt A., Jaimes E., Flores J., Martínez D.: "Análisis de resultados de hepatitis B y delta en Barinitas y La Barinesa, Estado Barinas". Informe al MSAS, 1987.
- Nassal M.: "Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions". *Intervirology*, 1999; 42:100-116.
- Chisari F.V., Ferrara C.: "Hepatitis B virus immunopathogenesis". *Ann. Rev. Immunol*, 1995; 13:29-60.
- Milich D.R., Jones J.E., Hughes J.L., Price J., Raney A.K., Mclahlan A.: "Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero?". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87:6599-6603.
- Koshy R., Meyer, M.: "Oncogenicity of hepatitis B virus". *Rev. Med. Virol*, 1992; 2: 131-140.
- Mizokami M., Orito E.: "Molecular evolution of hepatitis viruses". *Intervirology*, 1999; 42: 166-172.
- Brunetto M.R., Rodríguez U.A., Bonino F.: "Hepatitis B virus mutants". *Intervirology*, 1999; 42: 69-80.
- Hunt C.M., McGill J.M., Allen M.I., Condreay L.D.: "Clinical relevance of hepatitis B viral mutations". *Hepatology*, 2000; 31: 1037-1044.
- Takahashi K., Brotman B., Usuda S., Mishiro S., Prince A.M.: "Full-genome sequence analysis of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV". *Virology*, 2000; 267:58-64.
- Hadler S.C., De Monzon M., Ponzetto A., Anzola E., Rivero D., Mondolfi A., Bracho, A., y cols.: "Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in the Yucpa Indians of Venezuela". *Ann. Intern. Med*, 1984; 100: 339-344.
- Torres J.R., Mondolfi A.: "Protracted outbreak of severe delta hepatitis: experience in an isolated Amerindian population of the Upper Orinoco Basin". *Rev. Infect. Dis*, 1991; 13: 52-55.
- Taylor J.M.: "Hepatitis delta virus". *Intervirology*, 1999; 42:173-178.
- Casey J.L., Niro G.A., Engle R.E., Vega A., Gomez H., Mccarthy M., y cols.: "Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) co-infection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F". *J. Infect. Dis*, 1996; 174:920-926.

21. Pujol F.H., Quintero A., Uzcátegui N., Loureiro C.L., Villegas L., Illarramendi X., y cols.: "European and South American genotypes of hepatitis delta virus circulate among Amerindian populations in Venezuela". *Antivir. Ther.*, 2000; 5 (Supl 1), 29.
22. Choo Q.-L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L., Bradley D., Houghton M.: "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome". *Science*, 1989; 244:359-362.
23. Bartenschlager R., Lohmann V.: "Replication of hepatitis C virus". *J. Gen. Virol.*, 2000; 81: 1631-1648.
24. Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., y cols.: "Binding of hepatitis C virus to CD81". *Science*, 1998; 282:938-941.
25. Rice C.: "Is CD81 the key to hepatitis C virus entry?". *Hepatology*, 1999; 29:990-992.
26. Agnello V., Abel G., Elfahal M., Knight G., Zhang Q.: "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cell via low density lipoprotein receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96:12766-12771.
27. Glue P., Rouzier-Panis R., Raffanel C., Sabo R., Gupta S.K., Salfi M., y cols.: "A Dose-Ranging Study of Pegylated Interferon Alfa-2b and Ribavirin in Chronic Hepatitis C". *Hepatology*, 2000; 32: 647-653.
28. Leyssen P., De Clercq E., Neyts J., "Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae". *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000; 13: 67-82.
29. Reyes G.R.: "Hepatitis E virus (HEV): molecular biology and emerging epidemiology". *Prog. Liver. Dis.*, 1993; 11: 203-213.
30. Berke T., Matson D.O.: "Reclassification of the *Caliciviridae* into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis". *Arch. Virol.*, 2000; 145: 1421-1436.
31. Meng X.J., Halbur P.G., Shapiro M.S.: "Genetic and experimental evidences for cross-species infection by swine hepatitis E virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 94: 9860-9865.
32. Favorov M.O., Kosoy M.Y., Tsarev S.A., Childs J.E., MArgolis H.S.: "Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States". *J. Infect. Dis.*, 2000; 181: 449-455.
33. Deka N., Sharma M.D., Mukerjee R.: "Isolation of the novel agent from human stool samples that is associated with sporadic non-A, non-B hepatitis". *J. Virol.*, 1994; 68: 7810-7815.
34. Fogeda M., Lopez-Alcorodo J.M., Bartlome J., Arocena C., Martin M.A., Carreno V.: "Existence of distinct GB virus C/hepatitis G virus variants with different tropism". *J. Virol.*, 2000; 74: 7936-7942.
35. Pujol F.H., Khudyakov Y.E., Devesa M., Cong M.E., Loureiro C.L., Blitz L., y cols.: "Hepatitis G infection in Amerindians and other Venezuelan high-risk groups". *J. Clin. Microbiol.*, 1998; 36: 470-474.
36. Smith D.B., Basaras M., Frost S., Haydon D., Cuceanu N., Prescott L., y cols.: "Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus". *J. Gen. Virol.*, 2000; 81: 769-780.
37. Tanaka Y., Mizokami M., Orito E., Ohba K., Nakano T., Kato T., y cols.: "GB virus C/hepatitis G virus infection among Colombian native Indians". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1998; 59: 462-467.
38. Loureiro C.L., Villegas L., Illarramendi X., Guevara M., Blitz L., Liprandi F. y col.: "Molecular epidemiology of hepatitis G/GBV-C virus genotype 3 in Venezuelan Amerindians". *Antivir. Ther.*, 2000; 5 (Supl 1), G.10.
39. Heringlake S., Ockenga J., Tillmann H.L., Trautwein C., Meissner D., Stoll M., y cols.: "GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients?". *J. Infect. Dis.*, 1998; 177: 1723-1726.
40. Nishizawa T., Okamoto H., Konishi K., Yoshizawa H., Miyakawa Y., Mayumi M.: "A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post-transfusion hepatitis of unknown etiology". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 241: 92-97.
41. Cossart Y.: "TTV - a virus searching for a disease". *J. Clin. Virol.*, 2000; 17: 1-3.
42. Allain J.P.: "Emerging viruses in blood transfusion". *Vox. Sang.*, 2000; 78(S2), 243-248.
43. Khudyakov Y.E., Cong M.E., Nichols B., Reed D., Dou X.G., Viazov S.O., y cols.: "Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses". *J. Virol.*, 74, 2990-3000, 2000.
44. Primi D., Sottini A.: "Identification and characterization of SEN virus, a family of novel DNA viruses". *Antivir. Ther.*, 2000; 5: (Supl 1), G.17.
45. Bowden D.S., Moaven L.D., Locarnini, S.A.: "New hepatitis viruses: are there enough letters in the alphabet?". *Med. J. Australia*, 1996; 164: 87-89.
46. Pujol F.H., Devesa M.: "Biología molecular aplicada al campo de las hepatitis virales". *GEN*, 1997; 51: 75-84.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Biología
de los Virus
de Hepatitis

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B Y SUS IMPLICACIONES

M.Sc. Marisol Devesa - Lic. Carmen Luisa Loureiro

Laboratorio Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.) Caracas, Venezuela

RESUMEN

El virus de la hepatitis B (VHB) presenta características únicas dentro del grupo de virus que poseen un genoma tipo ADN, entre ellas encontramos la de presentar un cierto grado de variabilidad genética atípica en este tipo de virus. Esta peculiaridad, se ha manifestado en la existencia de 7 genotipos (A-G) circulando a nivel mundial, los cuales son consecuencia de las mutaciones acumuladas a lo largo de la historia del VHB y cuyo estudio ha permitido el mejor entendimiento de la evolución y biología de este virus. Por otra parte, un evento frecuente durante la infección natural por el VHB es la generación y selección de mutantes del virus, principalmente como resultado de la presión ejercida por la respuesta inmunitaria del hospedero, así como la debida a la intervención de la vacunación y más recientemente de la terapia anti-viral. Hasta la fecha se han identificado mutaciones naturales en todos los genes virales y elementos regulatorios del VHB mediante técnicas moleculares. Sin embargo, la carencia de sistemas apropiados que permitan estudiar la influencia de estas mutantes sobre el ciclo de replicación del virus, la patogénesis de la enfermedad y su interacción con el sistema inmunitario del hospedero, impide un análisis funcional apropiado de estas mutantes. Por tal razón es poco lo que se sabe acerca de las posibles implicaciones de la variabilidad genética del VHB. A pesar de ello y después de haber sido consideradas como una mera curiosidad, estudios sobre la han permitido establecer las posibles consecuencias sobre el curso de la infección (mutaciones en el gen pre-cápside y en el gen de la cápside), sobre la eficacia de la vacuna actual (mutaciones en el gen S: mutantes de escape), los sistemas de diagnóstico (mutaciones en el gen S) y la terapia anti-viral (mutaciones en el gen P). En el presente artículo haremos una revisión acerca de cómo ocurren y cuales son las mutantes más frecuentes que se generan a lo largo del genoma del VHB. Así mismo, discutiremos sus posibles implicaciones en la evolución del virus, sobre la relación de éste con su hospedero, y sus posibles consecuencias en el diagnóstico, vacunación y terapia.

PALABRAS CLAVES: MUTANTES DEL VHB, BIOLOGÍA MOLECULAR, EPIDEMIOLOGÍA, IMPLICACIONES, DIAGNÓSTICO, VACUNA, TRATAMIENTO, EVOLUCIÓN.

SUMMARY

The Hepatitis B virus (HBV) is a DNA virus with unique features, displaying a degree of genetic variation higher than other DNA viruses. Seven genotypes (A-G) circulates around the world. The study of HBV genetic variability has led to a better understanding of the virus evolution and biology. In addition, the generation and selection of HBV variants is a frequent event during the natural course of HBV infection, mainly as a result of the host immune system pressure, and vaccine and anti-viral therapy interventions. So far, natural mutations have been identified in all HBV genes and regulatory elements by molecular techniques. However, until now there is no adequate system for studying their functional influence on the viral cycle, the pathogenesis, and the immune system. This fact had hampered the evaluation of the real implications of these mutants. Lately, after been considered as a fancy curiosity, epidemiological studies have given some clues about the possible influences of HBV mutants on the natural course of HBV infection (pre-core and core mutants), the vaccine efficacy (S mutants: escape mutants), the immune diagnosis systems (S mutants) and the anti-viral therapy (Polymerase mutants). In this article we review the most frequent HBV mutants along the viral genome, and how they are generated. Additionally, we discuss the possible implications of HBV genetic variation on viral evolution and host-virus relationship, as well as their consequences on diagnosis, vaccination and therapy.

KEY WORDS: MUTANTS OF THE HBV, MOLECULAR BIOLOGY, EPIDEMIOLOGY, IMPLICATIONS, DIAGNOSIS, IT VACCINATES, TREATMENT, EVOLUTION.

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 13-28

Aceptado para su publicación junio de 2000

INTRODUCCIÓN

Treinta y cinco años después del descubrimiento del "antígeno Australia" o antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B (AgSHB)¹, la hepatitis B sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, estimándose que más de 2 billones de personas se han infectado hasta la fecha, y que existen cerca de 350 millones de portadores crónicos del AgSHB alrededor del mundo.

El Virus de la Hepatitis B (VHB) es el miembro prototipo de la familia *Hepadnaviridae*, la cual está conformada por virus envueltos que poseen un genoma de tipo ADN y que tienen un tropismo marcado por el hígado. La infección por el VHB o hepatitis B puede tomar diferentes cursos (hepatitis aguda, fulminante, crónica, silente), los cuales pueden ser serológica y molecularmente definidos, debido a la existencia de marcadores precisos de la infección. La infección aguda generalmente es auto limitante en adultos, sin embargo, entre un 5-10% de los individuos adultos infectados y hasta un 95% de los recién nacidos infectados perinatalmente, se convierten en portadores crónicos del virus. Las infecciones crónicas progresan a cirrosis en el 40% de los niños infectados al nacer y en el 5% de los individuos infectados en edad adulta. Estas cifras hacen que la hepatitis B sea la cuarta causa de muerte por enfermedades infecciosas a nivel mundial.

ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

Y GENOMA DEL VHB

El virión completo del VHB o partícula de Dane² presenta un diámetro de aproximadamente 42 nm y posee una envoltura lipoproteica externa formada por un bajo contenido de lípidos. La nucleocápside interna de 30-34 nm, está formada por 180 copias de la proteína de la cápside (también denominada antígeno de la cápside, AgcHB) que rodean el ADN genómico (Figura 1a). La nucleocápside también porta la

polimerasa viral (Pol), una proteína de shock térmico (Hsp90) y una proteína quinasa C capturada del citosol de las células infectadas³.

Protegido por la cápside viral se encuentra el genoma ADN de apenas 3,2 kb, en forma circular relajada, cuya circularidad está mantenida por puentes de hidrógeno entre los extremos cohesivos de aproximadamente 250 pb (Figura 1b). El genoma del VHB es parcialmente de doble cadena, formado por una cadena larga de polaridad negativa de 3,2 kb y una cadena corta positiva de longitud variable (20-80% la longitud de la cadena negativa), cuyo extremo 5' está covalentemente unido al extremo 5' de la cadena negativa. Los extremos terminales de ambas cadenas presentan unas secuencias de 11-12 nts directamente repetidas, conocidas como DR1 y DR2, que juegan un rol importante en dirigir la iniciación de la síntesis del ADN.

A pesar de su pequeño tamaño, el genoma de los hepadnavirus codifica para 7 proteínas estructurales a través de un extensivo solapamiento de sus genes y al uso de una estrategia de expresión que les permite la iniciación diferencial de la transcripción sin utilizar (en el caso de los hepadnavirus de mamíferos) procesamiento o "splicing" de sus ARNs (revisado en ref. 4). El genoma del VHB presenta cuatro marcos de lectura abiertos (ORF), los cuales codifican para las proteínas de la envoltura (ORF S), los antígenos de la cápside (ORF C), la ADN polimerasa (ORF P) y el producto del gen X (Figura 1b). El ORF S contiene tres codones de iniciación en el mismo marco de lectura, lo cual permite subdividirlo desde el extremo 5' al 3' en tres regiones: Pre-S1, Pre-S2 y S, a partir de las cuales se sintetizan las proteínas grandes (L), mediana (M) y pequeña o principal (S) que van a formar la envoltura del virus⁵. El ORF C contiene dos codones de iniciación lo cual le permite la síntesis de dos polipéptidos: una proteína no estructural que es secretada, el antígeno e (AgeHB)



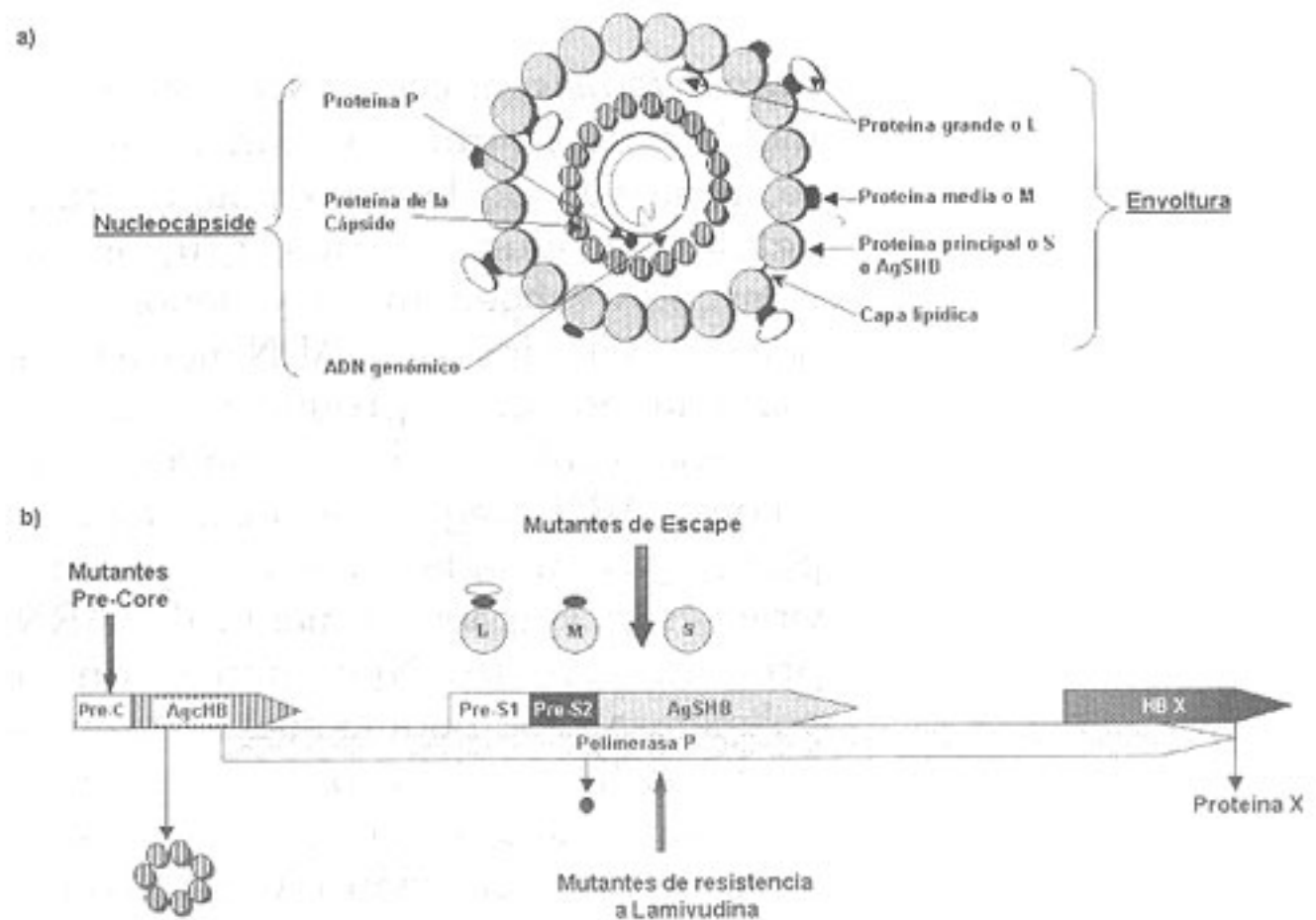
Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

de 18 kDa y el antígeno de la cápside o core (AgcHB) de 21 KDa. La síntesis del AgeHB resulta del procesamiento proteolítico de los extremos amino y carboxilo del producto del gen completo (precore/core). El AgeHB difiere de la proteína de la cápside por presentar una extensión de 10 aa's en el extremo amino y por la ausencia del extremo básico carboxilo. El ORF P cubre las tres cuartas partes del genoma solapándose con algunas partes del ORF S, el ORF C y el ORF X, y codifica para la polimerasa viral. La ADN polimerasa viral ejerce su función como un polipéptido con múltiples dominios: dominio de Proteína Terminal (PT) el cual está covalentemente unido a la hebra negativa del ADN, el dominio Transcriptasa Reversa y el dominio RnasaH⁶. La Polimerasa además de ser la enzima encargada de la transcripción reversa del ARN pregenómico, posee un rol importante en el ensamblaje de los dímeros de la cápside y es la responsable de la co-encapsidación de ambos componentes⁷, por lo cual la generación de mutaciones a lo largo de este gen puede tener graves consecuencias para la viabilidad del virus. El ORF X es el menor del genoma y fue identificado por Galibert y colaboradores en 1979⁸ y codifica para un polipéptido de 145-154 aa's (17 KDa) cuya función todavía no es muy clara.

CICLO DE INFECCIÓN VIRAL

Debido a que se carece de un sistema de infección apropiado para el VHB, poco es lo que se sabe acerca de las etapas tempranas de la infección, principalmente en lo que respecta a interacción con el receptor celular, y los pasos posteriores de penetración, decapsidación y transporte a núcleo del genoma viral. Sin embargo, la exitosa transfección de líneas celulares de hepatoblastoma humanas con dos tandas del genoma del virus clonado^{9,10} ha permitido el estudio más detallado de las etapas tardías de la infección (síntesis del cccADN, transcripción y traducción, encapsidación y morfogénesis) (Figura 2).



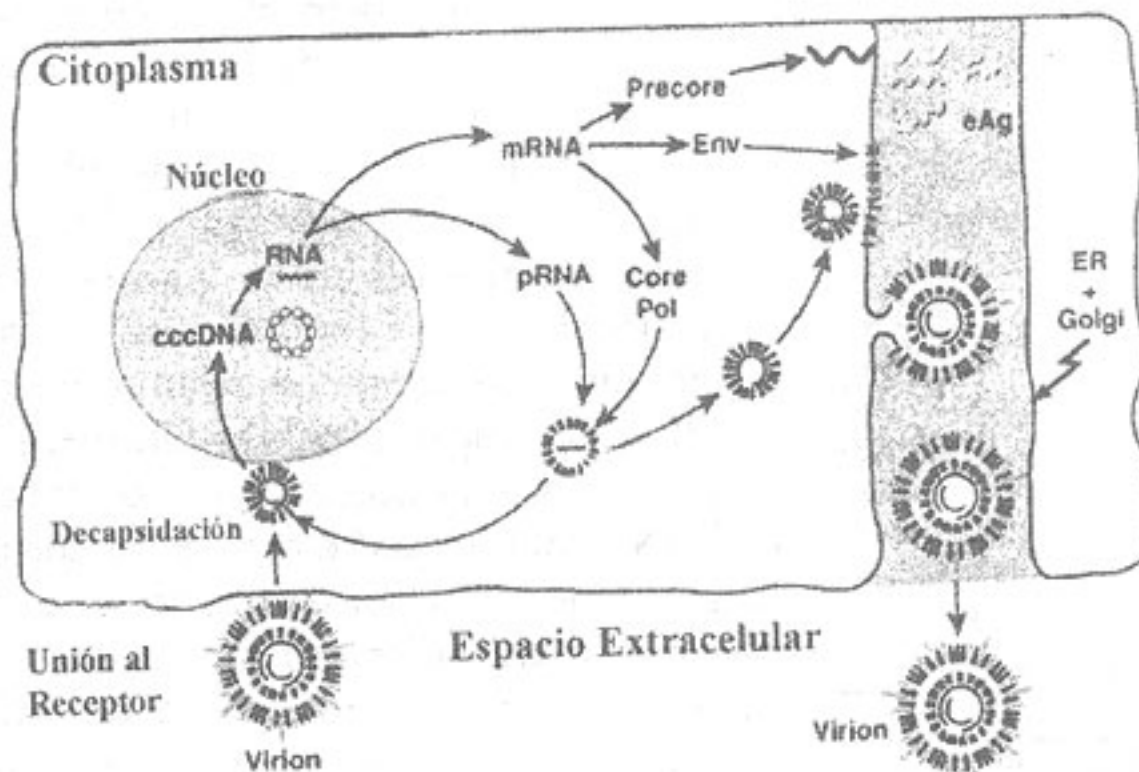
Etapas tempranas: el ciclo infeccioso de los hepadnavirus se inicia con la interacción selectiva de la proteína L de la envoltura viral con un receptor específico todavía no identificado, presente en la superficie de los hepatocitos de la especie apropiada. Posterior a la interacción con el receptor, el virus penetra al interior celular introduciendo la nucleocápside al citosol donde se cree ocurre la decapsidación, evento que permite la liberación del ADN genómico. Una vez liberado, el ADN genómico es dirigido al núcleo donde es reparada la hebra positiva incompleta del ADN genómico, para originar un ADN circular covalentemente cerrado (cccADN), intermediario de replicación que puede ser detectado en el hígado después de 6-16 horas de la infección con hepadnavirus de pato¹¹.

Figura 1.

- a) Esquema de una partícula viral infectiva del VHB;
- b) Esquema lineal del genoma del VHB donde se muestra el solapamiento de los marcos de lectura abiertos, las proteínas que codifican los diferentes genes, y los sitios donde ocurren las mutaciones más relevantes.

Figura 2.

Esquema del ciclo de vida del VHB en el hepatocito. ER: retículo endoplasmático; mRNA: ARN mensajeros; pRNA: ARN pregenómico; eAg: antígeno e del VHB.



Etapas tardías: el cccADN constituye el molde para la transcripción viral, que se inicia cuando la ARN polimerasa II celular produce varios grupos de transcritos subgenómicos y genómicos, que son utilizados como ARN mensajeros (para la posterior producción de las proteínas virales en el citoplasma celular) y como ARN pregenómico (ARNpg). El primer paso para la síntesis del genoma viral, es el empaquetamiento del ARN pregenómico (ARNpg) junto con la polimerasa viral, para lo cual el extremo 5' del ARN pg debe plegarse en una estructura tallo-asa, que se conoce como señal de encapsidación (70 nts, 1846-1916 desde el sitio EcoRI) o secuencia épsilon e (revisado en la ref. 12). El ARN pg encapsidado junto con la polimerasa viral es transcrito reversamente iniciándose la síntesis continua del ADN (-). Al finalizar la transcripción reversa, el ARNpg es degradado hasta los últimos 18 nt por la actividad de Rnasa H de la polimerasa viral, los cuales van a servir posteriormente de cebadores para la síntesis de la hebra positiva del ADN genómico. El ribonucleótido de 18 nt es translocado al DR2 cerca del extremo 5' de la hebra (-) donde se inicia la síntesis de la hebra (+) para formar el ADN circular relajado.

Por otra parte, las proteínas de la envoltura recién sintetizadas son dirigidas al RE y gran parte de ellas son exportadas en forma de partículas subvirales (esferas y filamentos) a través de la vía secretoria constitutiva de la célula, gemando hacia el lumen de un compartimiento post-RE/pre-Golgi. En un proceso más lento, parte de las proteínas L insertadas en la membrana del RE, son translocadas hacia el lumen del RE, mientras otra parte permanecen en su localización citoplasmática, presumiblemente asociadas a la chaperona hsc70. Las nucleocápsides citoplasmáticas recién sintetizadas que contienen el ADN viral pueden reingresar al núcleo (aumentando el pool de cccADN) o en presencia de suficiente cantidad de proteína L en la membrana del RE, interactuar con las proteínas de la envol-

tura. Las nucleocápsides desnudas requieren recubrirse de las proteínas de la envoltura para poder ser exportadas, por lo cual son dirigidas hacia la membrana del RE que contienen las proteínas de la envoltura, por un mecanismo desconocido. Una vez que las nucleocápsides se cubren de la envoltura, ocurre la interrupción de la entrada de dNTP al interior de la nucleocápside, lo cual podría explicar el hecho de que la síntesis de la hebra positiva de ADN se detenga antes de completarse. Después de gemar hacia el lumen del RE o de un compartimiento intermediario, los viriones son secretados a través del transporte vesicular de la célula y eventualmente liberados al torrente sanguíneo.

VARIABILIDAD DEL VHB

Y SUS IMPLICACIONES

Restricciones y factores que favorecen la generación de variabilidad del VHB

El VHB presenta ciertas peculiaridades tanto en su genoma como en su ciclo de replicación, que lo hacen especialmente susceptible a la generación de variabilidad. Entre estas características especiales destacan el hecho de poseer un paso de transcripción reversa en su ciclo de replicación, hecho que diferencia los hepadnavirus del resto de los virus cuyo genoma está compuesto por una molécula de ADN, los cuales suelen ser por definición genéticamente más estables que los virus ARN. Por tal razón la heterogeneidad de las cepas del VHB que circulan en el mundo es 10^4 veces mayor que para cualquier genoma ADN.

La menor fidelidad de la transcripción reversa favorece por tanto la emergencia de mutaciones naturales, las cuales pueden generarse por sustituciones puntuales (transición, transversión), por reordenamientos de genes (debidos a delecciones o inserciones) o por cambios en los marcos de lectura. Recientemente, han surgido ciertas evidencias sobre la posibilidad de recombinación de diferentes genomas durante el paso



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

de transcripción reversa en pacientes co-infectados con diferentes variantes del virus, tema al que se hace referencia más adelante en este artículo ¹³.

Así como existen factores que favorecen la generación de variabilidad, el genoma del VHB también ofrece restricciones. Estas restricciones están dadas fundamentalmente por el fuerte solapamiento de los marcos de lectura, por lo cual mutaciones inocuas para un gen podrían afectar fatalmente a otro gen cuya secuencia se solape al primero, lo cual implica que la mayoría de las mutantes que se generan sean defectivas y no viables ¹⁴.

Las mutaciones ocurren al azar a lo largo de todo el genoma y en todos los genes del VHB, seleccionándose naturalmente aquellas mutantes que ofrezcan alguna ventaja selectiva sobre la cepa salvaje. Es así como al comparar las secuencias de nucleótidos de diferentes aislados se observa que la región pre-S es la región más variable del genoma (74,5-91,4% de similitud de secuencia entre las diferentes variantes a nivel de pre-S1 y 78,3-93,1% a nivel de pre-S2), la región precore y core presenta una variabilidad intermedia (69,6% de similitud de secuencia) y el gen-S es el más conservado especialmente en la parte del gen que se solapa con el gen P (81,9% de nucleótidos conservados) ¹⁵.

La variabilidad genética del VHB se manifiesta tanto a nivel molecular (*Genotipos*: variabilidad acumulada a lo largo de la vida del virus y *Mutantes*: generadas durante la infección con replicación continua de un paciente) como a nivel serológico (Variabilidad Serológica), por lo cual en el presente artículo consideramos relevante hacer una breve mención de ambas.

Variabilidad serológica del AgsHB:

La existencia de heterogeneidad entre los diferentes aislados del VHB se hizo manifiesta tempranamente en la historia del virus. En los años 70 se identificó la

existencia de dos pares de variaciones alélicas: *d/y*¹⁶ y *w/r*¹⁷ en base a ensayos de inmunodifusión, lo cual permitió la definición de los cuatro principales subtipos del antígeno de superficie del VHB (AgsHB) con el "determinante común *a*" (*adw*, *adr*, *ayw*, *ayr*). Posteriormente se identificaron cuatro subdeterminantes adicionales de *w*¹⁸ y el determinante *q*¹⁹, subdividiéndose el subtipo *adr* en *q*-positivos y *q*-negativos ²⁰, lo cual originó nueve subtipos diferentes (*adw2*, *adw4*, *adr*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayrq+*, *ayrq-*). Recientemente se ha descrito un par alélico adicional: los subtipos *i* y *t* que corresponden a un cambio de isoleucina en la posición 126 por treonina ²¹.

Esta clasificación serológica de los diferentes aislados prevaleció durante algunos años, hasta que a principios de los años 80 se definió la distribución mundial de estos subtipos ²² y se obtuvo la secuencia completa de los genomas de muchos de estos aislados ^{23, 24, 8, 25}, haciéndose evidente la existencia de numerosas sustituciones a lo largo del genoma.

El análisis de las sustituciones existentes en la secuencia de aminoácidos del antígeno de superficie entre los diferentes subtipos del VHB, permitió establecer las bases moleculares de la variabilidad a nivel del AgsHB y reveló la importancia de la Lys122 para la expresión del determinante *d* y de la Lys160 para el determinante *w*²⁶, observándose que el cambio de *d* por *y* y el cambio de *w* por *r* era mediado por la sustitución de Lis por Arg en las posiciones 122 y 160 respectivamente. Análisis posteriores mostraron que las sustituciones en el residuo 127 explicaban las variaciones *w2-w4*²⁷.

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VHB

Genotipos del VHB

La emergencia de un número mayor de secuencias completas de aislados de los diferentes subtipos del VHB, ha permitido la clasificación genética de los

Geno tipo	Subtipo	Secuencia de aa 120/150	Distribución geográfica
A	adw2	PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCI	Noroeste Europeo, USA
	ayw1		Africa Central
B	adw2	PCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKPTWNCTCI	Asia, Pacífico, Indonesia, China
	ayw1	R	Vietnam
C	adw2	PCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPS DGNCTCI	Asia Oriental
	adrq+		Corea, China, Japan
	adrq-		Polinesia
	ayr		Vietnam
D	ayw2	PCRTCTTTAQGTSMYPSCCCTKPS DGNCTCI	Mundial, Area del Mediterráneo
	ayw3		India
E	ayw4	PCRTCTTLAQGTSMFPSCCCSKPS DGNCTCI	Africa Occidental
F	adw4q	PCKTCTTLAQGTSMFPSCCCSKPS DGNCTCI	Sur y Centro América
	ayw4*		Polinesia
	adw2*		
G**	adw2	ND	ND

Tabla N° 1
Correspondencia entre genotipos y subtipos del VHB y su distribución geográfica. (Tomado de 33,34*,32; ND: no determinado).

diferentes aislados del VHB definiéndose cuatro genotipos (A-D), basados en una divergencia del 8% o más entre las secuencias del genoma completo²⁵ y de 4% entre secuencias del gen S²⁸. La comparación de las secuencias del gen S de los diferentes subtipos, permitió por un lado, verificar que el patrón de clasificación en genotipos obtenido correspondía a la clasificación propuesta por Okamoto (1988)²⁵ y por otro lado permitió definir dos nuevos genotipos: E y F, correspondientes a los subtipos ayw4 y adw4 respectivamente^{29,30}, totalizando 6 los genotipos del VHB (Tabla 1). Recientemente se identificó un nuevo genotipo viral (Genotipo G) perteneciente al grupo serológico adw2³¹.

El genotipaje del VHB ha permitido un mejor entendimiento de la relación existente entre las diferentes cepas del virus, por lo que hoy en día la asignación de genotipos ha ganado mayor aceptación que la determinación de subtipos. El análisis de la distribución geográfica de los diferentes genotipos ha permitido observar que el genotipo D es el más disseminado a nivel mundial, ya que ha sido encontrado en muestras de pobladores aborígenes de Asia, en Indonesia, Papua y Alaska, predomi-

nando en el área del Mediterráneo y la India. Los genotipos B y C están confinados a poblaciones del Asia Sur-Oriental y lejano Oriente y el genotipo E a poblaciones de la parte sub-Sahara del Africa. Los genotipos A y D están distribuidos principalmente en el viejo mundo, mientras que el genotipo F es encontrado en poblaciones aborígenes de América del Sur (revisado por 32, 33) (Tabla 1), sugiriéndose que podría representar el genotipo autóctono del nuevo mundo, ya que es el más divergente de los VHB humanos^{30,29}.

La importancia clínica y biológica de la existencia de diferentes genotipos y de la generación de mutantes del VHB es todavía poco entendida, sin embargo existen algunos ejemplos que podrían reflejar diferencias biológicas y variaciones en el potencial replicativo de las diferentes cepas. Entre los ejemplos que comparan virus de diferentes genotipos tenemos la baja transmisibilidad vertical de madres portadoras sanas del virus a sus bebés en el Noroeste Europeo, donde circula principalmente el genotipo A^{34,35} y la frecuente transmisión vertical de la infección en Asia del Este donde predominan los genotipos B y C³⁶ en comparación con Africa, donde la transmisión horizontal temprana parece ser más importante³⁷. Adicionalmente, existen variaciones considerables en las tasas de portadores del VHB en diferentes partes del mundo, lo cual en cierta medida se correlaciona con la distribución mundial de genotipos. Es así como los genotipos B y C predominan en áreas de alta prevalencia de portadores del VHB de Asia Oriental, mientras los genotipos A y D son las cepas del VHB dominantes en Africa y el área del Mediterráneo en donde las mujeres jóvenes en edad reproductiva portadoras del VHB es menos probable que sean AgeHB (+) debido a la temprana seroconversión a anti-AgeHB.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

Otro aspecto interesante sobre las implicaciones de la circulación de los diferentes genotipos del VHB, es su posible efecto sobre la eficiencia de la vacuna. Recordemos por ejemplo que los genotipos E y F muestran la mayor divergencia de la secuencia de aa's en el determinante a (presente en la vacuna recombinante actual que se corresponde con los genotipos A y B) se desconoce si estas sustituciones podrían proveer pobre protección en los individuos vacunados expuestos a la infección por cepas E y F. Es interesante recordar que en Senegal donde circula el genotipo E, se han reportado fallas frecuentes en la obtención de protección con la vacuna³⁸, en los cuales la sustitución de Thr por Ser en el residuo 140 del asa del determinante "a" podría tener alguna implicación.

Mutantes del VHB

Además de la variabilidad genética del VHB acumulada a lo largo de su historia, que ha permitido la generación de genotipos del VHB, la infección de un paciente por el VHB en continua replicación origina la producción de mutantes, principalmente como resultado de la presión ejercida por la respuesta inmunitaria del hospedero, así como la debida a la intervención de la vacunación y más recientemente de la terapia anti-viral (revisado en ref. 15).

El estudio de estas mutantes ha generado mucha controversia en el medio científico, llegando inclusive a ser consideradas como una mera curiosidad³⁹. Las primeras mutantes del VHB fueron descritas hace más de 10 años por un grupo de investigadores ingleses y las denominaron mutantes pre-core⁴⁰. Posterior a esto se han reportado gran número de mutaciones a todo lo largo del genoma (Tabla 2), sin embargo las más frecuentes e interesantes son: las mutantes pre-core, las mutantes de escape y las mutantes de resistencia a drogas anti-virales. Adicionalmente se han reportado mutaciones (sustituciones, deleciones e inserciones) en el ORF X

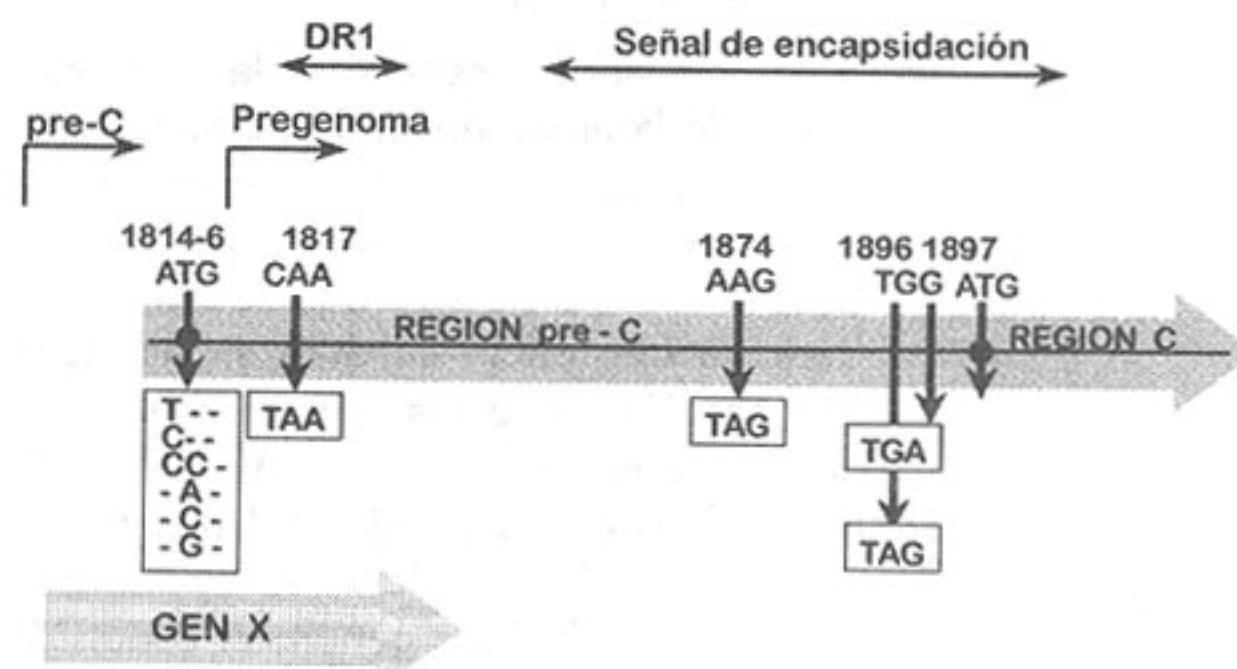
que involucran el locus Cp/ENI, las cuales podrían alterar significativamente la replicación viral, sin embargo en el presente artículo no nos referiremos a ellas.

Mutantes pre-core:

Las mutantes pre-core son ocasionadas por la aparición de una mutación puntual de G a A en el nucleótido 1986 del gen pre-core/core, generando un cambio del codón 28 (TGG, Trp) a un codón de terminación o codón "stop" (TAG) (Figura 3). Este cambio previene la expresión del antígeno de excreción "e" (AgeHB), sin afectar la producción del antígeno de la cápside (AgcHB)⁴⁰. De esta manera, los pacientes que están infectados con estas mutantes, presentan altos niveles de ADN viral a pesar de la presencia de anticuerpos anti-AgeHB en el suero.

La región pre-core/core contiene dominios de gran importancia para la replicación del VHB: la secuencia DR1 necesaria para la transcripción reversa, la señal de encapsidación en el extremo 5', y el sitio de inicio del ARN pre-genómico. Si bien la traducción del gen pre-core no es requerida para la propagación del virus y no forma parte del virión, el AgeHB parece tener un rol en la progresión a la cronicidad de la infección (persistencia viral), modulando la respuesta inmunitaria. Esto es debido a que comparte epitopes T con el AgcHB y a que es expuesto en la superficie de los hepatocitos infectados siendo blanco de la respuesta de linfocitos T citotóxicos.

Figura 3. Representación gráfica de las mutaciones Pre-Core que previenen la síntesis del AgeHB por modificación de los codones de iniciación o por generación de codones "stop". ATG: codón de iniciación; las flechas indican la posición nucleotídica donde ocurre la mutación.



El establecimiento de la importancia biológica y/o clínica de las mutantes pre-core es controversial, sin embargo en los años recientes ha surgido nueva evidencia que podría esclarecer sus posibles implicaciones. En este sentido recordemos que el AgeHB es un marcador establecido de replicación e infectividad, y la seroconversión a anti-eHB está en general asociada a la desaparición del ADN viral y remisión de la enfermedad hepática⁴¹. En el caso de las mutantes pre-core se observa que se mantiene la positividad del ADN viral a pesar de la seroconversión a anti-eHB, lo cual ha sido asociado a enfermedad hepática más severa y a hepatitis fulminante, sin embargo, se ha reportado que si una cepa tipo salvaje está presente después de la seroconversión a anti-eHB es más probable que la infección sea más suave^{42, 15}.

La descripción de un epítipo de células T citotóxicas (posición 11-27 de la proteína de la cápside), el cual presenta variaciones importantes en las mutantes pre-core favorece la hipótesis de que la selección de las mutantes pre-core que no expresan el AgeHB, podría ser un mecanismo de persistencia viral, debido a la pérdida de la modulación de la respuesta de células T contra los péptidos relacionados AgcHB/AgeHB. Adicionalmente, se ha propuesto que el antígeno e podría atravesar la placenta de madres portadoras del virus, e inducir tolerancia en las células T cooperadoras en el feto, de manera que cuando el bebé se infecte en el momento del nacimiento, los antígenos e y de la cápside no serán reconocidos como extraños, generando persistencia viral⁴².

Por otro lado, el estudio de la epidemiología de la emergencia de mutantes pre-core permitió observar diferencias en la distribución geográfica de estas variantes, al mismo tiempo que se ha reportado la existencia de diferencias en la generación de estas mutaciones entre los diferentes genotipos del VHB^{43, 44, 45}, lo cual parece depender del residuo en la posición 1858 la cual se opone a la posición 1896 (que genera el codón de

terminación) en el tallo de la señal de encapsidación del pregenoma. La secuencia de encapsidación ϵ está bastante conservada entre los diferentes genotipos, sin embargo el nt 1858 puede ser T o C (C en esa posición previene la formación del codón de terminación) dependiendo del genotipo. El nucleótido C1858 se encuentra principalmente en los genotipos A y se ha observado en 3 genotipos F^{29, 45} siendo poco frecuente en los genotipos C y D, mientras que T-1858 se encuentra siempre en los aislados genotipo B y E. Recientemente el análisis de un mayor número de secuencias permitió observar una T1858 en 17 aislados genotipo F provenientes de pacientes anti-AgeHB (+), 11 de los cuales también presentaban la mutación A1896 que previene la expresión del AgeHB, y en 5 aislados genotipo F de pacientes AgeHB (+), por lo cual sugieren que la T1858 parece ser la sustitución tipo salvaje del genotipo F de América Central⁴⁶. El hecho de que las mutaciones pre-core estén menos asociadas al genotipo A, ha sido interpretado como el resultado de un efecto desfavorecedor de la C1858 sobre la estructura de la señal de encapsidación ϵ , ya que se generaría una señal de encapsidación muy pobre, desestabilizándola⁴³. Además de la mutación A1896, se han reportado otras mutaciones en la región pre-core que previenen la expresión de AgeHB, sin embargo no son tan comunes (Tabla 2).

Mutantes de escape a la vacuna:

Se han descrito mutaciones asociadas al determinante neutralizante "a" del antígeno de superficie (AgSbHB) (Tabla 2). En todos los subtipos conocidos, el determinante "a" está localizado entre los residuos 120-147, y se predice que posee una estructura de doble asa proyectándose en la superficie de la partícula del VHB, la cual es estabilizada por puentes disulfuro en donde existen epítipes dependientes de conformación. El dominio "a" está predominantemente localizado en la segunda asa entre los



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

residuos 139 y 147, la cual está bastante conservada o presenta sustituciones restringidas a aminoácidos similares. Los residuos 141-145 (KPTDG) son críticos para la unión de anticuerpos protectores evocados por la vacuna. Debido a que anticuerpos anti-"a" son capaces de proteger a los individuos de infecciones contra cualquiera de los subtipos del virus, mutaciones en este determinante originan la aparición de las denominadas mutantes de escape a la vacuna ⁴⁷.

Mutaciones en esta asa han sido reportadas en un niño vacunado en Italia ⁴⁸, y en 7 niños de Singapore ⁴⁹, del cual se aisló una variante del VHB que presentaban una mutación en el residuo 145 de Gly a Arg. Adicionalmente se ha observado la aparición de una mutación en el residuo 141 de Lys a Glu en el Oeste Africano originada por un cambio de A por G en el nt 421 ⁵⁰ (Tabla 2). Estas últimas mutantes de escape se han visto sólo en el subtipo *ayw4* en Gambia, que corresponde en esa región al genotipo E que posee una Ser140 en vez de una Thr, lo cual podría estar predisponiendo la aparición de la mutante 141. Interesantemente esta situación también se ve en los genotipos F, en los cuales no se ha investigado la aparición de mutantes 141. Adicionalmente se han reportado mutantes en la posición 126 en una familia Japonesa que parecen influir la unión de anticuerpos monoclonales y una alanina en el aa 144 en un paciente de Singapore (Revisado en ref. 51).

En general estas variantes presentan un interés epidemiológico y podrían representar dificultades para el diagnóstico con ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales, y posiblemente para el diseño futuro de vacunas, sin embargo no representan un problema relevante inmediato para los programas de vacunación ⁵¹. Ejemplo de ello es que ni anti-

Tipo de Mutación	Tipo de Sustitución	Posición aa	Efecto
Transición	T - C	1815	Falla en la iniciación Pre-C
Transversión	G - T	1815	Falla en la iniciación Pre-C
Transición	G - A	1816	Falla en la iniciación Pre-C
Transición	C - T	1817	Eliminación de la síntesis Pre-C
Transición	T - C	1836	Mutación en el codón Stop
Transición	A - G	1838	Mutación en el codón Stop
Inserción	36 nt	1895 - 1896	Codon Stop pre-C en 3'
Transición	T - C	512	Resistencia a Lamivudina y famciclovir
Transición	G - C	519	Resistencia a famciclovir
Transición	C - T	523	Resistencia a famciclovir
Transversión	C - A	526	Resistencia a Lamivudina y famciclovir
Transición	A - G	550	Resistencia a Lamivudina (motivo YMDD)
Transversión	G - T	550	Resistencia a Lamivudina (motivo YMDD)
Transición	G - A	122	Conversion del determinante d a y
Transición	G - A	145	Mutante de escape a la vacunación
Transición	A - G	160	Conversion del determinante w a r

cuerpos monoclonales contra el asa 1 o el asa 2, ni sueros de vacunados o de pacientes convalecientes reconocieron una proteína recombinante producida en levadura que presentaba una arginina en el residuo 145. Sin embargo, es importante señalar que si estas mutantes que no son neutralizadas por la inmunidad inducida por la vacuna, comienzan a diseminarse podría afectar la campaña de vacunación contra la hepatitis B actualmente en curso.

Hasta los momentos no se han realizado estudios que evalúen la incidencia y prevalencia de estas mutantes a nivel mundial, para lo cual tendría que utilizarse ensayos que hagan uso de anticuerpos policlonales, sin embargo, es interesante recordar que en estudios realizados en Gambia alrededor de 10% de los vacunados seroconvirtieron a anti-HBc, lo cual sugiere que esos individuos se infectaron a pesar de estar vacunados (revisado en ref. 51). Sin embargo, un dato esperanzador es el hecho de que actualmente existen vacunas comerciales que incorporan las

Tabla N° 2

Mutaciones más frecuentes encontradas en el gen precore/core, polimerasa y superficie.

regiones pre-S1 y pre-S2, las cuales contienen epitopes neutralizantes y son altamente antigénicas, habiéndose observado que en ratones no respondedores a las vacunas de primera generación, estimulan la producción de anticuerpos anti-HBs.

**Mutantes de resistencia
a análogos de nucleósidos:
Mutación YMDD**

El desarrollo de nuevas estrategias antivirales permanece siendo de importancia primordial en el tratamiento de la hepatitis B crónica. La polimerasa del VHB, posee múltiples funciones entre las que incluye la transcripción reversa, esencial para la replicación del virus, lo que representa un blanco ideal para la terapia antiviral. Recientemente, se están empleando análogos de nucleósidos tales como lamivudina y famciclovir, en el tratamiento de la hepatitis B crónica, estos nuevos agentes inhiben la replicación del VHB, por acción directa en la ADN polimerasa dependiente de ARN, mostrando resultados promisorios en términos de efectos antivirales y tolerancia^{52,53}. Sin embargo, la monoterapia o uso de una sola droga por cortos periodos de tiempo no es suficiente para eliminar la infección viral, mientras que el tratamiento por largos periodos se ha asociado con la aparición de mutantes resistentes a la droga (Tabla 2).

El dominio catalítico de la transcriptasa reversa (TR) en la polimerasa del VHB (Fig. 4) comparte los residuos del motivo YMDD (Tyr-Met-Asp-Asp) con otras transcriptasas reversas descritas. La reactivación de la infección por el VHB, posterior al tratamiento con los análogos de nucleósidos, se encuentra asociado con el incremento de mutaciones en la proteína P, sin embargo, la consecuencia funcional de estas mutaciones genómicas no es clara.

La resistencia al tratamiento con lamivudina, se ha asociado con cambios en el motivo YMDD del dominio C⁵⁴, donde se localiza el sitio catalítico de la enzima TR (Fig. 4). Estas mutaciones se mani-

fiestan por la resistencia a lamivudina producto de la sustitución de una metionina (aa 550) por una isoleucina o valina^{55,56}. Posteriormente, análisis genéticos mostraron que las mutaciones asociadas a la resistencia por lamivudina, son mucho más complejas, pudiéndose clasificar en dos grupos, *Grupo 1*: mutaciones únicamente en el dominio C (M539I) y *Grupo 2*: mutaciones en el dominio C y B (M539V + L515M). La figura 4 muestra las principales mutaciones encontradas en asociación al tratamiento con lamivudina y famciclovir. A diferencia de lo que sucede con lamivudina, las mutaciones asociadas al tratamiento con famciclovir, no afectan al motivo YMDD de la polimerasa (dominio C), pero sí generan la aparición de mutaciones en el dominio B de la proteína (L526M, V519L).

Un estudio reciente indica, que la incapacidad de eliminar el VHB del suero durante la terapia con lamivudina, puede indicar que en algunos pacientes la selección de la mutante resistente al tratamiento, puede generarse tan rápidamente que impide observar la eliminación temporal del ADN viral en el suero.

Estudios realizados utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* muestran, que la infección crónica se mantiene por la presencia en el núcleo del hepatocito de 30 a 40 copias del cccADN, que sirve como molde para la transcripción viral⁵⁷. La síntesis del nuevo cccADN puede ser bloqueada por un inhibidor de la transcripción reversa. Sin embargo, una terapia por corto tiempo no es capaz de eliminar el "pool" intracelular del cccADN, por lo que representa una fuente de producción de nuevos virus posterior al cese del tratamiento⁵⁸, a diferencia de un tratamiento por un largo período, donde es posible eliminar el cccADN almacenado en el hígado, siempre y cuando sea suficiente como para garantizar que los hepatocitos infectados, sean eliminados por muerte natural o por la respuesta inmunitaria. Esto sugiere, que el éxito o fracaso en



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

la eliminación de la infección depende de la erradicación del cccADN intracelular, del surgimiento de mutaciones y del número de hepatocitos infectados.

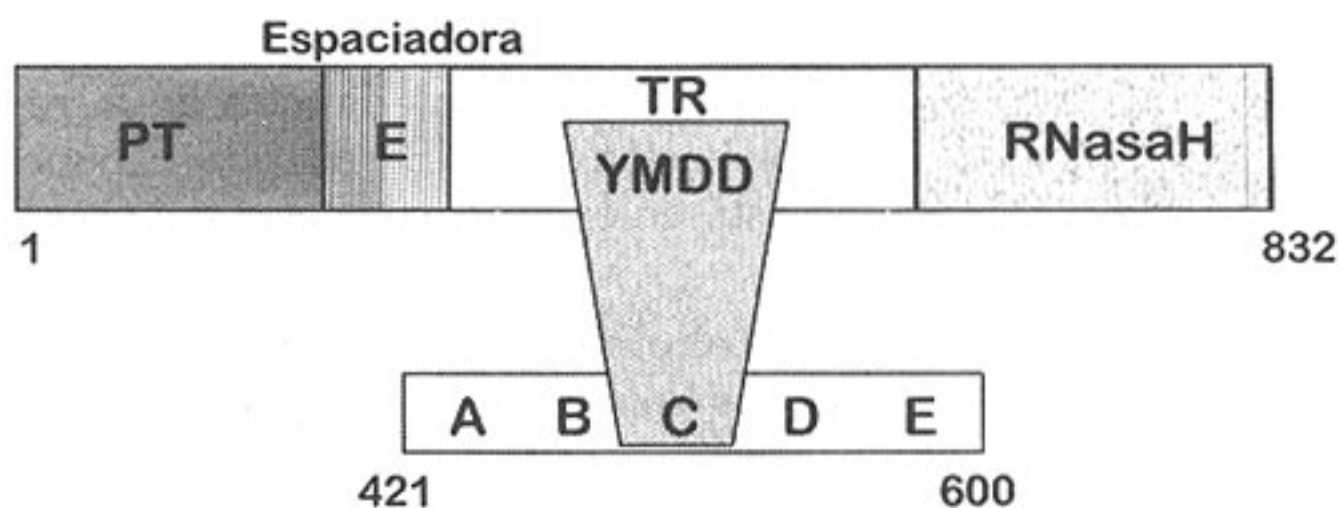
La identificación de otros blancos virales pueden ser de gran utilidad en el desarrollo de estrategias que inhiban la replicación del virus, como por ejemplo el bloqueo de la interacción del virus con el receptor y del transporte del genoma viral al núcleo⁵⁹ o de la encapsidación del pregenoma^{60, 61}.

Una de las propuestas en la utilización de antivirales, es la implementación de una terapia combinada con análogos de nucleósidos, que actúen inhibiendo de manera distinta a la polimerasa viral, a fin de obtener un efecto antiviral sinérgico, previniendo o retardando la aparición de mutantes resistentes.

Recombinación entre los aislados del VHB

Como ya hemos mencionado, la variación en la secuencia del VHB, se producen tanto por mutaciones puntuales como por recombinación de los fragmentos de ADN⁶². De estos mecanismos, la probabilidad de recombinación de las diferentes cepas del VHB dentro de un hospedador, que permite la producción de virus mosaico, parece ser baja. Recordemos que una condición necesaria para que ocurra un evento de recombinación, es la superinfección con diferentes variantes del VHB, hecho que se considera raro y restringido a individuos de alto riesgo.

Durante el ciclo de infección del VHB (Figura 2) existen ciertas etapas susceptibles a la recombinación. La más importante es la etapa de replicación del VHB, sin embargo, no es el único estado donde el VHB tiene la oportunidad de recombinar¹³. La iniciación de la infección y la replicación de los hepadnavirus involucran la conversión de un ADN genómico circular relajado, a un cccADN dentro del núcleo de la célula infectada, por un proceso poco conocido, en el cual se cree que intervienen enzimas



Famciclovir		Lamivudina	
R448Q		I338S	M539I
V508L	Dominio B	F501L	M539V
L515M		V508L	V542I
L515V		L515M	L564V
P512L		V515M	S588T
T519S		T519S	
I522L		A535V	
V524I			

celulares, que podrían ser las responsables de los cambios sufridos en el ADN episomal, que lo hacen un mejor sustrato para la integración⁶³. Por otra parte, se piensa que la integración del virus no sirve como molde para la replicación viral y no se tienen evidencias de la integración del genoma completo⁶⁴.

Existen varios reportes que describen eventos de recombinación entre diferentes cepas del VHB. Ejemplo de ello es el trabajo de Bollyky y colaboradores en 1996⁶⁵, quienes muestran una incongruencia en la asignación de genotipos para diferentes marcos de lectura abiertos en dos aislados provenientes de regiones geográficas donde co-circulan distintos genotipos, incongruencia que se atribuyó a un evento de recombinación. Estos hallazgos son muy significativos, porque describen una fuente de variabilidad genética del VHB que no era reconocida, además de facilitar una evidencia que pueda explicar el significado del cambio en la asociación entre un subtipo antigénico y un genotipo. El mecanismo preciso, por el cual la recombinación toma lugar, así como su frecuencia e implicación potencial, permanece sin respuesta.

Figura 4. Organización estructural del gen de la polimerasa del VHB señalándose las mutaciones asociadas a la resistencia a drogas anti-virales. PT: proteína terminal; E: espaciadora; TR: transcriptasa reversa.

Estudios futuros son necesarios para encontrar evidencias directas de la recombinación del VHB y dilucidar el papel de esta en la heterogeneidad del virus.

Influencia de la variabilidad en la evolución de los hepadnavirus

La evolución viral generalmente es analizada en base a la premisa de que el número sustituciones nucleotídicas o de aminoácidos, producidas durante un tiempo determinado son indicadores de la evolución viral. En este sentido, se ha calculado que la tasa de mutación de los genes celulares y virus ADN es aproximadamente de 10^{-9} sustituciones por sitio por año, mientras que la tasa de mutación de los virus ARN excede ese valor en un factor de alrededor de 10^6 , favorecido en parte por el hecho de que la polimerasa de estos virus carece de funciones correctoras o de edición ($10^{-2} - 10^{-3}$).

Un factor esencial utilizado para calcular la divergencia evolutiva de los hepadnavirus y retrovirus es la estimación de la tasa de mutación del genoma viral, la cual se define como el número de sustituciones de bases que ha ocurrido en el genoma por sitio por año de continua replicación de un virus en su hospedero. Estudios realizados en el modelo animal de hepadnavirus de marmotas (WHV) indican una tasa de mutación aproximadamente de 2.3×10^{-4} sustituciones por sitio por año, la cual es equivalente a la tasa de mutación del gen menos variable (cápside) de retrovirus ⁶⁶.

En los últimos años el uso de herramientas moleculares para el análisis de secuencias ha permitido a los evolucionistas especular acerca del origen y evolución de los hepadnavirus. Es así como, árboles filogenéticos basados en las secuencias de genomas completos revelaron que la primera división de linajes del VHB podría haberse originado entre los genomas F (genotipo autóctono del Nuevo Mundo) y los otros genomas, ocurriendo posteriormente una división entre las cepas B y C por un lado y

entre las cepas A, D y E por el otro. Si consideramos que se estima que el paso de los primeros pobladores del Nuevo Mundo a través del estrecho de Bering ocurrió hace 150.000 años, es posible que durante ese tiempo hayan emergido nuevos genotipos del VHB por divisiones de la cepa progenitora del actual genotipo F. Otro aspecto interesante, se refiere a que el origen de los genomas B y C parece estar en Asia, mientras que el genotipo D puede haber reemplazado al genotipo A en el área del Mediterráneo incluyendo el Norte de África ²⁹.

Recientemente, la identificación de un hepadnavirus en monos lanudos del nuevo mundo (Woolly Monkey Hepatitis B Virus, WMHBV) permitió observar su cercanía filogenética con un aislado de Colombia genotipo F ^{67,18}, por lo cual se ha sugerido que el WMHBV podría representar el progenitor de los hepadnavirus humanos y es compatible con la teoría de que el VHB es originario de América.

Finalmente recordemos que si bien estas teorías suenan tentadoras e interesantes, falta mucho por estudiar y sería de gran utilidad el análisis de un mayor número de secuencias completas de aislados del genotipo F, así como el aislamiento de hepadnavirus que infecten naturalmente a otros primates americanos, a fin de indagar acerca del origen de estos apasionantes virus.

CONCLUSIONES

- Los hepadnavirus son virus con características únicas en muchos aspectos, entre ellas está su capacidad de ser susceptibles a variabilidad genética a pesar de poseer un genoma extremadamente solapado.
- Las mutaciones que se acumulan a lo largo del genoma del VHB, podrían afectar el curso natural de la infección, la eliminación del virus y la respuesta a la terapia anti-viral, sin embargo la influencia exacta de una mutación específica en el diagnóstico, terapia



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

y prevención de la infección queda por establecerse.

- Mutaciones en el gen codificante para el AgsHB podrían generar una infección persistente aún en presencia de anticuerpos contra el AgsHB (mutantes de escape a la vacunación), sin embargo el uso masivo de vacunas que incluyan proteínas correspondientes a los dominios pre-S1 y pre-S2 representan una alternativa esperanzadora para el futuro de la vacuna.
- Las mutaciones en el gen S que originen cambios en la estructura antigénica del virus, podrían hacer fallar los sistemas de inmunodiagnóstico utilizados en la actualidad, por lo cual es importante la evaluación sistemática de los sistemas de diagnóstico comercial empleados hoy en día, principalmente en los bancos de sangre.
- La producción de drogas eficientes para el tratamiento de los más de 350 millones de personas infectadas crónicamente con el VHB alrededor del mundo, representa un reto inmediato para los científicos, quienes deben enfrentarse a las habilidosas estrategias de este virus para evadir los intentos de clarificación viral, entre ellas la generación de mutantes resistentes a los análogos de nucleósidos.
- La recombinación podría ser un mecanismo novedoso utilizado por el VHB para la generación de diversidad, en cuyo caso debe tomarse en cuenta a la hora de plantearse las posibles respuestas a los muchos enigmas que quedan por resolver, incluyendo las diferencias geográficas en la patología, mecanismos de evolución del VHB, así como, la variedad de las respuestas de los hospederos.
- En el futuro, estudios sistemáticos de epidemiología molecular permitirán establecer si existen diferencias geográficas en su distribución, así mismo nuevas asociaciones entre la generación de variantes del VHB con diferentes cursos de la enfermedad podría esclarecer nuevos mecanismos

de persistencia viral y proveer información útil para desarrollar nuevas estrategias para la erradicación del virus.

- Finalmente recordemos que la interacción y relación que establece un virus con su hospedero es un fenómeno complejo, donde el curso que tome esta interacción dependerá no sólo de los factores virales, sino también de factores que dependen del número de células infectadas, de la competencia del sistema inmunitario del paciente y de la magnitud de la respuesta inflamatoria generada por el individuo.

REFERENCIAS

1. Blumberg B.S., Alter H.J., Visnich, S.: "A new antigen in leukemia sera". *Jama*, 1965; 191: 541.
2. Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M.: "Virus like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis". *Lancet*, 1970; i, 695.
3. Nassal M., Schaller H.: "Hepatitis B virus replication". *Trends Microbiol.* 1993; 1, 221-228.
4. Shaller H., Fischer M.: "Transcriptional control of hepadnavirus gene expression"; in Mason WS, Seeger C (eds): *Current topics in Microbiology and Immunology. Hepadnaviruses. Molecular Biology and Pathogenesis*. Berlin, Springer, 1991; 41-60.
5. Raney A.K., McLachlan A.: "The biology of hepatitis B virus". In: McLachlan A, ed. *Molecular biology of hepatitis B viruses*. Boca Raton: CRC Press, 1992.
6. Radziwill G., Tucker W., Schaller H.: "Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: Domain structure and RNaseH activity". *J. Virol.* 1990; 64, 613-620.
7. Nassal M.: "Hepatitis B virus morphogenesis". *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 1996; 214, 297-337.
8. Galibert F., Mandart E., Fitoussi F., Tiollais P., Charnay P.: "Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*". *Nature*, 1979; 281 (5733), 646-650.
9. Acs G., Sells M.A., Purcell R.H., Price P., Engle R., y cols.: "Hepatitis B virus produced by transfected HepG2 cells causes hepatitis in chimpanzees". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987; 84, 4641-4644.
10. Sells M.A., Chen M.L., Acs G. "Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus

- DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987; 84, 1005-1009.
11. Mason W.S., Halpern M.S., England J.M., Seal G., Egan J., Coates L., y cols.: "Experimental transmission of duck hepatitis B virus". *Virology*, 1983;131, 375-384.
 12. Kramvis A., Kew M.C.: "Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae". *J. Viral Hepatitis*, 1998; 5: 357-367.
 13. Bowyer S.M., Sim J.G.: "Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates". *J Gen Virol*, 2000; 81 (2): 379-392.
 14. Yang W.G., Summers J.: "Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through non-homologous recombination". *J. Virol.*, 1995; 69,4029-4036.
 15. Gunther S., Fischer L., Pult I., Sterneck M., Will H.: "Naturally occurring variants of hepatitis B virus". *Advances in Virus Research*, 1999; 52, 25-137.
 16. Le Bouvier G.L.: "The heterogeneity of Australia antigen" *J. Infect. Dis.*, 1971; 123, 671-675.
 17. Bancroft W.H., Mundon F.K., Russell P.K.: "Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen". *J. Immunol.*, 1972; 109: 842-848.
 18. Siddiqui A., Sattler F., Robinson W.: "Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw2". *Procd. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; 76(9): 4664-4668.
 19. Magnius L.O., Espmark J.A.: "Specificities in Australian antigen positive sera distinct from the LeBowvier determinants". *J. Immunol.* 1972; 109, 1017-1021.
 20. Couroucé-Pauty A.M., Lemaire J.M., Roux J.F.: "New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category". *Vox. Sang.* 1978; 35:304-308.
 21. Ohnuma H., Machida A., Okamoto H., Tsuda F., Sakamoto M., Tanaka T. y cols. "Allelic subtypic determinants of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y o w/r". *J. Virol.* 1993; 67: 927-932.
 22. Couroucé-Pauty A.M., Plancon A., Soulier J.P.: "Distribution of HBsAg subtypes in the world". *Vox Sang.* 1983; 44: 197-211.
 23. Valenzuela P., Quiroga M., Zaldivar J., Gray P., Rutter W.J.: "The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes". En *Animal Virus Genetics*, Fields, B.N., Jaenisch, R. y Fox, C.F., (eds) Academic, New York, 1980; 55-77.
 24. Ono Y., Onda H., Sasada R., Igarashi K., Sugino Y., Nishioka K.: "The complete nucleotide sequences of the clones Hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw". *Nucleic. Acids. Res.*, 11, 1747-1757, 1983.
 25. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R., Imai M., Miyakawa, Y. y cols.: "Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes". *J. Gen. Virol.* 1988; 69: 2575-2583.
 26. Okamoto H., Imai H., Miyakawa Y., Mayumi M.: "Site-directed mutagenesis of hepatitis B surface antigen sequence at codon 160 from arginine to lisyne for conversion of subtypic determinant from r to w". *Byochem. Biophys Res Commun*, 1987; 148: 500-504.
 27. Norder H., Hammas B., Lee S.-D., Bile K., Couroucé A.M., Mushahwar I.K. y cols. "Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen". *J. Gen. Virol.*, 1993; 74, 1341-1348.
 28. Norder H., Couroucé A.M., Magnius L.O.: "Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes". *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 3141-3145.
 29. Norder H., Couroucé A.M., Magnius L.O.: "Complete genomes, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes". *Virology*, 1994; 198: 489-503.
 30. Naumann H., Schaefer S., Yoshida C., Gaspar A.M., Repp R., Gerlich W.H.: "Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4". *J. Gen. Virol.*, 1993; 74: 1627-1632.
 31. Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi F., Rossau R. "A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness". *Journal of General Virology*, 2000; 81:67-74.
 32. Magnius L.O., Norder H.: "Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene". *Intervirology*, 1995; 38: 24-34.
 33. Blitz L., Pujol F.H., Swenson P.D., Porto L., Atencio R., Araujo, M., y cols.: "Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in amerindians and other population group from Venezuela". *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (3): 648-651.
 34. Skinhøj P., Olesen H., Cohn J., Mikkelsen M.: "Hepatitis-associated antigen in pregnant woman". *Acta Pathol. Microbiol. Scan (B)* 1972; 80, 362.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

35. Rosendahl C., Kochen N.M., Kretschmer R., Wegscheider K., Kaiser D.: "Avoidance of perinatal transmission of hepatitis B virus: is passive immunization always necessary?". *Lancet*, i 1983; 1127-1129.
36. Stevens C.E., Neurath R.A., Beasley R.P., Szmuness W.: "HBeAg and anti-HBe detection by radioimmunoassay. Correlation with vertical transmission of hepatitis B virus in Taiwan". *J Med Virol* 1979;3:237-241.
37. Tabor A., Baykley A.C., Cairns J., Peeleu L., Gerety R.J.: "Horizontal transmission of hepatitis B virus among children and adults in five rural villages in Zambia". *J. Med. Virol.* 1985; 15:113-120.
38. Coursaget P., Bourdil C., Adamowicz P., Chotard J., Diop Mar I., Yvonnet B. y cols. "HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus". *Lancet*, ii, 1987; 1354-1358.
39. Baumert F., Rogers S.A., Hasegawa K., Liang T.J.: "Two core promoter mutations identified in a Hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication". *J. Clin. Invest.*, 1996; 98:2268-2276.
40. Carman W.F., Jacyma M.R., Hadziannis S., Karayiannis P., MCGaverty M.J., Makris A.: "Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection". *Lancet*, ii, 1989; 588-591.
41. Carman W.F.: "Variation in the core and X genes of hepatitis B virus". *Intervirology*, 1995; 38:75-88.
42. Hoofnagle J.H., Dusheiko G.M., Seff L.B., Jones E.A., Waggoner J.G. y cols. "Seroconversion from Hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis". *Ann. Intern. Med.* 1981; 94: 744-748.
43. Li J.S., Tong S.P., Wen Y.M., Vitvitski L., Zhang Q., Trepo C.: "Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region". *J. Virol.* 1993; 67: 5402-5410.
44. Rodriguez-Frías F., Buti M., Jardi R., Cotrina M., Viladomiu L., Esteban R., Guardia J.: "Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations". *Hepatology*, 1995; 22:1641-1647.
45. Lindh M., Andersson A.S., Gusdal A.: "Genotypes, nt 1858 variants and geographic origin of hepatitis B virus-Large-scale analysis using a new genotyping method". *J. Inf. Dis.* 1997; 175: 1285-1293.
46. Arauz-Ruiz P., Norder H., Visoná K.A., Magnius L.O.: "Genotype F prevails in HBV infected patients of hispanic origin in central America and may carry the precore stop mutant". *J. Med. Virol.* 1997; 51: 305-312.
47. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzanillo G., Tanzi E., y cols. "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *Lancet*, 1991; 336: 325-329.
48. Harrison T.H., Hopes E.A., Oon C.J., Zanetti A.R., Zuckerman A.J.: "Independent emergence of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *Hepatology*, 1991;13 (Suppl 4): S105-107.
49. Karthugesu V., Allison L.M.C., Fortuin M., Mendy M., Whittle H.C., Howard C.R.: "A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children". *J. Gen. Virol.*, 1994; 75: 443-448.
50. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Walters J., Manzanillo G., Tanzi E., y cols. "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *Lancet*, ii, 1990; 325-329.
51. Carman W.F.: "Vaccine-associated mutants of hepatitis B virus". En: *Viral hepatitis and liver disease*, Nishioka K., Suzuki H., Mishiro S., Oda T. (eds) Springer-Verlag, Hong Kong, 1994; 243-247.
52. Trepo C, Jezek P., Atkinson G., Boon R.: "Efficacy of famciclovir in chronic hepatitis B: results of a dose-finding study". *Hepatology*, 1996; 24: 188A.
53. Dienstag J., Perillo R., Schiff E., Bartholomew M., Vicary C., Rubin M.: "A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection". *N. Engl. J. Med.*, 333: 1657-1661.
54. Carman W., Hadziyannis S., Mc Garvey M.J., Jacyna M., Karayiannis P., Makris A. y cols. "Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection". *Lancet*, 1989; ii: 588-591.
55. Block T.M., Lu X., Mehta A.S., Blumberg B.S., Tennant B., Ebling M., y cols.: "Treatment of chronic hepadnavirus infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking". *Nat. Med.* 1998; 4: 610-614.
56. Tassopoulos N.C., Volpes R., Pastore G., Heathcote J., Buti M., Goldin R., y cols.: "Lamivudine therapy in patients with anti-HBe positive chronic hepatitis B; end of treatment analysis". *J.Hepatol.* 1998; 28 (1): 43.
57. Mason W.: "The problem of antiviral therapy for chronic hepadnavirus infection". *J. Hepatol.* 1993; 17(3): S137-S142.
58. Fourei I., Cullen J., Saputelli J., Aldrich C., Schaffer P., Averett D. y cols.: "Evidence that hepatocyte turnover is required for rapid clearance of duck hepatitis B virus during antiviral therapy of chronically infected ducks". *J. Virol.* 1994; 68: 8321-8330.

59. Hanz O., Borel C., Traub C., Zoulim F., Dessolin J., Camplo M., y cols.: "Selective inhibition of the duck hepatitis B virus by a new class of tetraazamacrocycles". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1997; 41: 2579-2581.
60. Bartenschlager R., Schaller H.: "Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome". *EMBO* 1992; 11: 3413-3420.
61. Hirsch R.C., Lpeb D.D., Pollack J.R., Ganem D.: "Cis-acting sequences required for encapsidation of duck hepatitis B virus pregenomic RNA". *J. Virol.* 1991; 65: 3309-3316.
62. Stephens J.C.: "Statistical methods for DNA sequences analysis: detection of intragenic recombination or gene conversion". *Molecular & Biological Evolution* 1995; 2: 539-556.
63. Schirmaker P., Wang W., Stahnke G., Will H., Rogler C.E.: "Sequences and structures at hepadnaviral integration: recombination sites implicates topoisomerase I in hepadnaviral DNA rearrangements and integration". *J Hepatol* 1995; 22: 21-23.
64. Buendia M.A., Paterlini P., Tiollas P., Brechot C.: "Hepatitis B virus: liver cancer". En Zuckerman A.J., Thomas H.C. (eds) *Viral Hepatitis*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1993; 137-164.
65. Bollyky P.L., Rambaut A., Harvey P.H., Holmes E.: "Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes". *J. Mol. Evol.* 1996; 42: 97-102.
66. Girones R., Miller RH.: "Mutation rate of hepadnaviruses". *Virology* 1990; 170: 595.
67. Lanford R.E., Chavez D., Brasky K.M., Burns III R.B., Rico-Hesse R.: "Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a new world primate". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 5757-5761.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

INFECCIÓN OCULTA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)

Dra. Cristina del Rosario Gutiérrez García, MSc.

Laboratorio de Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.)

RESUMEN

La infección oculta por el virus de hepatitis B (VHB) se caracteriza por la presencia de actividad de replicación viral en ausencia de marcadores serológicos usuales: las infecciones residuales se producen en ausencia del antígeno de superficie del VHB (Ag_sHB) y en presencia de anticuerpos anti-HBc y las infecciones "silentes" se caracterizan por la ausencia de marcadores serológicos de la hepatitis B. La presencia de variantes virales del VHB pudieran ser la causa de la baja actividad de replicación viral y por ende del desarrollo de estas infecciones ocultas. El diagnóstico de hepatitis en tales individuos se hace difícil, dado que los marcadores virales tanto en suero como en hígado, con frecuencia se encuentran por debajo del límite de detección de los inmunoensayos corrientemente utilizados. Se ha sugerido que el uso de técnicas altamente sensibles de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) pudiera ser útil en la determinación de estas infecciones. El estudio sobre los mecanismos de generación de las infecciones ocultas contribuye a una mejor comprensión sobre la realidad epidemiológica de la hepatitis B.

PALABRAS CLAVE: VIRUS, HEPATITIS B, REPLICACIÓN, VARIANTES, INFECCIÓN RESIDUAL, INFECCIÓN SILENTE, DONANTES, TRANSFUSIONES.

SUMMARY

Hepatitis B virus (HBV) occult infection is characterized by viral replication in the absence of the usual serological markers: residual infections are defined by the presence of anti-HBcAg antibodies without HBsAg and "silent" infections are characterized for the absence of all HBV serological markers. Viral variants of HBV might be responsible for a low replication activity and then for the development of these occult infections, which might be a mechanism of persistence for this virus in the host. The diagnosis of hepatitis in such patients is difficult because the viral markers in serum and liver are frequently present under the detection limit of immunoassays currently used. The development of nucleic acid amplification technologies (NAT) might be useful to detect these infections. The study of the mechanisms of generation of occult infections contributes to a better understanding of HBV epidemiology.

WORDS KEY: HEPATITIS B VIRUS, REPLICATION, VARIANTS, RESIDUAL INFECTION, SILENT INFECTION, DONORS, TRANSFUSIONS.

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 29-38

Aceptado para su publicación julio de 2000

INTRODUCCIÓN

El VHB es uno de los virus más importantes desde el punto de vista clínico ya que existen aproximadamente 350 millones de portadores de este agente viral. En Venezuela la endemicidad de infección por VHB es baja con tendencia a intermedia, afectando a un 1-1,5% de la población venezolana, en la cual la mayor parte pertenece al grupo de bajo riesgo, como es el caso de los donantes de sangre.

En los últimos años se ha demostrado que la infección por VHB puede resultar en bajos niveles de transcripción genética viral^{1,2}, lo cual es uno de los posibles mecanismos de persistencia del virus en el hospedero³. El diagnóstico de la infección por VHB en tales individuos se hace difícil, dado que los marcadores virales tanto en suero como en hígado, con frecuencia se encuentran por debajo del límite de detección de los inmunoensayos corrientemente utilizados. Se han descrito infecciones ocultas producidas por el VHB, crónicas y asintomáticas, las cuales cursan con patrones serológicos inusuales asociados a baja carga de ADN genómico y persistencia viral⁴. Tal es el caso de las infecciones residuales producidas en ausencia del AgsHB y en presencia de anticuerpos anti-HBc⁵ y de las infecciones "silentes", caracterizadas por la ausencia de marcadores serológicos del VHB⁶. A continuación se tratarán algunos aspectos sobre la biología y curso de la infección producida por VHB así como las causas y posibles mecanismos de origen de estas infecciones crónicas de hepatitis B con patrones serológicos atípicos.

Biología molecular y estructura viral

El VHB constituye el agente prototipo de una familia de virus ADN designada *Hepadnaviridae* (Figura 1A). El virión infeccioso del VHB se observa al microscopio electrónico como una partícula esférica de aproximadamente 42 nm de

diámetro. Llamada originalmente partícula de "Dane", consiste en una partícula compleja de doble envoltura, en la cual se distingue una cápside de 27 nm rodeada de una envoltura lipoproteica de 7 a 8 nm de espesor. Este virión completo tiene una densidad de 1.28 g/cm³ en CsCl. Su nucleocápside contiene la proteína de la cápside con la especificidad del antígeno de la cápside (AgcHB), cuya forma no particulada denominada antígeno e (AgeHB) es secretada en el suero durante la infección viral. Igualmente, la nucleocápside del virión encierra una molécula pequeña (3200pb) circular de ADN de doble cadena parcial y actividad endógena de ADN polimerasa⁷. El VHB presenta el genoma de tipo ADN de virus animal más pequeño conocido en la actualidad⁸.

El genoma viral es muy compacto y consiste en dos hebras de ADN: una hebra corta (o positiva) y una hebra larga (o negativa, dado que su secuencia es complementaria a aquella de su ARN mensajero viral) que contiene cuatro marcos abiertos de lectura solapados (MALs)⁸ (Figura 1B). Estos MALs virales son: el gen P (polimerasa), el cual codifica la ADN polimerasa asociado al virión, con actividad adicional de transcriptasa reversa⁹; el gen C (cápside), codifica para la proteína estructural de la nucleocápside (AgcHB). Este gen es precedido por una corta región pre-C que codifica para una proteína (AgeHB) secretada a la circulación durante la infección viral; el gen S (superficie), codifica para la glicoproteína principal de la envoltura viral, e incluye las especificaciones para el AgsHB (24 kD)^{10, 11}; finalmente, el gen X codifica para una proteína reguladora, la cual constituye un elemento trans-activador de la expresión genética celular y viral¹¹. El VHB emplea para su replicación una transcriptasa reversa carente de una capacidad correctora, lo cual permite la producción de una mayor tasa de errores a nivel genómico y el origen de múltiples



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

variantes virales^{12, 13}. No obstante, dado el solapamiento de los MALs en el genoma del VHB, esta tasa de errores es menos elevada que un virus ARN.

Transmisión y curso de la infección

El VHB es un virus de transmisión esencialmente parenteral, por lo que cualquier contacto íntimo o sexual, exposición directa o indirecta con sangre o suero contaminados con el virus, puede transmitir la infección. Igualmente se incluye la transmisión vertical o perinatal (paso del virus de una madre infectada a su hijo)⁸.

En un caso típico de infección aguda por VHB, el AgsHB aparece de 2 a 4 semanas antes de observarse niveles anormales de aminotransferasas y luego declina lentamente a niveles no detectables a los 4 a 6 meses. El término de la infección aguda ocurre con la desaparición del AgsHB y la aparición de su anticuerpo específico (anti-HBs), el cual constituye el anticuerpo de neutralización del VHB. La persistencia del AgsHB por más de 6 meses podría definir la condición de portador del mismo (Figura 2). Dado lo anterior, la presencia del AgsHB puede ser señal de una infección aguda o crónica por VHB⁸.

Por otra parte, elevados niveles de anticuerpos contra el antígeno de la nucleocápside viral (anti-HBc) de isotipo IgM dirigidos contra la proteína de la cápside del VHB coinciden con la elevación anormal de las aminotransferasas y la fase sintomática de la enfermedad. Dado que este anticuerpo es producido en respuesta a la síntesis de la proteína de la nucleocápside viral, su aparición en el suero es indicativo de replicación viral. El isotipo IgG anti-HBc aparece inmediatamente después de la IgM anti HBc y permanece de por vida tanto en portadores crónicos del virus como en pacientes recuperados de la infección (Figura 3). Por ende, la presencia de este anticuerpo indica exposición al VHB, en otras palabras,

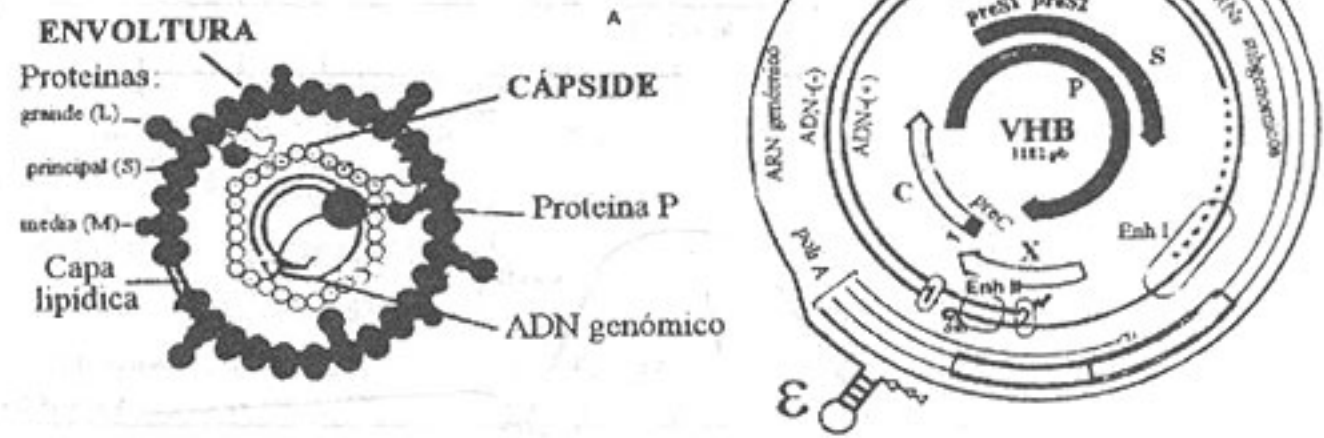


Figura 1

A. Estructura de una partícula viral infecciosa del VHB. B. Organización del genoma del VHB. S: superficie; preS: Presuperficie; P: polimerasa; X: Gen X; preC: prenucleocápside; C: nucleocápside; 1: secuencia repetida DR1; 2: secuencia repetida DR2; E: señal E (Epsilon).

advierte sobre una infección pasada o activa por el virus en el individuo¹⁴.

El período de "ventana" se caracteriza por la no detección de AgsHB ni de sus anticuerpos específicos (anti-HBs), de manera tal que durante este período la presencia del anti-HBc isotipo IgM es el único indicador de la infección por VHB⁸.

Otro antígeno del VHB denominado antígeno "e" (AgeHB), se detecta en el suero de todos los pacientes infectados por el virus y su aparición coincide o se produce inmediatamente después a la del AgsHB (Figura 2). La presencia de este antígeno se correlaciona con una elevada replicación genómica, alta carga viral e infectividad del suero¹⁵. Se ha sugerido que el AgeHB, transmitido vía placentaria, induce tolerancia de células T, tanto a AgeHB como a AgcHB en un modelo transgénico murino y podría predisponer a neonatos nacidos de madres infectadas por VHB a una infección persistente por un mecanismo similar. En adultos parece que el AgeHB puede funcionar como un inmunomodulador, disminuyendo los mecanismos de eliminación antiviral mediante la inducción de citocinas tipo Th2 (IL-4)¹⁶. La desaparición del AgeHB es seguida por la aparición inmediata del anticuerpo contra el antígeno "e" (anti-HBe). Clínicamente esta seroconversión de AgeHB a anti-HBe es importante ya que es indicio de recuperación, tanto de la infección como de la enfermedad en los casos agudos, mientras que en los portadores de AgsHB indica una baja carga viral⁸.

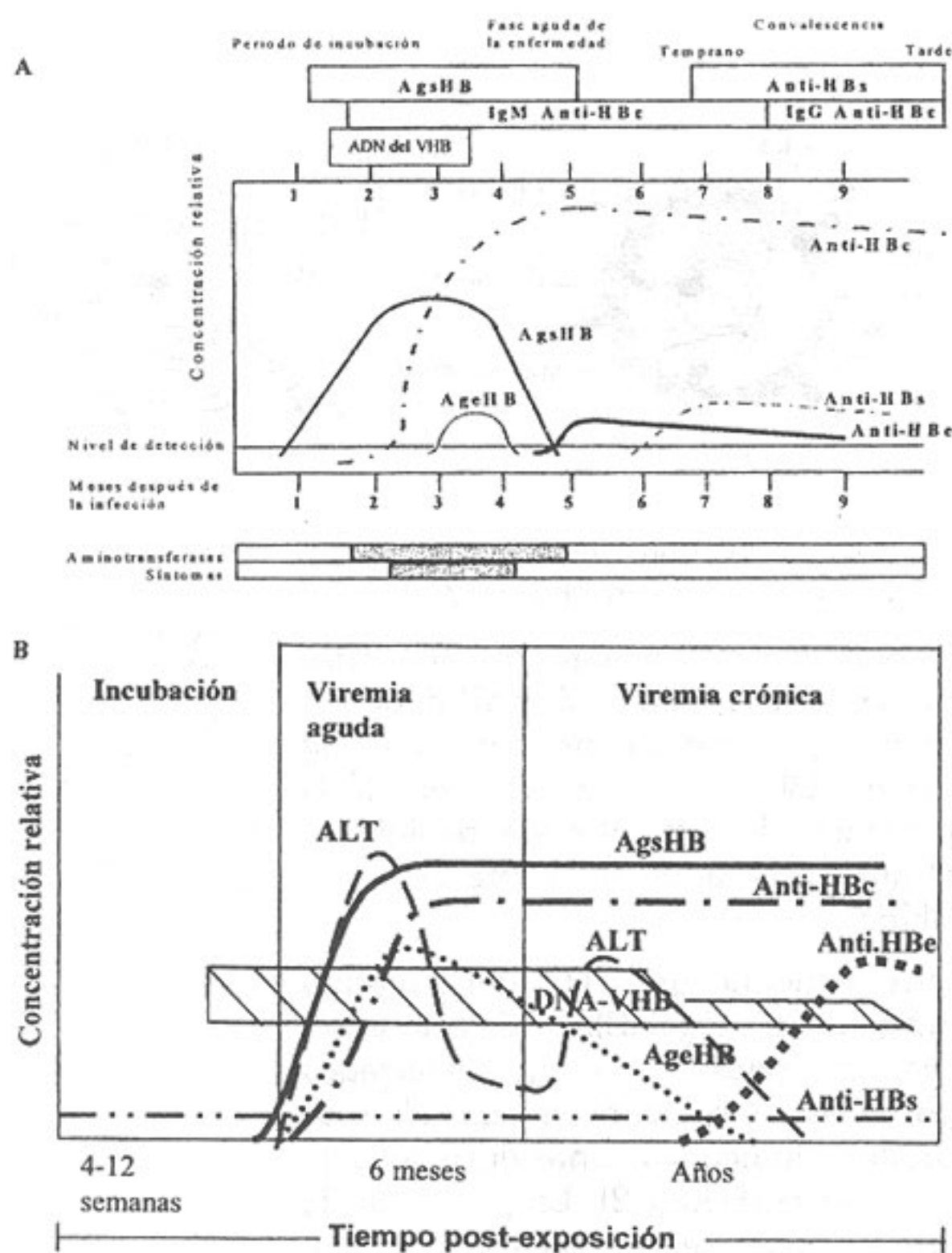


Figura 2

Marcadores serológicos y viremia observados en hepatitis B durante: A. Infección aguda con recuperación de la enfermedad. B. Infección aguda con progresión a cronicidad.

La detección del ADN del VHB en suero permite el monitoreo de la replicación viral y por ende hacer un seguimiento de la evolución de la infección frente al tratamiento antiviral¹⁷. El ADN del VHB puede ser detectado por PCR en pacientes antes del establecimiento de los síntomas de la hepatitis B aguda y de la elevación de las transaminasas (Figura 2A). Los niveles usualmente declinan rápidamente cerca del período de elevación máxima de transaminasas y la seroconversión a anti-HBe. Se ha reportado una disminución significativa de ADN en suero en pacientes con hepatitis B fulminante, lo cual coincide con la propuesta que factores inmunitarios pueden dañar el hígado en el proceso de eliminación del virus. Actualmente, la detección de ADN del VHB en el manejo de pacientes con hepatitis B aguda tiene poca utilidad ya que la determinación de los marca-

dores serológicos específicos permite la obtención de suficiente información diagnóstica y pronóstica de la infección. No obstante, la detección del ADN viral puede ser una herramienta útil en la evaluación de pacientes con patrones serológicos inusuales en la infección aguda, carentes de algún marcador serológico estándar como por ejemplo el AgsHB⁴. Igualmente, la determinación de los niveles del ADN del VHB en suero ha sido utilizado en la evaluación de los dos estadios de replicación viral observados en la hepatitis B crónica¹⁸. El primer estadio consiste en una fase de replicación elevada, la cual comienza inmediatamente después del primer contacto con el virus y se caracteriza por elevados niveles de ADN del VHB y una fuerte respuesta inflamatoria hepática (Figura 2B). Algunos de estos pacientes presentarán una hepatitis activa persistente evidenciada por una elevación de transaminasas séricas y progresarán a cirrosis y posiblemente a carcinoma hepatocelular. Sin embargo, luego de un primer estadio de fase aguda muchos pacientes se convierten en portadores asintomáticos al entrar en una etapa tardía, caracterizada por una fuerte disminución en los niveles de replicación, lo cual es frecuentemente asociado con seroconversión de AgeHB a anti-HBe¹⁷. Luego de esta seroconversión, algunos de estos pacientes pierden espontáneamente el AgsHB y seroconvierten a anti-HBs. No obstante, en algunos casos seronegativos para el AgsHB se ha evidenciado persistencia viral al detectarse ADN del VHB por PCR en portadores asintomáticos¹⁹.

Infección residual por el VHB Posibles causas y mecanismos

Recientemente, ha sido introducido el término de infección residual para definir a aquellas infecciones por VHB producidas en ausencia del AgsHB y en presencia de anticuerpos anti-HBc⁵. Otro patrón serológico inusual es observado en pacientes con infecciones



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

"silentes", caracterizadas por la ausencia de marcadores serológicos del VHB⁶. En ambos casos se ha descrito la detección de bajos niveles de replicación viral mediante determinaciones del ADN del VHB por PCR a partir del suero, hígado y células mononucleares de sangre periférica de estos pacientes⁴. Se han involucrado diversos factores en el origen de las infecciones residuales, tales como: mutaciones en el genoma viral y formación de complejos inmunitarios AgsHB-anti-HBs. Otra posible explicación es la coinfección frecuentemente observada con virus de hepatitis C, cuya proteína de la cápside se ha demostrado que disminuye la replicación del VHB y la síntesis de sus proteínas en líneas celulares de hepatomas¹¹. Por otra parte, recientes investigaciones han demostrado que tanto el VHB como los anticuerpos anti-HBs pueden coexistir en el mismo paciente y que el VHB puede ser encontrado en algunos individuos portadores, positivos para la presencia de anticuerpos anti-HBc en ausencia de AgsHB inmunológicamente detectable^{20, 21}. Estos estudios han evidenciado la circulación del AgsHB en complejos inmunitarios con su anticuerpo específico en dichos pacientes, lo cual puede disminuir o inhibir completamente la detección del AgsHB y de su anticuerpo específico por inmunoensayos estandar¹². Otras investigaciones sobre infecciones residuales por VHB han enfatizado la importancia potencial de mutaciones a nivel de secuencias de los genes preC, promotor de la cápside, preS y S en el fenómeno de persistencia viral^{4, 22}. Se ha propuesto que estas variantes pueden emerger en virtud de mecanismos intrínsecos en su replicación (variantes con deleciones en el promotor de la cápside, algunas variantes pre-C) o debido a una selección positiva por una respuesta inmunitaria humoral o celular del hospedero (variantes con defectos pre-C o mutaciones en el determinante *a* del AgsHB)⁶. A estas últimas variantes originadas en virtud de una presión inmunológica se les denominan mutantes de escape²³.

Emergencia de variantes por presión inmunológica: origen de las mutantes de escape

En el ciclo infeccioso del VHB, una vez que ocurre la penetración de la nucleocápside hacia el citoplasma y la liberación del genoma de ADN de doble cadena parcial, éste es luego translocado al núcleo donde madura a la forma de ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc). Después de su asociación a histonas, el ADNccc nuclear es convertido en un mini-cromosoma episomal, el cual sirve como templado para la transcripción de ARNms virales. Esta forma de ADN se origina en el comienzo de la infección a partir de partículas de la cápside citosólicas, lo cual resulta en infección persistente de la célula (Decker, R.H. 1998). Investigaciones recientes han demostrado que el genoma del VHB es detectable como una forma episomal en la mayoría de los individuos asintomáticos con infección residual por VHB, lo cual ha sido evidenciado mediante la detección de ADNccc y ARN intermediario por PCR en hepatocitos de estos pacientes, indicando actividad de replicación viral baja pero persistente en tejido hepático²⁴. Estos mismos autores demostraron además que la cepa predominante en la mayoría de los individuos evaluados con infección residual presentaba mutaciones en la región pre-C a pesar de la presencia de anticuerpos anti-HBe en suero.

Se ha descrito que la presencia de mutaciones en la región pre-C del VHB inhibe la síntesis del AgeHB y originan las denominadas variantes defectivas pre-C. Una de las mutaciones más comunes es una sustitución G por A en la posición 1896, lo cual produce un cambio de TRP²⁸ (TGG) por un codon de parada traduccional (TAG), inhibiéndose la síntesis del AgeHB²⁵. Recientemente, se ha evidenciado la emergencia o selección de variantes defectivas pre-C o pre-S con cambios de genotipo en niños infectados crónicamente con pérdida del AgeHB o

del AgsHB, luego de la seroconversión a anti-HBe o anti-HBs, respectivamente. En estos individuos coinfectados inicialmente con cepas divergentes del VHB, se ha observado la selección de una cepa de genotipo y subtipo diferente a la que predominaba antes de la seroconversión. Las cepas del VHB aisladas en el mundo entero, se han clasificado en 6 genotipos deducidos de comparaciones genómicas e indicados como genotipos A,B,C,D,E y F. Recientemente, se ha reportado un nuevo genotipo encontrado en pacientes crónicamente infectados por el VHB al cual se le ha denominado genotipo G²⁶. Igualmente, basado en estudios sobre antigenicidad del AgsHB, se distinguen 9 serotipos, denominados subtipos del AgsHB y designados como adw2, adw4, adr, adrq-, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, y ayr²⁷. Así, se ha descrito la selección de cepas genotipo D (subtipo ayw) a partir de una población mixta de cepas en la cual predominaba cepas del VHB pertenecientes al genotipo A (subtipo adw) antes de la seroconversión^{6, 19, 28}. Se ha observado que la emergencia de variantes defectivas pre-S2 o pre-C genotipo D coinciden con una disminución drástica en los niveles de replicación viral en portadores seronegativos para AgsHB y/o AgeHB. Una posible explicación para la emergencia de estas cepas de genotipo diferente podría residir en una fuerte presión selectiva de genomas virales como resultado del paso de un estado de tolerancia inmunológica a un estado de activación del sistema inmunitario con la generación de anticuerpos anti-HBe. Estudios en ratones transgénicos-AgeHB han propuesto que un subgrupo particular de células Th específicas AgcHB/ AgeHB pueden evadir la inducción de tolerancia y ser activadas a pesar de la presencia del AgeHB secretados por cepas salvajes¹⁶. Cuando el AgeHB es convertido entonces, de tolerógeno a inmunógeno, puede ser ventajoso para la población viral reducir su expresión. De esta manera, se ha sugerido que células Th1, B ó CTL activadas,

específicas contra el AgeHB, pueden mediar la selección de cepas AgeHB-negativas⁶. Adicionalmente, se ha sugerido que el cambio de genotipo podría constituir un mecanismo de escape y persistencia viral en algunos individuos con infección residual dado que cepas de distinto genotipo difieren entre sí en numerosos aminoácidos en el MAL preS. De esta manera, se ha descrito que la región preS es altamente inmunogénica a nivel de células T y B, por lo tanto la presencia de mutaciones o cambios de aminoácidos en epítopes específicos de células B y T podrían permitir el escape del virus de su eliminación por el sistema inmunológico al bloquear la exportación del AgsHB^{12, 29}.

Todos los tipos virales contienen el determinante *a* (aminoácidos 124-147) (Figura 3) y la mayoría de los anticuerpos anti-HBs durante la respuesta inmunitaria normal son anti-*a* específicos; consecuentemente hay protección cruzada entre diferentes subtipos del VHB³⁰. Se ha demostrado que variaciones en la estructura primaria del determinante "a" cambia marcadamente la conformación predominante en la estructura antigénica del AgsHB (Figura 3). La sustitución del residuo 145 de glicina por arginina es la variación más frecuentemente encontrada en el determinante *a* de mutantes del gen S²⁹. Las vacunas convencionales contra la hepatitis B no protegen contra la infección y replicación de esta mutante³⁰. Estas variantes son más prevalentes en pacientes con infección residual, negativos para AgsHB ó positivos para antiHBs, lo cual podría favorecer la replicación en presencia de anticuerpos de neutralización en virtud de un mecanismo similar al ya descrito para las mutantes pre-C y pre-S. De esta manera, la carencia de AgsHB detectable en estos pacientes podría deberse a mutaciones en el determinante *a* y sus alrededores (aminoácidos 98-156), principal blanco para anticuerpos usados en ensayos inmunodiagnósticos (Figura 3), lo cual podría permitir un escape de



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

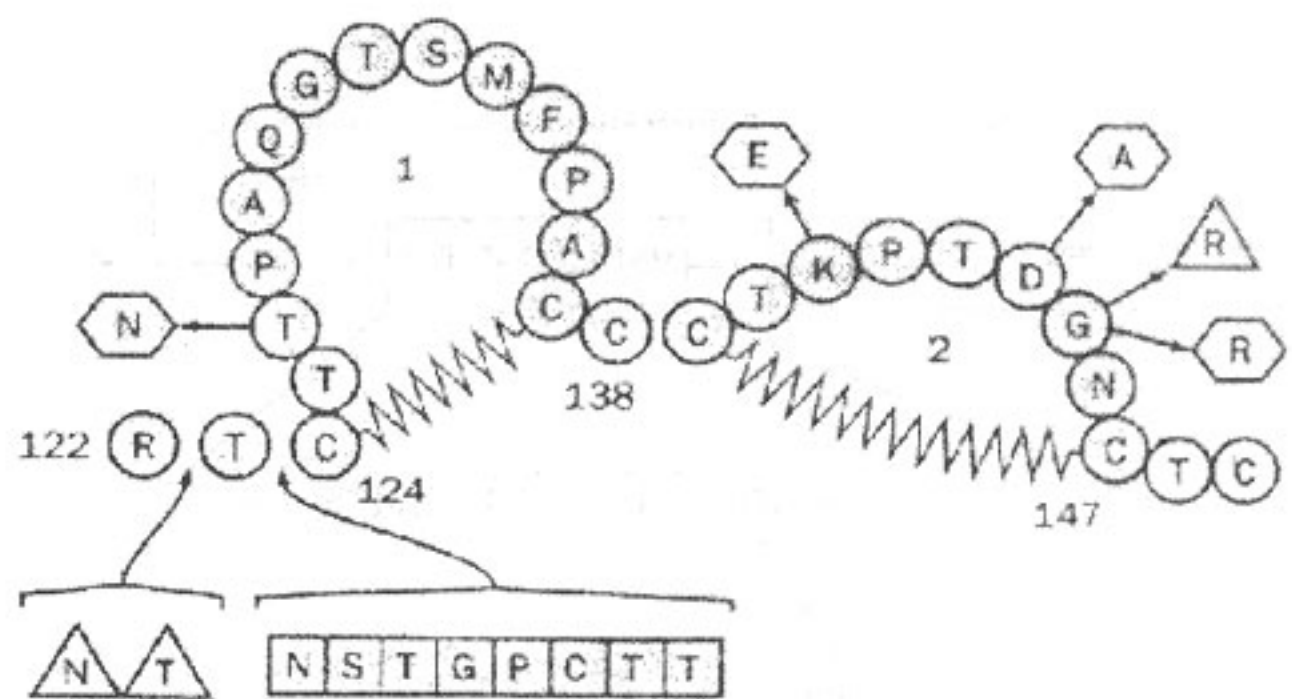
Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

estas variantes al reconocimiento por inmunoensayos utilizados de rutina¹². Las infecciones serológicamente "silentes", carentes de todos los marcadores del VHB no parecen estar asociadas con variantes del determinante a, sugiriendo que la carencia de AgsHB al igual que otros marcadores serológicos del VHB podría ser debido a bajos niveles de replicación en estos pacientes^{6, 31}.

Emergencia de variantes por mecanismos intrínsecos a la replicación genómica viral

Alternativamente, variantes defectivas pre-C del VHB pueden emerger debido a mecanismos intrínsecos de su replicación genómica. Se ha propuesto que mutaciones corriente arriba del promotor de la cápside puede afectar la regulación transcripcional del gen pre-C y por ende la expresión de su proteína, lo cual podría explicar la emergencia de cepas negativas para AgeHB a partir de las cepas salvajes. Interesantemente, se ha encontrado que la seroconversión de AgeHB a anti-HBe constituye un evento más temprano e independiente de la conversión genómica en la mayoría de los pacientes con mutaciones en las regiones pre-C y promotora de la cápside. Esta observación permite suponer que estas mutaciones pueden aparecer como un mecanismo de escape luego de la eliminación dirigida por linfocitos T contra hepatocitos con AgeHB en su superficie²².

Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo de escape intrínseco de la biología molecular del virus, el cual controla los niveles de replicación del VHB durante la infección crónica. De acuerdo a este mecanismo, mutaciones en los sitios de unión de factores transcripcionales de interés en la región enhancer I del gen C contribuyen a disminuir la replicación viral de estas cepas mutantes, lo cual puede resultar en una ventaja para la persistencia crónica del VHB. De esta manera, la



- Aminoácidos del determinante a y Puentes disulfuro
- Algunas inserciones observadas
- △ Algunas sustituciones observadas
- Otras mutantes asociadas a vacunas

presencia de mutantes de la región enhancer I de la cápside pudiera determinar el cambio de elevados a bajos niveles de replicación viral, el cual es frecuentemente observado durante la infección crónica del VHB¹⁷. Este mismo mecanismo podría explicar en parte el fenómeno de persistencia viral con bajos niveles de replicación genómica observada en infecciones residuales y silentes.

Por otra parte, se ha observado que variantes defectivas del promotor de la cápside prevalecen en pacientes con infecciones "silentes"⁶. La región promotora de la cápside regula la replicación del virus y la síntesis del AgeHB, dirigiendo la transcripción de dos ARNm distintos: el ARNm pre-genómico C, el cual sirve para la traducción de las proteínas de la cápside y polimerasa y como templado para la transcripción reversa y el ARNm pre-C a partir del cual es traducido el AgeHB⁶. El promotor de la cápside está compuesto de un promotor mínimo o básico (BCP), suficiente para el inicio de la transcripción y de secuencias regulatorias corriente arriba (URS) (Figura 4). La mayoría de las mutaciones de la región promotora ocurren en un promotor básico o mínimo denominado BCP,

Figura 3
Estructura del determinante a (aminoácidos 124-147) del AgsHB. Se muestra su conformación formada por puentes disulfuro entre cisteínas. La posición 122 es importante para el reconocimiento de subtipo d/y. Se observan ejemplos de importantes mutaciones: inserciones (□). Sustituciones (△) en portadores crónicos no vacunados y vacunados (○).

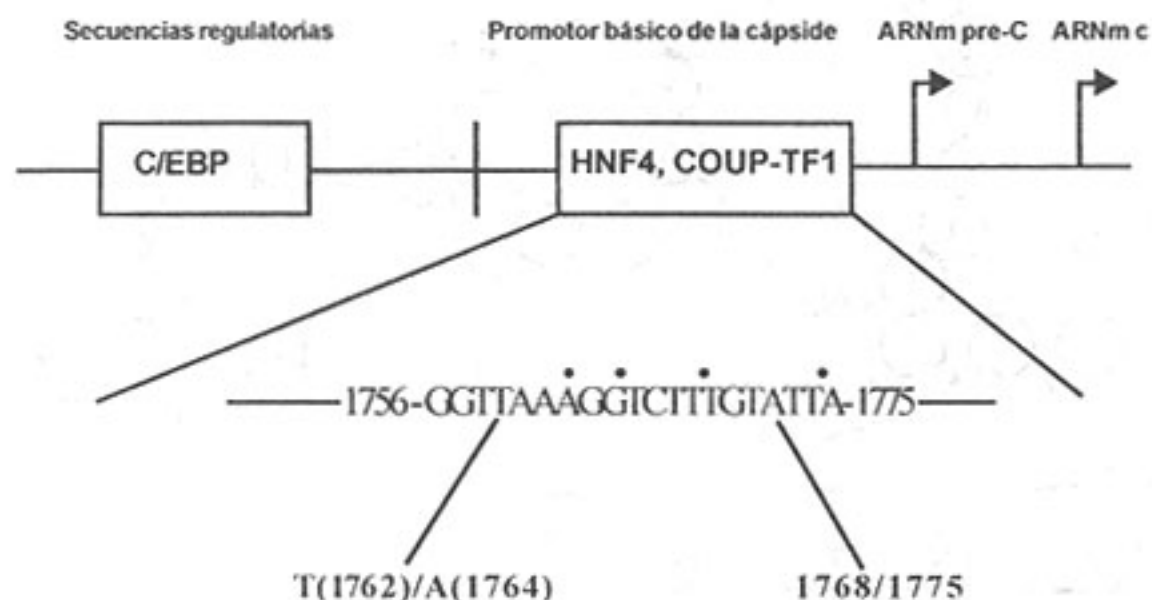


Figura 4
Organización genómica de la región promotora de la cápside. Se señalan las mutaciones más frecuentes en la secuencia correspondiente al sitio de unión de los factores de transcripción HNFs en el promotor básico de la cápside (BCP), asociadas a infecciones ocultas por VHB.

afectando el sitio de unión principal para diversos factores de transcripción celulares (Figura 4)³¹. Este tipo de mutaciones parecen estar igualmente asociadas con infecciones caracterizadas por una viremia extremadamente baja^{6, 17}. Por otra parte, debido a que la región promotora de la cápside se solapa con el gen X, mutaciones en el promotor pueden afectar la estructura y presumiblemente la función de la proteína X. Se ha observado que mutaciones en el BCP pueden afectar al gen X, permitiendo la producción de proteínas X truncadas. Se ha asociado la presencia de mutaciones en el gen X con infecciones "silentes". Sin embargo, el papel patógeno de estas mutantes en este tipo de infección atípica por VHB todavía no está claro³².

La presencia de mutantes de escape y otras variantes virales del VHB en algunos individuos con infección residual o silentes, aparentemente sanos podría explicar en parte los diversos casos de infección de hepatitis B post-transfusión en pacientes receptores, con unidades de sangre negativas para el AgsHB y positivas para anticuerpos anti-HBc o en ausencia de marcadores serológicos para el VHB³³. La presencia de anticuerpos anti-HBc sin otros marcadores serológicos del VHB es frecuentemente encontrado en diversas poblaciones de donantes, inclusive en nuestro país. En un estudio nuestro reciente, realizado en plasmas prove-

nientes de donantes de sangre con marcador exclusivo de anticuerpos anti-HBc se encontró ADN del VHB en un 6% (10 de 167 plasmas) de la población evaluada, observándose una correlación entre elevados niveles de anticuerpos anti-HBc y bajos niveles de anticuerpos anti-HBs con presencia de viremia³⁴. Entre los diversos factores incidentes sobre la presencia de anticuerpos anti-HBc en ausencia de AgsHB, encontramos: a) bajos niveles de replicación del VHB sin la producción de AgsHB detectable; b) obtención de la muestra durante el denominado "período de ventana" de la infección aguda por VHB; c) la pérdida de anti-HBs con el tiempo o falla en el desarrollo de una respuesta de anticuerpos anti-HBs después de la infección; o d) la presencia de variantes virales no detectadas por la mayoría de los ensayos corrientemente usados para la detección del AgsHB y anticuerpos anti-HBs. Adicionalmente, la presencia de infecciones residuales y "silentes" en virtud de la emergencia de variantes con cambios en la estructura antigénica viral puede afectar la sensibilidad de estos inmunoensayos³⁵.

Se ha sugerido que una solución directa a este problema podría ser la utilización de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos altamente sensible (NAT) para evaluar unidades sanguíneas provenientes de donantes con patrones serológicos atípicos de hepatitis B³⁶. Aunque es técnicamente factible la implementación del NAT en el despistaje del VHB a nivel transfusional, la aplicabilidad de esta técnica requiere su evaluación desde el punto de vista clínico y en cuanto a su eficiencia relacionada al costo bajo el contexto del área de salud pública³⁷. Diversos servicios de banco de sangre en Europa, Japón y USA se encuentran actualmente en la fase experimental de evaluación de este tipo de análisis a donaciones sanguíneas^{36, 37}.

El estudio de otros posibles factores y mecanismos de origen de las infecciones ocultas por VHB, tales como las infec-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

ciones residuales y silentes mediante la utilización de técnicas de biología molecular contribuirá a un mayor conocimiento sobre la realidad epidemiológica de la hepatitis B tanto en Venezuela como en el resto del mundo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Wands J.R., Fujita Y.K., Isselbacher K.J., Degott C.S.: "Identification and transmission of hepatitis B virus-related variants". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 6608-6612.
2. Paterlini P., Driss F., Nalpas B., Pisi E., Franco D., Bertholot P., Brechot C.: "Persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in primary liver cancers from HB-Ag-negative patients: a study of a low-endemic area". *Hepatology* 1993;17: 20-29.
3. Maia M., Takahashi H., Adler K., Garlick R.K., Wands J.R.: "Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen". *Journal of Virological Methods* 1995; 52: 273-286.
4. Decker R.H.: Diagnosis of acute and chronic hepatitis B viral. *Viral Hepatitis*, second edition, 1998; 14, 201-217.
5. Gandhi M.J., Yang G.G., McMahon B.J., G.N. Vyas: "Hepatitis B virions isolated with antibodies to the pre-S1 domain reveal occult viremia in surface antigen-negative/antibody-positive Alaska native carriers by polimerase chain reaction". *Transfusion*, 2000; 40: 2193-2202.
6. Günther S.: "Naturally occurring variants of hepatitis B virus". *Advances in virus research*, 1999; 25: 25-137.
7. Ganem D.: Hepadnaviridae and their replication. *Fields Virology*, third edition, 1996; 85: 2703-2737.
8. Hollinger F.B.: Hepatitis B Virus. *Fields Virology*, third edition, 1996; 86: 2739-2763.
9. Robinson W.S.: "Hepadnaviridae and their replication". Fields, B.N., et. al. *Virology*. Raven Press, Ltd., N.Y., USA, 1990; 85: 2137-2169.
10. Tiollais P., Buendia M.A.: "Hepatitis B Virus". *Scientific American*, 1991; 264: 116-123.
11. Lee W.: "Hepatitis B infection". *N. Engl. Med.*, 1998; 337: 1733-1745.
12. Weinberger K.M., Zoulek G., Bauer T., Bohm S., Wolfgang J.: "A novel deletion mutant of hepatitis B virus surface antigen". *J. of Med. Virol*, 1999; 58: 105-110.
13. Summers J., Mason W.S.: "Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate". *Cell*, 1982; 29: 403-415.
14. Lisuka H., Ohmura K., Ishijima A., Satoh K., Tanaka T., Okamoto H., y cols.: "Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HbsAg". *Vox. Sang.*, 1992; 63: 107-111.
15. Thomas H.I.J.: "Relative functional affinity of Specific anti-core IgG in different categories of hepatitis B virus infection". *J. of Med. Virol.*, 1997; 51: 189-197.
16. Milich D.R., Chen M.K., Hughes J.L., Jones, J.E.: "The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: A mechanism for persistence". *J. Immunol.*, 1998; 160: 2013-2021.
17. Bock C-T., Malek N.P., Tillmann H.L., Manns M.P., Trautwein C.: "The enhancer I core region contributes to the replication level of hepatitis B virus in vivo and in vitro". *J. of Virol.*, 2000; 74: 2193-2202.
18. Bahn A., Gerner P., Martine U., Bortolotti F., Wirth S.: "Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from HbsAg to anti-HBs indicating viral persistence". *J. Hepatol.*, 1997. 27: 973-978.
19. McMahon B.J.: "Chronic carriers of hepatitis B virus who clear hepatitis B surface antigen: are they really "off the hook". *Hepatology*, 1998; 28, 263-265.
20. Maillard P., Pillot J.: "At least three epitopes are recognized by the human repertoire in the hepatitis B virus group a antigen inducing protection; possible consequences for seroprevention and serodiagnosis". *Res. Virol.*, 1998; 149: 153-161.
21. Bläckberg J., Kidd-Ljunggren K.: "Genotypic differences in the hepatitis B virus core promoter and precore sequences during seroconversion from HBeAg to anti-HBe". *J. of Med. Virol.*, 2000; 60: 107-112.
22. Carman W.F., Trautwein C., Deursen F.J., Colman K., Dorman E., McIntyre G., y cols. "Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis". *Hepatology*, 1996; 24: 489-493.
23. Marusawa H., Uemoto S., Hijikata M., Yoshihide U., Koichi T., Kunitada S., y col. "Latent hepatitis B Virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen". *Hepatology*, 2000; 31: 488-495.
24. Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., Karayiannis P., McGarvey M.J., Makris A. y col. "Mutation preventing formation of hepatitis B

- e antigen in patients with chronic hepatitis B infection". *Lancet*, 1989; 2: 588-591.
25. Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi R.F., y cols. "A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness". *J. of Gen. Virol.*, 81, 67-74, 2000.
 26. Magnius L.O., Norder H.: "Subtypes, Genotypes and Molecular Epidemiology of the Hepatitis B Virus as reflected by sequence variability of the S-Gene". *Intervirology*, 38, 24-34, 1995.
 27. Gerner P.H., Friedt M., Oettinger R., Lausch E., Wirth S.: "The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children". *Virology* 245, 163-172, 1998.
 28. Carman, W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., y cols. "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *The Lancet*, 336, 325-329, 1990.
 29. Zuckerman A.J., Zuckerman J.N. "Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants". *J. of Med. Virol.*, 58, 193-195, 1999.
 30. Seddigh-Tonekaboni S., Waters J.A., Jeffers S., Gehrke R., Ofenloch B., Horsch A., Hess G., y cols.: "Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen". *J. of Med. Virol.*, 60, 113-121, 2000.
 31. Kramvis A., Kew M.C.: "The core promoter of hepatitis B virus". *J. of Viral Hepatitis*, 6, 415-427, 1999.
 32. Fukuda R., Ishimura N., Kushiya Y., Moriyama N., Ishihara S., Chowdhury A., y cols. "Hepatitis B virus with X gene mutation is associated with the majority of serologically "silent" non-B, non-C chronic hepatitis". *Microbiol. Immunol.*, 40, 481-488, 1996.
 33. Saraswat S., Banerjee K., Chaudhury N., Mahant T., Khandekar P., Kumar R., Naik S.: "Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusions of HBsAg-negative blood". *J of Hepatol.* 25, 639-643, 1996.
 34. Gutiérrez C., Leon G., Loureiro C.L., Uzcátegui N., Liprandi F., Pujol F.H.: "Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen". *Clin Diagn. Lab. Immunol.*, 6, 768-770, 1999.
 35. Carman W.F., Thomas H., Domingo E. "Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example". *The Lancet*, 341, 349-352, 1993.
 36. Gerlich W.H., Caspari G.: "Hepatitis viruses and the safety of blood donations". *J. of Viral Hepatitis*, 6, 6-15, 1999.
 37. Allain JP.: "Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings". *Clin. Lab. Haematol.*, 22, 1-10, 2000.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Infeccción oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE HEPATITIS C

Dr. Félix Toro

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina,
Instituto de Inmunología

RESUMEN

El Virus de la Hepatitis C (VHC) representa un nuevo miembro de la familia Flaviviridae cuya caracterización molecular ha sido llevada a cabo en los últimos cinco años. La partícula viral consiste de una envoltura de naturaleza lipoproteica, derivada de la membrana de la célula hospedera, que contiene los dos principales polipéptidos estructurales designados como E1 y E2. La envoltura rodea la nucleocápside, estructura constituida principalmente por una proteína básica que está en estrecha interacción con el genoma viral representado por una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva con una longitud aproximada de 9.600 nucleótidos. La organización genómica del VHC es similar a la de Pestivirus y Flavivirus, ubicándose las secuencias que codifican para las proteínas estructurales hacia el extremo 5' y las que codifican para las proteínas no estructurales hacia el extremo 3' del genoma. Ambos tipos de polipéptidos son generados a partir de una poliproteína de 3.000 aa que es procesada proteolíticamente por enzimas de origen celular y viral. Dos regiones no codogénicas se identifican hacia los extremos 5' y 3' del genoma y se caracterizan por presentar secuencias altamente conservadas que parecen ser fundamentales en el proceso replicativo del virus.

PALABRAS CLAVE: VHC, FLAVIVIRUS, GENOMA, POLIPEPTIDOS.

SUMMARY

The Hepatitis C Virus (HCV) represents a new member of the Flaviviridae family whose molecular characterization has been carried out in the last five years. The viral particle consists of a lipoprotein envelope derived from host cell membranes which contains two structural polypeptides designated as E1 and E2. The envelope surrounds the nucleocapsid, a structure mainly formed by a basic protein that is tightly interacting with the viral genome represented by a positive-sense single stranded RNA molecule of approximately 9,600 nucleotides. The genomic organization of the HCV resembles that of Pestivirus and Flavivirus with 5' end sequences coding for structural proteins and 3' end sequences coding for non-structural proteins. Both, structural and non-structural polypeptides are generated from a polyprotein of 3,000 aminoacids which is processed by cellular and viral proteases. Two additional non-coding and highly conserved sequences are identified towards the 5' and 3' end regions of the HCV genome. These sequences seem to play an important role in the process of viral replication.

KEY WORDS: VHC, FLAVIVIRUS, GENOME, POLYPEPTIDES.

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 39-52

Aceptado para su publicación agosto de 2000

INTRODUCCIÓN

En el año de 1975 se describe por primera vez un tipo de agente infeccioso no relacionado con los virus de hepatitis A y hepatitis B, el cual era responsable de un gran número de casos de hepatitis post-transfusionales (Feinstone et al., 1975). Quince años después, se logra identificar el virus causante de la hasta entonces denominada hepatitis post-transfusional NoA, NoB siendo designado dicha entidad biológica como virus de la hepatitis C (VHC). En la actualidad, está claramente establecido que el VHC representa el principal agente etiológico responsable de más del 90 % de los casos de hepatitis post-transfusionales y esporádicas a nivel mundial (Genesca et al., 1991). Su identificación, mediante técnicas de biología molecular, ha permitido no solo su caracterización estructural, sino también el desarrollo de toda una serie de ensayos inmunológicos y moleculares que actualmente son utilizados a nivel mundial para el diagnóstico y estudio de esta infección viral crónica (Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989; Miyamura et al., 1990; Alter, 1992, Schiff et al., 1999).

El presente trabajo tiene como objetivo revisar aspectos fundamentales de la biología molecular del VHC, enfocándose principalmente sobre las características estructurales del virus y su modo o estrategia de replicación.

Clasificación

El análisis de las secuencias nucleotídicas de diferentes aislados virales distribuidos a nivel mundial ha permitido establecer que el VHC representa una nueva especie viral que está relacionada con los géneros *Pestivirus* y *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Miller y Purcell, 1990). Este grupo de virus se caracteriza por poseer un genoma o material genético formado por una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva la cual es traducida por la maquinaria ribosomal para generar una poliproteína que contiene los distintos

polipéptidos estructurales y no estructurales que conforman el virión. El análisis comparativo de esta serie de características estructurales ha llevado a proponer una clasificación para el VHC dentro de un nuevo género, distinto a *Pestivirus* y *Flavivirus*, denominado *Hepacivirus* ó Virus relacionados con el VHC (Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). Por otro lado, el VHC parece estar mas estrechamente relacionado con el género *Pestivirus* en virtud de las similitudes entre las secuencias nucleotídicas reportadas para ambos géneros, compartiendo igualmente características estructurales y funcionales en la región 5' no traducida del genoma viral. Mas recientemente, se ha podido establecer una relación mucho mas cercana entre el VHC y el recientemente identificado grupo de virus GBV-A, GBV-B y GBV-C/Virus de hepatitis G, también conocidos como agentes (GB). Este grupo viral ha sido igualmente clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* aunque su caracterización estructural y taxonómica no ha sido aún definida por completo (Kiyosawa y Tanaka, 1999).

Características estructurales del VHC

Inicialmente, la caracterización estructural del VHC se basó en estudios de ultrafiltración realizados a partir de aislados virales provenientes de chimpancés infectados. Estos análisis establecieron un diámetro aproximado para el virión de 30 a 60 nm (He et al., 1987; Bradley et al., 1991). Así mismo, la inactivación del virus mediante tratamiento con cloroformo indica que el virión está formado por una cubierta o envoltura de naturaleza lipídica (Feinstone et al., 1983, Bradley et al., 1991). La densidad de la partícula viral, determinada por gradientes de sacarosa, es bastante baja (1,08 a 1,11 g/ml) y similar a la reportada para los *Pestivirus*. Esta baja densidad se atribuye principalmente al alto grado de glicosilación reportado para las glicoproteínas que



conforman la membrana externa de la envoltura viral (Miyamoto et al., 1992). El genoma del VHC está constituido por un ARN de cadena sencilla, con una longitud aproximada de 9.600 nucleótidos. Al igual que otras especies virales relacionadas, el genoma viral se mantiene en estrecha interacción con proteínas específicas que en conjunto conforman la llamada nucleocápside viral. La nucleocápside está a su vez rodeada por la envoltura viral formada por dos polipéptidos de 33 y 72 kilodaltons (KDa) de peso molecular. Así mismo, el virión contiene una serie de proteínas no estructurales involucradas en los procesos replicativos del virus (Hijikata et al., 1993a). En la figura 1 se presenta un esquema general de las características estructurales del VHC.

Organización del Genoma

Como se mencionó anteriormente, el genoma del VHC está conformado por una molécula de ARN de cadena sencilla con un tamaño estimado de 9.600 nucleótidos (Choo et al., 1989; van Doorn, 1994, Reed and Rice, 1999). El sentido o polaridad de esta molécula de ARN es positivo, es decir, el genoma sirve directamente como ARN mensajero para el proceso de traducción de las proteínas virales llevado a cabo por la maquinaria ribosomal (Choo et al., 1989; van Doorn, 1994, Reed y Rice, 1999). Estructuralmente, el genoma del VHC se organiza de manera similar a lo descrito para los géneros *Flavivirus* y *Pestivirus*, ubicándose las regiones codificantes para las proteínas estructurales hacia el extremo 5' del genoma y las regiones codificantes para las proteínas no estructurales hacia el extremo 3' (Choo et al., 1991, van Doorn, 1994, Reed y Rice, 1999). Adicionalmente, el genoma del VHC presenta hacia sus extremos 5' y 3' regiones no codificantes cuyas funciones comienzan a ser dilucidadas sólo recientemente. El análisis de la secuencia nucleotídica del ARN viral ha permitido establecer que este contiene

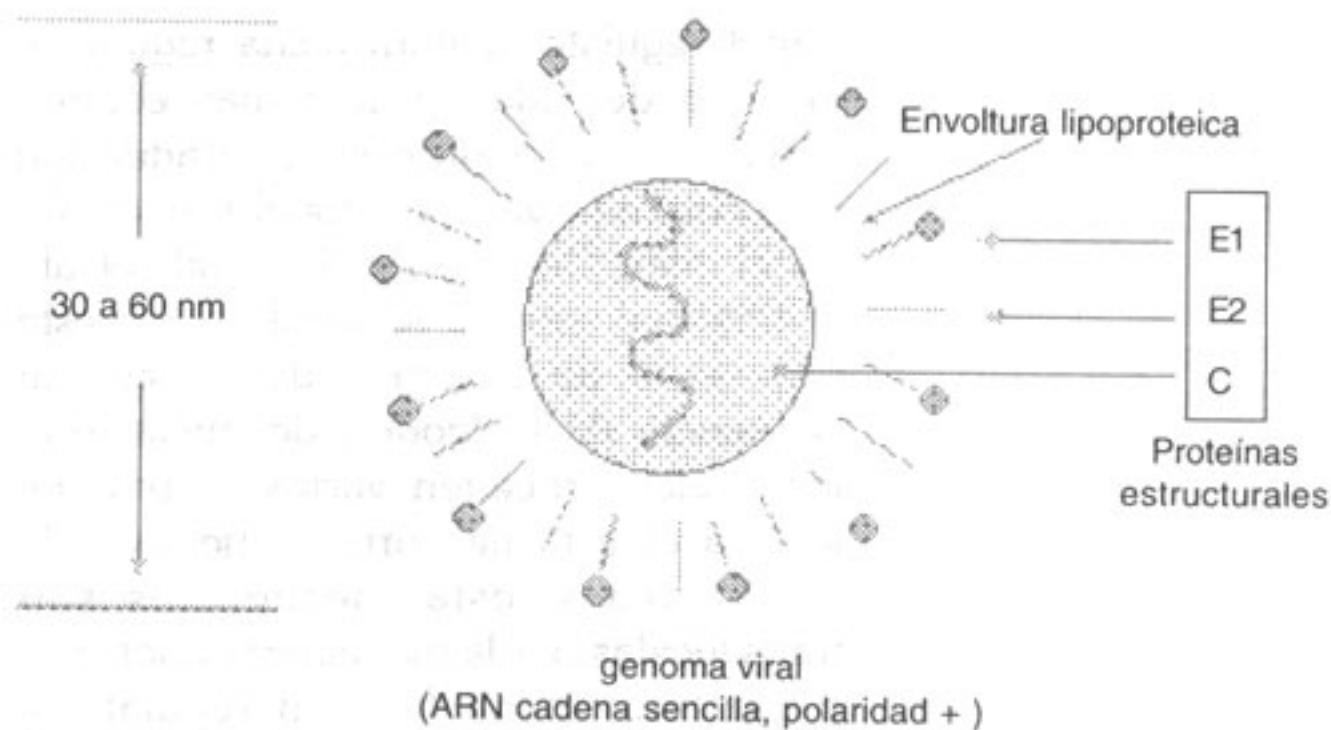


Figura 1
Diagrama esquemático de la estructura del Virus de Hepatitis C

un sólo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de unos 3010 (Choo et al., 1991) a 3033 aminoácidos (Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991). Se postula que dicha poliproteína es digerida proteolíticamente por enzimas celulares y virales a través de eventos poco conocidos, generándose de esta forma los diferentes polipéptidos estructurales y no estructurales que conforman el virión (Houghton et al., 1991; van Doorn, 1994; Reed y Rice, 1999). El modo de organización del VHC así como los productos virales codificados por el mismo se ilustran en la figura 2.

A continuación se discute con más detalle los aspectos estructurales y funcionales para cada una de las regiones del genoma del VHC.

región 5' no codificante

Hacia el extremo 5' del genoma del VHC y precediendo la secuencia que codifica para la poliproteína viral, se localiza una pequeña región de unos 324 a 341 nucleótidos de longitud, designada como región 5' no codificante (5' NC). El análisis comparativo de este segmento nucleotídico entre distintos aislados virales ha permitido establecer que esta representa la región más conservada en el genoma del VHC (Choo et al., 1989; Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991; Okamoto et al., 1990 a, b; Han et al., 1991). Esta característica sugiere un importante

papel regulatorio para dicha región en el ciclo de vida viral, y más específicamente en el proceso de traducción de proteínas virales (Houghton et al., 1991, van Doorn, 1994; Smith et al., 1995). Así mismo, se localizan en este segmento de 2 a 5 codones con la secuencia AUG (codón de iniciación), los cuales preceden varios marcos de lectura abierta de corta secuencia. No está claro si estas secuencias son transducidas por la maquinaria ribosomal o ejercen alguna función regulatoria como parte del ciclo replicativo natural del virus. La evidencia acumulada hasta el presente parece indicar que tales marcos de lectura no ejercen alguna función importante en dicho proceso replicativo (Smith et al., 1995).

El alto grado de conservación de la región 5' NC sugiere que dicha secuencia debe ejercer un rol importante en el ciclo de vida replicativo del virus. Este aspecto funcional ha sido dilucidado solo recientemente y parecer estar estrechamente relacionado con la estructura secundaria descrita para dicha región genómica. Análisis comparativos con regiones homólogas presentes en el género *Pestivirus* así como estudios de mapeo de sitios sensibles a la digestión con ribonucleasas, han llevado a proponer que la región 5' NC se organiza bajo la forma de una estructura del tipo tallo y lazo ("stem loop") localizada entre los nucleótidos -208 y -58 del genoma, presentando dicha región igualmente varias ramas laterales de longitud variable (Brown et al., 1992; Smith et al., 1995). Desde el punto de vista funcional, se postula que dicha estructura de tallo y lazo representa un sitio de entrada interno para el ribosoma ("Internal Ribosome Entry Site, IRES") por lo que resulta fundamental para la fase inicial del proceso de traducción de proteínas virales (Brown et al., 1992, Wang et al., 1993, 1994). Este tipo de mecanismo presenta características similares al descrito para distintos géneros virales de la familia *Picornaviridae* (Pelletier y Sonenberg, 1988; Jang et al., 1989).

De manera más específica, se postula que el proceso de traducción de proteínas se iniciaría en una secuencia AUG localizada internamente en el genoma viral, a varios nucleótidos del extremo 5' terminal, siendo controlado dicho evento por la secuencia "IRES" que se localiza en la región 5' NC (Wang et al., 1993, 1994). Dicho mecanismo tan particular difiere del modelo clásico de "scanning" o barrido ribosomal en el cual el proceso de traducción es iniciado a partir del primer codón AUG próximo al extremo 5' terminal del ARN mensajero.

Un aspecto que aún no está claro en el evento inicial de la traducción de proteínas del VHC se refiere a la posible participación de factores proteicos específicos que interaccionarían con la estructura de tallo y lazo de la región 5' NC. Algunos estudios señalan la capacidad de unión de ciertas proteínas con dicha región genómica, entre las que se incluyen, la proteína de unión a residuos de polipirimidina (PTB), la proteína heterogénea nuclear L y otra serie de polipéptidos de 25 KD de peso molecular aún no caracterizados (revisado en Reed y Rice, 1999). Queda por establecerse el papel que tales factores juegan en el control de la traducción y/o transcripción del genoma del VHC.

región 3' no codificante

Al igual que lo reportado para la región 5' terminal, hacia el extremo 3' del genoma del VHC se localiza una secuencia no codificante que, dependiendo del aislado viral analizado, presenta una longitud que varía entre los 27 y 55 nucleótidos (Choo et al., 1989; Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991). Se ha sugerido que dicha región contiene secuencias repetidas del nucleósido adenosina (poli rA). Tal afirmación se basa en los estudios iniciales realizados por Choo y colaboradores, los cuales reportaban la capacidad que tenía el ARN viral de unirse a columnas de Oligo dT celulosa (Choo et al., 1989). El análisis detallado



de este primer aislado viral (HCV-1) permitió identificar un segmento de poli(rA) en posición posterior («downstream») a una secuencia no codificante de 27 nucleótidos localizada en la región 3' del genoma (Han et al., 1991). La presencia de este segmento de poli(rA), sin embargo, no parece ser una característica común entre todos los aislados virales hasta ahora identificados. Así por ejemplo, en aislados provenientes del Japón se identifican hacia el extremo 3' secuencias hopoliméricas de poli U (Kato et al., 1990; Takamizawa et al., 1991). Estudios recientemente realizados han permitido caracterizar con más detalle la región 3' no codificante del VHC llegando a proponer, inclusive, un posible papel funcional para dicha región en el ciclo replicativo viral (Han et al., 1992, Kolykhalov et al., 1996). Así, se plantea que este segmento estaría constituido por tres elementos principales representados por a) una secuencia nucleotídica de gran variabilidad entre los distintos aislados virales, b) una secuencia polipirimidínica constituida principalmente por residuos de Uridina con interposición de residuos de citosina y c) una secuencia altamente conservada de aproximadamente 98 bases específica para el VHC (Han et al., 1992, Kolykhalov et al., 1996). Se postula que esta última región genera una estructura secundaria del tipo tallo y lazo («stem loop») que probablemente resulta fundamental para el inicio del proceso de replicación viral (Kolykhalov et al., 1996).

Está claro que las regiones 5' y 3' no codificantes del genoma del VHC cumplen un rol importante en el ciclo replicativo viral. Sin embargo, se requieren de estudios más detallados para esclarecer su verdadero papel en los procesos de transcripción y traducción del VHC.

región codificante

Al igual que lo descrito para los géneros *Flavivirus* y *Pestivirus*, el genoma del VHC codifica para una poliproteína de

aproximadamente 3.010 a 3.033 aminoácidos que sirve de precursor a los distintos polipéptidos estructurales y no estructurales que conforman el virión. Esta poliproteína y los polipéptidos que de ella se derivan son procesados de manera co-traducciona y post-traducciona, por la acción combinada de enzimas celulares y virales. Las proteínas estructurales se localizan hacia el extremo N-terminal de la poliproteína mientras que las no estructurales hacia el extremo C-terminal (figura 2). Hasta el presente, ninguno de estos polipéptidos ha podido ser identificado y caracterizado en individuos infectados por el virus y su estudio a partir de sistemas de cultivo virales no ha sido posible. Ello ha motivado a que se empleen sistemas de expresión o traducción «in vitro» de algunos de los genes del VHC, utilizando para tal fin, secuencias clonadas del ARN viral. Mediante esta estrategia no sólo se han podido identificar y caracterizar las proteínas estructurales y no estructurales del virus, sino también se han analizado los mecanismos de generación y procesamiento de tales polipéptidos. Así por ejemplo, se sabe que en el procesamiento de las proteínas estructurales participa una enzima de origen celular denominada «peptidasa señal» o «signalasa», mientras que para la generación de los distintos polipéptidos no estructurales se requiere de la actividad combinada de al menos dos proteasas virales codificadas en la misma región no estructural del genoma viral (Matsuura et al., 1994, Reed y Rice, 1999). Así mismo, se han identificado claramente los sitios de corte para cada una de estas proteasas en la poliproteína viral (figura 2) (Hijikata et al., 1991, 1993 a y b).

El grupo de proteínas estructurales del VHC está conformado por un polipéptido de aproximadamente 22 KDa de peso molecular conocido como proteína de la nucleocápside ó «core» y dos glicoproteínas de la envoltura de 33 KDa (E1) y 72 KDa (E2) respectivamente (figura 2). Todos estos polipéptidos son



Figura 2
Organización
del genoma del Virus
de Hepatitis C

procesados a partir de la región N-terminal de la poliproteína por la acción de una enzima petidasa residente en el lumen del retículo endoplásmico (van Doorn, 1994; Matsuura et al., 1994, Reed y Rice, 1999). La proteína de la nucleocápside, p22, es un polipéptido rico en residuos de arginina y lisina los cuales representan el 23,5% del contenido total de aminoácidos. Tales residuos están localizados principalmente hacia la región N-terminal de la proteína. Esta composición característica de aminoácidos confiere a la proteína de la cápside propiedades físico-químicas que permiten su interacción con el ARN genómico, generando así la nucleocápside viral. El extremo C-terminal de la p22 se caracteriza por la presencia de dominios aminoacídicos altamente hidrofóbicos que determinan que la proteína sea expresada en el citoplasma de células transfectadas con este gen. La delección de estos dominios hidrofóbicos provoca la síntesis de una proteína truncada que es translocada al nucleo celular. Se piensa que este polipéptido truncado, de aproximadamente 16 KDa de peso molecular, podría representar al producto maduro de la cápside a nivel nuclear (Matsuura et al., 1994). Así mismo, se han identificado en dicha proteína un grupo de aminoácidos básicos con la secuencia

PRRGPR, que pudieran ejercer un papel importante en el translocamiento de este polipéptido desde el citoplasma al nucleo celular. Este mecanismo de biogénesis para la proteína de la cápside se asemeja bastante a lo reportado para otro representante del género *Flavivirus* como es el caso del virus del Oeste del Nilo ("West Nile Virus") en donde el segmento hidrofóbico C-terminal de la proteína es removido por la acción de una proteasa viral (Matsuura et al., 1994).

Se han reportado diversos papeles funcionales para la proteína de la cápside entre los que se incluyen: 1) capacidad de unión al ARN, 2) formación de complejos multiméricos con otras moléculas de la cápside y la proteína de la envoltura E1 contribuyendo esto al proceso de ensamblaje del virión, 3) asociación con la subunidad ribosomal 60 S, un evento que puede estar involucrado en el proceso de decapsidación viral, como ha sido descrito para el género *Alphavirus*, 4) asociación con complejos lipídicos y apolipoproteína II, lo cual se piensa que pudiera estar relacionado con el hecho de que la cápside induce esteatosis en ratones transgénicos y 5) interacción con el receptor de linfotóxina-b y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF α), dos miembros de la familia de receptores de TNF involucrados en la respuesta inmune y cuya actividad pudiera ser modulada por la infección del VHC (Reed y Rice, 1999).

El segundo grupo de proteínas estructurales del VHC corresponden a los polipéptidos de la envoltura E1 (gp31) y E2 (gp70), codificados por genes que se localizan en posición posterior ("downstream") a la región de la cápside (Figura 2). Ambas glicoproteínas están glicosiladas en aproximadamente 5 (E1) y 11 (E2) residuos de asparagina distribuidos a lo largo de la secuencia polipeptídica. Se piensa que este alto grado de glicosilación es la causa del mayor tamaño molecular reportado para ambos polipéptidos cuando son anali-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología molecular
del virus
de Hepatitis C

zados electroforéticamente (Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). E1 y E2 presentan su extremo carboxilo terminal insertado en la membrana del retículo endoplásmico mientras que el resto de la cadena polipeptídica está traslocada hacia el lumen de dicho organelo. Ambas polipéptidos parecen formar complejos heterodiméricos E1-E2 a través de enlaces disulfuro e interacciones no covalentes (Reed y Rice, 1999). Estudios recientes señalan la característica que tiene el extremo C-terminal de E2 de funcionar como una señal de retención en el retículo endoplásmico. Esta señal posiblemente es enmascarada durante el proceso de ensamblaje de la partícula viral, permitiéndose así el egreso del virión a través de la vía secretoria de la célula (Cocquerel et al., 1998).

La glicoproteína E2 presenta dos características adicionales que han sido motivo de su estudio exhaustivo. Una de ellas se refiere al alto grado de variabilidad que dicho polipéptido exhibe hacia la región N-terminal, también conocida como región hipervariable 1 o HVR1 y que es responsable de la generación de mutantes de escape bajo la presión selectiva de la respuesta inmune (Ogata et al., 1991, Kurosaki et al., 1993). La otra característica de E2 se refiere a su capacidad de interactuar con CD 81, un polipéptido perteneciente a la familia de las tetraspaninas que es expresado en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares, incluyendo las células hepáticas y leucocitarias (Pileri et al., 1998). Dicha interacción podría representar un primer evento en el proceso de unión del virus con la eventual infección de la célula blanco. Este representa un fenómeno poco conocido hasta el presente que requiere de estudios adicionales a fin de esclarecer este importante aspecto en la biología del VHC.

Recientemente, se ha identificado hacia la región genómica que codifica para las proteínas estructurales del VHC, un

cuarto polipéptido de 7 KDa de peso molecular conocido como proteína p7, el cual estaría localizado específicamente entre las proteínas E2 y NS2 (Lin et al., 1994a). No se sabe con exactitud si este polipéptido representa una proteína estructural del virión o está relacionado funcionalmente con alguna proteína no estructural como NS2 por lo que su papel es aún desconocido. Por otro lado, algunas evidencias experimentales sugieren que el procesamiento proteolítico de p7 por proteasas celulares parece ser incompleto ya que el mismo ha sido identificado en asociación con la proteína E2 bajo la forma de un complejo E2-p7 (Lin et al., 1994a).

Utilizando la misma estrategia de expresión «in vitro» de segmentos clonados del genoma del VHC, se han podido identificar y estudiar las proteínas de la región no estructural del virus (figura 2). Así, dos polipéptidos de 24 y 70 KDa han sido identificados en posición posterior («downstream») a la región codogénica de E2 (gp70). Por su similitud con polipéptidos no estructurales del género *Flavivirus*, estas proteínas han sido designadas NS2 y NS3 respectivamente (van Doorn, 1994, Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). NS2 representa una proteína altamente hidrofóbica de 24 KDa de peso molecular, que ha sido localizada principalmente en la membrana celular (Choo et al., 1991). Mas recientemente se ha demostrado que NS2 es en realidad una proteína transmembranal con su porción C-terminal traslocada en el lumen de retículo endoplásmico y la región N-terminal localizada en el citosol (Santolini et al., 1995). La función de esta proteína no es del todo conocida, pero se piensa que pudiera funcionar como un «puente estructural» entre las glicoproteínas que conforman la envoltura y la nucleocápside viral durante el proceso de ensamblaje del virión (Santolini et al., 1995). Por otro lado, NS2 presenta hacia su extremo C-terminal un dominio funcional que comparte con la proteína NS3 y que

corresponde a una actividad de metaloproteínasa dependiente de Zinc (Hijikata et al., 1993 a y b, Grakoui et al., 1993b). La estructura conformacional de este dominio NS2-NS3 parece ser crítica para su actividad catalítica.

La proteína NS3 (p70) representa uno de los polipéptidos más importantes desde el punto de vista funcional para el VHC, en virtud de la serie de actividades enzimáticas que se han descrito para la misma. En primer término, esta proteína presenta la actividad de enlazadora de nucleótidos trifosfatos (NTPasa) y de ARN helicasa que se presumen están involucradas en el desenrollamiento del ARN genómico viral para su replicación y de las estructuras de ARN de doble cadena que resultan de la síntesis de la cadena complementaria al ARN genómico (van Doorn, 1994, Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). Así mismo, NS3 representa una proteasa serínica que está involucrada en el procesamiento de las proteínas no estructurales a partir del precursor poliproteico del virus (Choo et al., 1991, Hijikata et al., 1993a). En este sentido, dos actividades de proteasas claramente distinguibles desde el punto de vista estructural y funcional han sido caracterizadas para este polipéptido. La primera de ellas corresponde a la proteasa serínica localizada hacia la región N-terminal de NS3 que actúa desde el extremo C-terminal cortando en los sitios de unión para las proteínas no estructurales definidos como NS3-NS4a, NS4a-NS4b, NS4b-NS5a, NS5a-NS5b (Grakoui et al., 1993a; Bartenschlager et al., 1994; Lin et al., 1994b). La otra actividad de proteasa comprende parte del extremo C-terminal de NS2 y se expande hasta la región que contiene el dominio catalítico ubicado en la misma proteína NS3. Como se mencionó anteriormente, esta actividad catalítica parece depender de Zinc y es responsable del desdoblamiento de la porción N-terminal de NS3 (Grakoui et al., 1993b; Hijikata et al., 1993). Recientemente se ha sugerido que NS3 pudiera igualmente ejercer una

función regulatoria de la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), modulando de esta forma ciertos eventos de transducción de señales intracelulares. Más específicamente, dicha proteína podría actuar como un factor inhibitor de la actividad de PKA controlando los procesos de proliferación celular (Borowski et al., 1996). Se requiere, sin embargo, de un mayor número de estudios para confirmar dicho papel funcional. En resumen, se describen para la proteína NS3 tres actividades enzimáticas: proteasa serínica dependiente de Zinc, enzima enlazadora de nucleótidos trifosfatos (NTPasa) y ARN helicasa. Una descripción de los sitios de corte para esta enzima en la poliproteína viral se señalan en la figura 2.

La región NS4 del genoma del VHC se divide en dos subregiones designadas NS4A y NS4B cuyos productos presentan un tamaño molecular de 4 y 30 KDa respectivamente. Poco es conocido acerca de las funciones de estos dos polipéptidos. NS4A es una proteína hidrofóbica de 54 aminoácidos que parece actuar como co-factor proteico para la actividad de proteasa serínica asociada a NS3, facilitando el anclaje de esta proteína a la membrana del retículo endoplasmático (Hijikata et al., 1993b). A su vez, NS4A estabiliza el producto del polipéptido NS3 e incrementa la eficiencia de corte de la enzima en los sitios NS4b/NS5a (Sato et al., 1995). Adicionalmente, se postula que NS4A interacciona con NS5A regulando el proceso de fosforilación de esta proteína (Tanji et al. 1995). En lo que respecta al polipéptido NS4B, poco es conocido en relación a sus características funcionales pero se piensa que es una proteína hidrofóbica asociada a la membrana plasmática que pudiera formar parte del complejo de la replicasa viral (Hijikata et al., 1993b).

La región NS5 del genoma del VHC contiene la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN necesaria para la replicación viral. Esta región también ha



sido subdividida en las subregiones NS5A y NS5B, las cuales codifican para productos de 58 y 68 KDa de peso molecular respectivamente. Para la región NS5A se han identificado dos fosfoproteínas, p56 y p58, que muestran distinto grado de fosforilación, siendo p58 mayormente fosforilada que p56. Análisis detallados de estos productos han permitido establecer que ambas fosfoproteínas corresponden a un mismo polipéptido de 49 KDa de peso molecular, el cual es fosforilado de manera diferencial durante eventos post-traduccionales (Kaneko et al., 1994). Así mismo, la hiperfosforilación de p58 parece ser dependiente de la presencia de la proteína NS4A.

Aunque la función del producto de la región NS5A no es del todo conocida, se postula que su actividad pudiera estar modulada por eventos de hipo o hiper fosforilación de dicha proteína catalizados por una cinasa de origen celular (Kaneko et al., 1994). Adicionalmente, se ha sugerido que esta actividad de proteína cinasa pudiera estar asociada a la misma proteína NS5A aunque las evidencias que se tienen hasta el presente no son concluyentes (Reed y Rice, 1999). La proteína NS5B contiene la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN como queda evidenciado por la presencia de la secuencia motivo Gly-Asp-Asp en este polipéptido que es característica de muchas polimerasas (Grakoui et al., 1993; Argos, 1988). Otras secuencias motivo de importancia funcional para este tipo de replicasas han sido también identificados en la proteína NS5B (Argos, 1988; Beach y Bradley, 1990; Grakoui et al., 1993). Se piensa que el proceso de replicación del VHC está gobernado por un complejo proteico en el que participarían de manera coordinada los polipéptidos NS4B, NS5A y NS5B. A su vez, la asociación entre estos tres polipéptidos estaría mediada por la interacción con las proteínas

NS3 y NS4A (Hijikata et al., 1993b). Estos representan aspectos funcionales que actualmente se encuentran en etapa de investigación.

Replicación del VHC

Hasta el presente poco es conocido en relación al mecanismo de replicación del VHC. En virtud de que dicho virus es considerado un miembro de la familia *Flaviviridae*, se piensa que su replicación es llevada a cabo a través de eventos que involucran la generación de moléculas intermediarias de ARN con polaridad inversa al ARN genómico, siendo crítico en dicho proceso de replicación la actividad de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (Fong et al., 1991; van Doorn, 1994, Reed y Rice, 1999). El abordaje experimental de este aspecto de la biología molecular del VHC se ha visto parcialmente limitado, debido a la falta de sistemas de cultivo celulares que soporten de manera eficiente la replicación del virus y a los bajos niveles de ARN viral identificados tanto en el tejido hepático como en muestras de suero. Con la incorporación de metodologías altamente sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) así como variantes de la técnica de hibridación *in situ*, este problema ha sido parcialmente subsanado permitiéndose así identificar cantidades verdaderamente ínfimas de ARN viral en cualquier tipo de tejido. De esta manera, diversos estudios han reportado secuencias de ARN del VHC con polaridad inversa al ARN genómico tanto en tejido hepático como en células leucocitarias humanas sugiriendo ello la presencia de intermediarios replicativos del virus en dichos compartimientos celulares (Fong et al., 1991, Takehara et al., 1992, Müller et al., 1993, Lanford et al., 1994, Cribier et al., 1995, Corado et al., 1997, Toro et al., 1998).

Como se mencionó anteriormente, por analogía con otros miembros de la familia *Flaviviridae*, se cree que la replicación del VHC es llevada a cabo

en el citoplasma de la célula hospedera. El primer evento en el proceso de infección es la interacción del virus con la membrana plasmática, un mecanismo poco conocido hasta el presente en el que se cree participan receptores celulares que interaccionan de manera directa o indirecta con el virus. La evidencia experimental sugiere que tales receptores podrían estar representados por la molécula CD81 (Pileri et al., 1998) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Agnello et al., 1999). Una vez que el virus penetra a la célula a través de un proceso de endocitosis, el virión es decapsidado en el citoplasma liberando el ARN viral, el cual es posteriormente desenrollado por la acción de la NTPasa/helicasa y transcrito por la actividad de la replicasa viral (ARN polimerasa dependiente de ARN). Este proceso genera el ARN viral de polaridad inversa (intermediario replicativo) el cual sirve de molde para la generación de múltiples copias del ARN genómico, de nuevo, a través de la actividad de la replicasa viral. Finalmente se lleva a cabo el proceso de ensamblaje de las nuevas copias del ARN viral con las proteínas estructurales y no estructurales recién sintetizadas a nivel del retículo endoplásmico rugoso. Este proceso de síntesis, ensamblaje y secreción del virión se realiza a través de la vía secretora de la célula hospedera (Major y Feinstone, 1997, Reed y Rice, 1999). El mismo se representa esquemáticamente en la figura 3.

Variabilidad genética del VHC

Desde su aislamiento y caracterización inicial, el VHC ha sido extensamente estudiado a nivel molecular, lográndose identificar, hasta el presente diferentes aislados virales provenientes principalmente de las regiones de Norte América, Japón y Europa (Houghton et al., 1991, van Doorn, 1994, Dusheiko y Simmonds, 1994; Simmonds, 1995). La caracterización detallada de estos aislados virales, en base a ensayos de

neutralización o las propiedades citopáticas del virus, se ha visto un tanto limitada debido a la falta de un sistema de cultivo celular capaz de mantener la replicación viral. Es así como actualmente se propone un sistema de clasificación para el VHC basado en las características estructurales del virus y específicamente, en las diferencias que, a nivel de las secuencias nucleotídicas, existen entre los distintos aislados virales. Diversas estrategias metodológicas se han desarrollado para la caracterización y clasificación de estos genotipos virales. Estos procedimientos comprenden las técnicas de doble PCR, empleando oligonucleótidos tipo específicos, PCR combinada con análisis de polimorfismo en los fragmentos de restricción o RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") y secuenciación directa del genoma viral (Okamoto et al., 1992 b; Simmonds, 1993, Dusheiko y Simmonds, 1994). Con la aplicación de esta serie de estrategias metodológicas se han propuesto distintos sistemas de clasificación para los genotipos del VHC. A fin de establecer un consenso se ha llegado a proponer un sistema único de clasificación que agrupa a todas las variantes virales en 6 genotipos principales con 12 subtipos o subgenotipos (Dusheiko y Simmonds, 1994). Los tipos o genotipos principales son designados con números arábigos del 1 al 6 y los subtipos o subgenotipos con letras minúsculas, a, b, c, etc. en orden de descubrimiento. Se piensa que este representa un sistema de clasificación más coherente y uniforme, el cual se irá definiendo con mayor precisión en la medida que se obtenga mayor información sobre las secuencias nucleotídicas de los aislados virales hasta ahora identificados, así como de los que están por identificarse (Dusheiko y Simmonds, 1994).

Algunas de las variantes del VHC hasta ahora identificadas muestran un amplio patrón de distribución geográfica, como es el caso del genotipo 1, mientras que



otras se circunscriben exclusivamente a ciertas regiones del mundo. Así por ejemplo, en algunas regiones de Estados Unidos y Europa Occidental se reporta el predominio de los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b y 3a; en Japón de los genotipos 1b, 2a y 2b, mientras que en la región de África del Sur el genotipo 5a parece ser el predominante (Dusheiko y Simmonds, 1994)

En la actualidad, la identificación de genotipos virales y su relación con las características clínico-patológicas del individuo infectado representa una de las áreas de investigación más interesantes en la infección por el VHC. Algunos estudios sugieren la existencia de una relación entre el genotipo viral y el grado de severidad de la enfermedad hepática, así como su respuesta a tratamientos antivirales (Dusheiko y Simmonds, 1994). Así por ejemplo, un mayor número de casos de cirrosis parece asociado a la infección por el genotipo viral 1 y más específicamente el subtipo 1b. Estos hallazgos, sin embargo, deben ser considerados con precaución ya que el genotipo 1 es igualmente el que se encuentra mayormente distribuido a nivel mundial (Okamoto y Mishiro, 1994). Otro aspecto en este modelo de infección que parece estar relacionado con las características del genotipo viral se refiere a la respuesta diferencial que muestran individuos infectados frente a drogas anti-virales como el interferón alfa. Al parecer, esta respuesta no sólo es dependiente del grado de viremia del paciente sino también del genotipo viral predominante en la infección (Yoshioka et al., 1992 Gerolami et al., 1993). En los pacientes infectados con el genotipo 1 existe una respuesta al interferón alfa de corta duración, comparada con la respuesta de pacientes infectados con los genotipos 2 y 3 la cual es más prolongada (Yoshioka et al., 1992; Okamoto y Mishiro, 1994; Iino et al., 1994). Esto parece indicar que entre estas tres variantes virales, el genotipo 1 resulta ser el menos sensible al

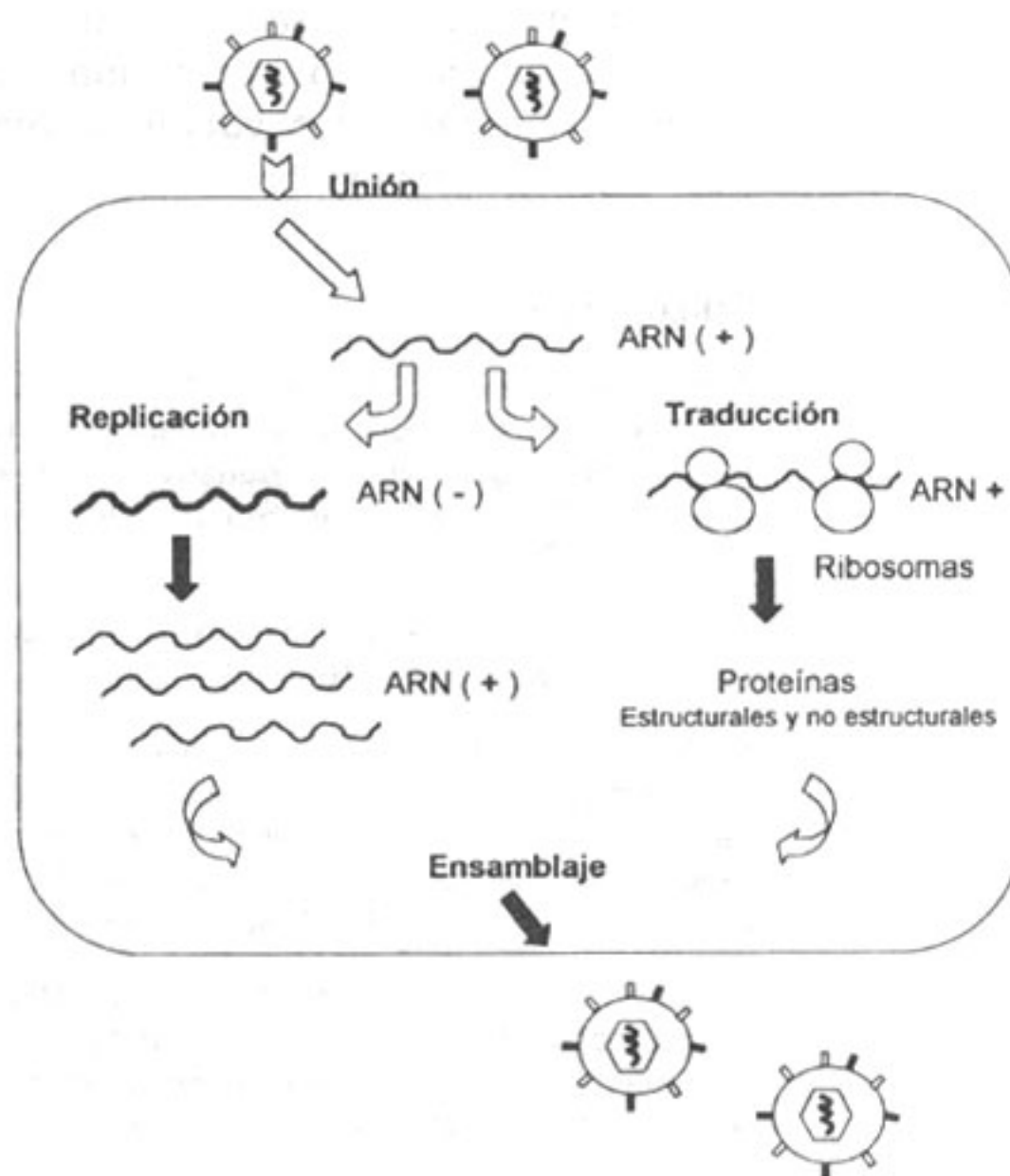


Figura 3

Diagrama que representa el modo de replicación que se propone para el VHC.

tratamiento con Interferón. Esta serie de observaciones representan aspectos muy interesantes en la biología del VHC que requieren de mayor investigación, lo cual será fundamental para el mejor entendimiento de la fisiopatología de la infección, así como para el establecimiento de estrategias terapéuticas más efectivas y seguras para el tratamiento y prevención de esta infección viral.

Consideraciones finales

Actualmente, el establecimiento de sistemas de cultivo celulares que soporten adecuadamente la replicación del VHC representa uno de los principales objetivos en el estudio de la biología molecular de este virus. Tales sistemas permitirán no solo evaluar en detalle las características funcionales de los distintos productos virales sino también analizar los mecanismos y procesos moleculares que regulan la actividad replicativa del virus. Así mismo, se podrá estudiar el efecto y mecanismo de acción de diferentes agentes anti-virales y se permitirá

evaluar, mediante ensayos de neutralización *in vitro*, la efectividad de posibles candidatos a vacunas como estrategia de prevención.

BIBLIOGRAFÍA

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. y Zhang QX.: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:12766-12771.
- Argos, P.: A sequence motif in many polymerases. *Nuc. Acids. Res.* 1988; 16: 9909-9916.
- Bartenschlager, R. L., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. y Jacobsen, H.: Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J. Virol.* 1993; 67: 3835-3844.
- Bartenschlager, R. L., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. y Jacobsen, H.: Kinetic and structural analysis of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* 1994; 68: 5045-5055.
- Beach, M. J. y Bradley, D. W.: Putative nonstructural region of hepatitis C virus. En *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Hollinger, F. B., Lemon, S. M. and Margolis, H. S. (Editores). Baltimore. Williams and Wilkins. 1990; pp 376-381.
- Borowski, P., Heiland, M., Oehlmann, K., Becker, B., Kornetzky, L., Freucht, H. y col. Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by camp-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 1996; 237: 611-618.
- Bradley, D. W., McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphrey, C. y Cook, E. H. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J. Med. Virol.* 1991; 34: 26-28.
- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L.-H. y Lemon, S. M. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nuc. Acids. Res.* 1992; 20: 5041-5045.
- Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. y Houghton, M. Isolation of a cDNA derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989; 244: 359-362.
- Choo, Q.-L., Weiner, A.J., Overby, L.R., Kuo, G., Houghton, M., y Bradley, D.W.: Hepatitis C Virus: the major causative agent of viral non-A, non-B, hepatitis. *Br. Med. Bull.* 1990; 46: 423-421.
- Choo, Q.-L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Gallegos, D., Coit, D., y cols.: Genetic organization and diversity of the Hepatitis C Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 2451-2455.
- Cocquerel, L., Meunier, J.-C., Pillez, A., Wychowski, C., Dubuisson, J.: A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J. Virol.* 1998; 72: 2183-2191.
- Corado, J. Toro, F.I.; Rivera, H., Bianco N.E.; Deibis, L. J. B., De Sanctis: Impairment of NK cytotoxic activity in hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 109: 451-457.
- Cribier, B., Schmitt, C., Bingen, A., Kirn, A. y Keller, F.: *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 1995; 76: 2485-2491.
- Dusheiko, G. y Simmonds, P.: Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *Journal of Viral Hepatitis.* 1994; 1: 3-15.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J. y Holland, P.V.: Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* 1975; 292: 767-770.
- Feinstone, S.M., Mihalik, K.B., Kaimura, T., Alter, H.J., London, W. T. y Purcell, R. H.: Inactivation of hepatitis B virus and Non-A, Non-B hepatitis by Chloroform. *Infect. Immun.* 1983; 41: 816-821.
- Fong, T.-L., Shindo, M., Feinstone, S.M., Hoofnagle, J.H. y Di Bisceglie, A.M.: Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J. Clin. Inv.* 1991; 88: 1058-1060.
- Gerolami, V., P. Halfon, M. Bourliere, H. Khiri, P. Reynier, P. P. Garnier, I. y cols.: Hepatitis C Virus Genotypes in Chronic Hepatitis and Response to Interferon- α Therapy. *J. Infect. Dis.* 1993; 168: 1328-1329.
- Grakoui, A., Wychowsky, C., Lin, C., Feinstone, S. M. Y Rice, C. M.: Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* 1993; 67: 1385-1395.
- Han, J.H., Shyamala, V., Richman, K.H., Brauer, M.J., Irvine, B., Urdea, M.S., y col.: Characterization of the terminal region of the hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences of the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 1711-1715.
- Han, J.H. y Houghton, M.: Group specific sequences and conserved secondary structures at the 3' end of HCV genome and its implication for viral replication. *Nuc. Acids. Res.* 1992; 20: 3520.
- He, L.-F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H.J. y Purcell, R.H.: Determining the size of Non-A,



- Non-B hepatitis virus by filtration. *J. Infect. Dis.* 1987; 156: 636-640.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., y Shimothono, K.: Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 5547-5551.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N. Kato, N. y cols.: Two distinct proteinase activities required for the procesing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* 1993a; 67: 4665-4675.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, y cols.: Proteolytic processing and membrane association of putative non-structural proteins of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993b; 90: 107773-107777.
- Lino, S., Hino, K., Yasuda, K.: Current state of interferon therapy for chronic hepatitis C. *Intervirology.* 1994; 37: 87-100.
- Jang, S. K., Davies, M. V., Kaufmen, R.J., y Wimmer, E.: Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' non-stranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J. Virol.* 1989; 63: 1651-1660.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K. y Shimotohno, K.: Production of two phosphoprotein from the NS5 region of the hepatitis C viral genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 205: 320-326.
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., y col.: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome isolated from Japanese patients with Non-A, Non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 9524-9528.
- Kiyosawa, K. y Tanaka, E.: GB Virus C/ Hepatitis G virus. *Intervirology.* 1999; 42: 185-195.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. y Rice, C. M.: Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* 1996; 70: 3363-3371.
- Kuo, G., Choo, Q.-L., Alter, H.J., Gitnick, G.I., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T. et al.: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989; 244: 362-364.
- Kurosaki, M., Enomoto, N., Marumo, F. y Sato, C.: Rapid sequence variantion of the hyper-variable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology.* 1993; 18: 1293-1299.
- Lanford, L. E., Sureau, C., Jacob, J. R., White, R. y Fuerst, T. R.: Demostration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology.* 1994; 606-614.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragal, B. M., McCourt, D. W. y Rice, C. M.: Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: Identification of p7 and two distinct E2 products with different C termini. *J. Virol.* 1994a; 68: 5063-5073.
- Lin, C., Pragal, B. M., Grakoui, A., Xu, J., y Rice, C. M.: Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: Trans-cleavage requirement and processing kinetics. *J. Virol.* 1994b; 68: 8147-8157.
- Major, M. E. y Feinstone, S. M.: *The Molecular Virology of Hepatitis C Virus.* *Hepatology.* 1997; 25: 1527-1538.
- Matsuura, Y., Harada T., Makimura, M., Sato, M., Aizaki, H., Suzuki, T., y col.: Characterization of HCV structural proteins expressed in various animals cells. *Intervirology.* 1994; 37:114-118.
- Miller, R.H., y Purcell, R.H.: Hepatitis C Virus share aminoacid sequence similarity with Pestivirus and Flavivirus as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 2057- 2061.
- Miyamoto, H., Okamoto, H., Sato, K., Tanaka, T., Mishiro, S.: Extraordinary low density of hepatitis C virus estimated by sucrose gradient centrifugation and the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 715-718.
- Miyamura, T.; Saito, I.; Katayama, T.; Kikuchi, S.; Tateda, A.; y cols. et al. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA: aplication to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 983-987.
- Müller, H. M., Pfaff, E., Goeser, T. Kallinowski, B., Solbach, C. y Theilmann, L.: Peripheral Blood Leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 669-676.
- Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H. Y Purcell, R. H.: Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 3392-3396.
- Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Yotsumoto, T., Tamaka, T., Yoshizawa, H. y cols.: The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn. J. Exp. Med.* 1990; 60: 215-222.
- Okamoto, H., Sugiyama, Y., Okada, S., Kurai, K., Akahane, Y., Sugai, Y. y cols.: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 673-679.
- Okamoto, H. y Mishiro, S.: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Intervirology.* 1994; 37: 68-76.
- Pelletier, J., y Sonenberg. Internal initiation of translation of eukaryotic directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature (London).* 1988; 334: 320-325.

- Pileri, P., Uematsu, Y., Compagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R. y cols. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998; 282: 938-941.
- Reed, K. E. y Rice, C. M. Overview of Hepatitis C Virus Genome Structure, Polyprotein Processing and Protein Properties. En *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Hagedorn, C.H. and Rice, C. M. editors. Springer, Berlin, 1999.
- Santolini, E., Pacini, E., Fipaldini, C., Migliaccio, G., y La Mónica, N. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J. Virol.* 1995; 69: 7461-7471.
- Satoh, S., Tanji, Y., Hijikata, M., Kimura, K. and Shimotohno, K. The N-terminal region of hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3) is essential for stable complex formation. *J. Virol.* 1995; 69: 4255-4266.
- Schiff, E. R., De Medina, M. y Khan, R. S. New perspectives in the diagnosis of Hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*. 1999; 19: 3-14.
- Simmonds, P., E. C. Holmes, T. A. Cha, S. W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. y cols. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic of the NS-5' region. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 2391-2399.
- Simmonds, P. Variability of Hepatitis C Virus. *Hepatology*. 1995; 21: 570-583.
- Smith, D. B., Mellor, J., Jarvis, L. M., Davidson, F., Kolberg, J., Urdea, M., y col. and The International HCV Collaborative Study Group. Variation of the hepatitis C virus non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *J. Gen Virol.* 1995; 76: 1749-1761.
- Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J. y cols. Structure and Organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 1991; 65: 1105-1113.
- Takehara, T., Hayashi, N., Mita, E., Hagiwara, H., Ueda, K., Katayama, K. y cols. Detection of the minus strand of Hepatitis C Virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: Implications for Hepatitis C Virus replication in infected tissue. *Hepatology*. 1992; 15: 387-390.
- Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., Shimotohno, K. Phosphorylation of hepatitis C virus encoded nonstructural protein NS5A. *J. Virol.* 1995; 69: 3980-3986.
- Toro, F. I., Conesa, A., Garcia, A., Bianco, N. E., De Sanctis, J. Increased peroxide production by polymorphonuclear cells of chronic HCV-infected patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1998; 88: 169-175.
- van Doorn, L-J. Molecular Biology of the hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* 1994; 43: 345-356.
- Wang, C., Sarnow, P. y Siddiqui, A. Translation of human hepatitis C virus in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* 1993; 67: 3338-3344.
- Wang, C., Sarnow, P., Siddiqui, A.: A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 1994; 68: 7301-7307.
- Yoshioka, K., Kakumu, S., Wakita, T., Ishikawa, T. Itoh, Y., Takayanagi, M. y cols. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology*. 1992; 16: 293-299.



MARCADORES SEROLOGICOS EN LAS HEPATITIS VIRALES

Dra. Patricia Chacón y Dr. Carlos Aponte*
Laboratorio de Programas Especiales VIH & Hepatitis.
Gerencia de Diagnóstico y Epidemiología.
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".
Apdo. 1040. Caracas-Venezuela

RESUMEN

Las hepatitis virales constituyen en su conjunto un serio problema de salud pública. Desde las primeras transfusiones sanguíneas, la transmisión de hepatitis de naturaleza viral fue un evento frecuente con un inmenso impacto en salud. Después del descubrimiento del virus de la hepatitis B (VHB), todos los donantes de sangre son tamizados para el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg). Por otro lado, este antígeno (HBsAg) en conjunto con un abanico de otros marcadores [Antígeno core (HB core), anticuerpos anti-HBV, antígeno e (HBeAg) y anticuerpos contra el antígeno e (anti-HBeAg)] asociados a la infección permite un seguimiento detallado de la evolución clínica del paciente. A partir de 1991, con el descubrimiento del genoma del virus de la Hepatitis C (VHC) y el desarrollo de test sensibles anti-VHC se permitió el diagnóstico y seguimiento de los pacientes infectados. Para el virus de la Hepatitis Delta, virus defectivo que requiere de la ayuda del VHB para replicarse, el diagnóstico se realiza mediante la detección del HDAg, así como de IgM e IgG o el ARN VHD por técnica de biología molecular. Otros dos virus implicados en hepatitis pero cuya transmisión es fecal-oral son el virus de la hepatitis A y el virus de la hepatitis E. Diversos ensayos inmunoenzimáticos y Western-blot usando proteínas recombinantes han sido desarrollados para detectar IgM e IgG contra el virus de la hepatitis E (HEV). Respecto al virus de la Hepatitis A, el diagnóstico se realiza mediante la detección de IgM anti VHA por métodos de inmunoensayo.

PALABRAS CLAVE: HEPATITIS, MARCADORES SEROLÓGICOS, DETECCIÓN, TEST SEROLÓGICOS.

ABSTRACT

Viral hepatitis infections represent a serious public health problem. Since the beginning of blood transfusions concomitant transmission of viral hepatitis has been frequent with an important impact in health. After the discovery of hepatitis B virus (HBV), donors in all countries have been screened for its surface antigen (HBsAg). This antigen is used in clinical evolution, in association with several markers, such as Core Antigen (HB core), antibody anti-HBV, e antigen (HBeAg) and antibodies against e-antigen (anti-HBeAg), implicated in infection. Since 1991, the discovery of the hepatitis C virus (HCV) genome and the development of sensitive anti-HCV assays has meant that reliable detection of persistently infected HCV patients. The Hepatitis Delta virus (HDV), a defective virus, requiring a helper function from HBV for replication, is detected using the hepatitis Delta antigen (HDAg), and/or IgM e IgG, and ARN VHD by molecular biology tools. Two viruses are transmitted via oral-fecal: Hepatitis A virus (VHA) and Hepatitis E virus (HEV). Several enzymatic immune assays (EIA) and Western blot using recombinat proteins have been developed. These assays are able to detect IgM e IgG against HEV. VHA infection is established by detecting IgM anti VHA by EIA.

KEY WORDS: HEPATITIS, DETECTION,

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 53-65

Aceptado para su publicación agosto de 2000

HEPATITIS A

El virus de la Hepatitis A (VHA) fue identificado en 1973¹. Esto permitió el desarrollo de pruebas serológicas y métodos de cultivo "in vitro", lo cual facilitó investigar la seroepidemiología, patogénesis e inmunobiología del virus. El virus de la Hepatitis A es una partícula de cadena simple de ARN con sentido positivo. Ha sido clasificado como la única especie del nuevo género, Heparnavirus, dentro de la familia Picornaviridae². El genoma del VHA es una molécula lineal de ARN de aproximadamente 7.5 kb. Como otros picornavirus el extremo 5' terminal del genoma comienza con una región no codificante (5'UTR), la cual contiene una pequeña proteína (VPg) covalentemente unida al extremo 5' terminal³ y actúa como un sitio de entrada interno al ribosoma (IRES)⁴. La región codificante del genoma consiste en un solo marco de lectura abierta de 6681 nucleótidos. Este ha sido arbitrariamente dividido en tres regiones denominadas P1, la cual codifica para 4 proteínas de la cápside (VP1 a VP4), P2 y P3, las cuales codifican las proteínas no estructurales requeridas para el procesamiento y maduración de la poliproteína, y la replicación viral⁵.

El genoma del VHA es altamente conservado, es lo que ha reportado el estudio comparativo de la secuencia nucleotídica de aislados procedentes de diferentes regiones geográficas⁶. Sin embargo, la comparación de la secuencia de ácidos nucleicos en la región alrededor de la unión VP1/2A de simios y humanos aislados de diferentes regiones ha permitido la clasificación de cepas de VHA en siete genotipos distintos (I-VII) y varios subtipos⁷. Pero a pesar de la existencia de diferentes genotipos, en los humanos existe un solo serotipo de VHA lo cual explica la protección cruzada que proporciona la inmunoglobulina humana y la vacuna inactivada de VHA contra la infección con cepas no relacionadas de VHA⁸.

Entre los virus, VHA es uno de los más resistentes a la degradación por las condiciones ambientales. Esta propiedad

es probablemente el factor que determina el mantenimiento y los brotes de VHA dentro de las poblaciones. La infección por VHA es predominantemente transmitida por la vía fecal-oral. Tiene un período de incubación de 20-45 días, con un promedio de 28 días. La duración del período de incubación podría estar inversamente relacionado con el título de VHA en el inóculo. El virus atraviesa el intestino y una vez que alcanza el hígado se replica en el hepatocito y es liberado al torrente sanguíneo (viremia). Al mismo tiempo el virus está presente en la bilis y en las heces. El contenido del virus en las heces y la viremia en sangre es máxima justo antes y poco después que se inician los trastornos de la función hepática y termina al momento en que la inmunidad humoral contra VHA es detectada^{5,6}. Casi al mismo tiempo en que se desarrollan los síntomas clínicos de la hepatitis, se pueden detectar anticuerpos del tipo IgM, IgG e IgA contra VHA, esto ocurre aproximadamente 2 días después del inicio de la enfermedad⁹. La IgM anti VHA persiste sólo de 2 a 6 meses, su detección es fácil con métodos de inmunoensayo, siendo referencia "standard" para el diagnóstico específico de VHA. La IgG anti VHA es la clase de anticuerpos que encontramos en mayor proporción durante la convalecencia y existe evidencia de que es la primera defensa contra la reinfección. Este tipo de inmunoglobulina persiste durante años⁹. La hepatitis A es subclínica o suave en niños, y en adultos, la enfermedad suele ser más severa y prolongada, con un curso bifásico o colestasis. La hepatitis fulminante es rara. Se han descrito casos de cronicidad pero no es la forma clínica usual¹⁰.

El diagnóstico se realiza mediante la detección de IgM anti VHA por métodos de inmunoensayo, esta inmunoglobulina aparece tempranamente durante la infección. La detección de IgG anti VHA se hace para determinar inmunidad por infección previa o vacunación. El aislamiento del VHA y detección de antígenos o ARN es complicado y costoso por lo que no se usa para el diagnóstico⁹.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

HEPATITIS B

El virus de la Hepatitis B (VHB) pertenece a la familia Hepadnaviridae¹¹. El virión completo del VHB (partícula de Dane) tiene un diámetro de aproximadamente 42 nm, con una capa externa o envoltura lipoprotéica que rodea la nucleocápside interna (30 – 34 nm de diámetro), la cual está formada por 180 copias de la proteína de cápside (denominada antígeno de la cápside HBcAg). La nucleocápside o core contiene el ADN genómico, la polimerasa viral, unida covalentemente al extremo 5' de la hebra negativa del ADN viral y el antígeno e de la hepatitis B (HBeAg)^{12,13,14,15,16,17,18}. El genoma del virus está formado por una molécula de ADN circular, pequeña y parcialmente de doble cadena. La cadena larga, de polaridad negativa tiene un tamaño de aproximadamente 3.2 kb, con los extremos 5' y 3' fijos, formando un círculo casi continuo, la circularidad está mantenida por puentes de hidrógeno entre los extremos cohesivos de aproximadamente 220 nucleótidos. La cadena corta de polaridad positiva tiene una longitud variable (20-80% la longitud de la cadena negativa), con un extremo 5' fijo, unido covalentemente al extremo 5' de la cadena negativa. La cadena negativa además está unida covalentemente al dominio terminal de la polimerasa viral. Los extremos terminales de ambas cadenas (extremos cohesivos) situados en los extremos 5' de cada cadena presentan una secuencia de 11 nucleótidos que se repiten directamente, conocidas como DR1 en la cadena negativa y DR2 en la cadena positiva. Dichas secuencias se encuentran implicadas en la replicación e integración del genoma del virus¹⁹.

El genoma de este virus codifica 7 proteínas estructurales, a partir de 4 marcos de lectura abierta (ORF) identificados en la cadena negativa. La síntesis de este número de proteínas se logra gracias a un extensivo solapamiento de sus genes. Los 4 marcos de lectura abiertas (ORF) han sido designados como: P, S, pre-C/C y X. El gen P abarca la mayor parte del geno-

ma. El gen S está dentro del gen P. Los genes C y X se solapan parcialmente "upstream" y "downstream" respectivamente con el gen P^{20,21}. El gen S (envoltura): contiene 3 codones de iniciación en el mismo marco de lectura, lo cual permite dividirlo desde el extremo 5' al 3' en tres regiones: Pre S1, Pre S2 y S que codifican para la síntesis de las proteínas Grande (L), Mediana (M) y Pequeña (S o principal) que conforman la envoltura del VHB (HBsAg). La proteína pequeña del HBsAg, es el componente mayoritario de las envolturas vacías del virus. Ciertas mutaciones en el gen S modifican el sub-tipo del VHB. El gen C (Cápside): tiene 2 codones de iniciación que le permite la síntesis de 2 polipéptidos: la región C codifica la proteína de la nucleocápside vírica o core, la cual no es secretada a la sangre por encontrarse unida al retículo endoplasmático del hepatocito. La región Pre C/C codifica para el antígeno e (HBeAg), el cual es secretado a la sangre. El gen P (polimerasa): codifica la polimerasa de ADN del virus, tiene actividad de polimerasa dependiente de ARN y ADN. El gen X: codifica una proteína X, que contiene el promotor del gen C. Esta proteína participa como regulador de los mecanismos de transcripción y replicación del virus, siendo muy inmunógena detectándose anticuerpos frente a ella¹⁹⁻²².

Se han descrito 6 genotipos (A-F), los cuales tienden a estar distribuidos geográficamente²³. El genotipo F es autóctono de América del Sur²⁴. Por otra parte se han determinado 4 subtipos antigénicos y otros sub-subtipos basados en las sustituciones en la proteína S²⁵. Todos los subtipos de HBsAg del virus VHB poseen un determinante antigénico a, que es común para todos, pero además, existen otros dos grupos de determinantes asociados al a y mutuamente excluyentes, el grupo d/y y el grupo w/r²⁶; esto origina los 4 subtipos clásicos del HBsAg: adw, adr, ayw, ayr. Se ha determinado la heterogeneidad del determinante antigénico w y el determinante q²⁷. Más recientemente se ha descrito un par alélico adicional, los

subtipos i y t que corresponden a un cambio de isoleucina en la posición 126 por treonina²⁸. La importancia clínica de una variante de HBsAg puede ser diferente dependiendo de la naturaleza de la sustitución. Los genotipos aparentemente no tienen ninguna ventaja de replicación o potencial patógeno unos con respecto a otros, sin embargo, se sugiere que el subtipo adr podría estar frecuentemente asociado con portadores²⁹ y el genotipo D podría estar asociado con hepatitis fulminante en una proporción mayor de lo esperado de acuerdo a su prevalencia en portadores crónicos³⁰.

La hepatitis B es una infección universal. Es transmitida por vía parenteral. La transmisión al neonato se produce durante el período prenatal, especialmente durante el 3^{er} trimestre y durante el período postnatal. Se transmite a través del contacto sexual, el compartir los utensilios de aseo personal, transfusiones sanguíneas, etc. Se consideran grupos de alto riesgo sujetos que utilizan drogas de uso endovenoso (drogadictos IV), homosexuales, trabajadores de la salud, especialmente los que laboran en unidades de hemodiálisis y en el área oncológica, cirujanos, odontólogos y pacientes con retardo mental institucionalizados. La Hepatitis B tiene un período de incubación de 2 – 6 meses. Se han definido varios patrones de infección con este virus. Muchas infecciones primarias en adultos son autolimitadas y revierten totalmente en 6 meses. Un elevado número de ellas son subclínicas y se detectan sólo por pruebas serológicas y otros métodos. Una fracción de las infecciones no se resuelve, haciéndose persistente y posiblemente continua por años, produciendo complicaciones tales como cirrosis y carcinomas hepatocelulares³¹.

Las formas virales en la sangre, así como la respuesta inmune a los diferentes antígenos virales constituyen marcadores que pueden usarse para seguir el curso de la infección. Estos marcadores se modifican a lo largo del tiempo en estrecha relación con la evolución biológica de la enfermedad, por ello su

determinación cualitativa y cuantitativa puede servirnos para evaluar la situación actual y el pronóstico futuro de la infección viral, así como conocer la susceptibilidad en el individuo sano.

Antígeno de superficie (HBsAg)

Se sintetiza en el citoplasma del hepatocito. Podemos encontrarlo en el citoplasma del hepatocito y en sangre durante el período de incubación, fase aguda de la infección y en el estadio crónico. El HBsAg puede circular como parte del virión o como partículas de envoltura viral incompleta en las cuales no se ha detectado ácido nucleico (32). Si la evolución es favorable desaparecerá a los 3-6 meses de la enfermedad, si se mantienen títulos elevados durante más de 6-8 semanas, o si no hay una disminución significativa de su título en el primer mes de la enfermedad es indicio de mal pronóstico y de probable evolución a la cronicidad. La positividad de este marcador más allá del sexto mes de infección, define la situación clínica de la hepatitis crónica.

Existen diferentes métodos para la detección del HBsAg como son: hemaglutinación pasiva reversa (RPHA), radioinmunoensayo y el ensayo inmunoenzimático (Elisa), actualmente, el más utilizado para el diagnóstico en laboratorios clínicos. El método confirmatorio para el HBsAg consiste en la realización de una neutralización específica que utiliza anticuerpos contra el antígeno de superficie (anti-HBs) concentrados capaces de producir una inhibición de al menos el 50 % de la muestra cuando se compara con el control. Sin embargo, es necesario considerar que la reactividad aislada para HBsAg puede ser debido a: a. Inmunotolerancia extrema, b. Estadio precoz de la infección aguda por VHB, c. Infección por cepas de VHB defectivas en la expresión del HBxAg, con niveles de ADN vírico detectables sólo por PCR y d. Infección por VHB tipo 2¹⁹⁻³³.

Antígeno de la cápside (HBcAg)

Se sintetiza en el núcleo de la célula hepática y no es posible hallarlo aisladamente en el suero del paciente, sino



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

formando parte de la partícula de Dane. Su poder inmunógeno induce la producción de los anticuerpos anti-HBc de clase IgM e IgG.

Anticuerpos Anti-HBc

Es el primer anticuerpo que aparece en la enfermedad, es detectable con los primeros síntomas de la enfermedad en la fase aguda y en la crónica. Este persiste por años después de la recuperación. La presencia de anticuerpos de la clase IgM frente a estos marcadores se interprete habitualmente como indicador de infección reciente, aunque también es detectable en los casos de enfermedad crónica con replicación viral y lesión hepática, pero en concentraciones menores que las encontradas en la fase aguda. La IgM contra el core puede ser detectada por un tiempo variable entre 12 y 18 meses. Los anticuerpos de la clase IgG suelen indicar una infección pasada. Su positividad confirmada y en solitario no asegura protección frente enfermedad y no constituye un criterio de exclusión para la vacunación. La reactividad aislada para anti-HBc, con ausencia de otros marcadores de infección VHB puede deberse a 1. Reacción inespecífica ligada a componentes séricos (La especificidad debe confirmarse mediante otra técnica serológica de distinto formato, la detección de anti-HBe o la presencia de ADN vírico), 2. Período de ventana de la infección por VHB y 3. Respuesta inmunitaria incompleta al VHB, es decir, la incapacidad para la producción de anti-HBs.

Antígeno e (HBeAg)

Este antígeno es detectable en la mayoría de los enfermos que se encuentran en la fase aguda y en alguna forma de enfermedad crónica en las que histológicamente se corresponde con hepatitis crónica activa. Su mayor valor clínico se debe a su excelente correlación con la presencia de replicación viral y viremia. Su desaparición en el curso de una hepatitis aguda o crónica suele indicar buena evolución y posiblemente su seroconversión a anti-HBe con

curación o paso a un estadio menos agresivo de la enfermedad. Existen casos en los que esta seroconversión, si persiste la replicación viral, supone un mal pronóstico de la enfermedad (variante Pre-C negativo). En algunas ocasiones, este marcador debe ser manejado junto con anti-HBe y DNA-HBV para poder valorar la respuesta inmune frente a las proteínas del virus y la viremia ya que por sí solo no permite predecir con certeza la presencia o no de replicación viral.

Anticuerpos anti-HBe

Generalmente se detecta antes de que desaparezca el HBsAg y persiste varios años después de la infección. En los casos de infección aguda su aparición es de buen pronóstico. En los casos de infección crónica, en los que coexiste con el HBsAg, suele indicar escasa replicación e infectividad. Sin embargo, como se comenta anteriormente la seroconversión anti-HBe no siempre indica mejoría, sino que puede deberse a la selección de mutantes Pre-C del VHB que se asociase a la replicación vírica con cuadros de hepatitis crónica y cirrosis.

Anticuerpos anti-HBs

Indica recuperación de la enfermedad, es el último marcador en aparecer y persiste durante años. Estos anticuerpos son neutralizantes y confieren protección a la infección por VHB. En individuos vacunados es el único marcador que detectamos. La reactividad aislada para anti-HBs en personas no vacunadas puede ser debido a reacciones serológicas inespecíficas, infección antigua con pérdida de anti-HBc o respuesta inmune incompleta frente a la infección por VHB. La coexistencia de anti-HBs y HBsAg puede ser debido a 1. Infección por variantes del VHB defectivas de a (mutantes de escape)³⁴ en sujetos previamente vacunados o en pacientes en tratamiento con interferón, 2. Infecciones por el VHB tipo 2 en individuos inmunes al VHB, 3. Fenómenos de tolerancia inmunológica, 4. Administración de gammaglobulina específica en pacientes portadores del HBsAg.

DNA del VHB

Su detección representa el marcador más sensible y específico de replicación viral. El DNA vírico libre en el suero puede detectarse mediante técnicas de hibridación y por amplificación mediante PCR¹⁹.

Variantes del VHB

El VHB presenta una tasa de mutación relativamente alta³⁵, a pesar de tener un genoma ADN, este fenómeno ha sido atribuido al requerimiento de un paso de transcripción reversa en la replicación de su genoma utilizando una transcriptasa reversa que carece de actividad correctora. Se han descrito mutaciones en todas sus regiones génicas, que afectan no sólo la evolución clínica y la respuesta terapéutica, sino que tiene consecuencias importantes desde el punto de vista diagnóstico (patrones serológicos atípicos) preventivo (evolución de la protección que confiere la vacuna) y epidemiológico.

Variantes defectivas PRE-C

Mutación puntual (codón 1896) en la región Pre-C del genoma que impide la transcripción de las secuencias Pre-C y C y por ende la síntesis de HBeAg³⁶. Estudios posteriores demostraron que la mutación Pre-C no es selectiva en cuanto al lugar. Pueden presentarse mutaciones en distintos codones de la secuencia Pre-C con las mismas consecuencias. Estas variantes se generan por selección inmunológica en el individuo infectado con el fin de evadir la inmunidad celular³⁷. Este tipo de variantes puede ser encontrada en pacientes con hepatitis B crónica activa resistente al tratamiento con interferón. También se asocia con carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante³⁸.

Variantes defectivas a

Cepas del VHB con una mutación en el gen S, lo cual las hace incapaces de expresar el determinante antigénico común a, del HBsAg. Esta mutación genera alteración de los epítopes

inmunodominantes del determinante a, que impide su reconocimiento con anticuerpos monoclonales específicos. Esto produce fracaso de la inmunoprofilaxis en recién nacidos de madres portadoras de HBsAg³⁴. Las variantes de escape del VHB pueden no ser detectadas cuando se utilizan métodos serológicos basados exclusivamente en anticuerpos monoclonales frente al determinante a¹⁹.

Mutaciones en el gen X

La infección por cepas VHB con mutaciones en el gen X cursa con ausencia de marcadores serológicos de infección por VHB, se asocia con frecuencia a carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante. El diagnóstico requiere siempre técnicas de amplificación genómica (PCR)¹⁹.

VHB Tipo 2

El origen del tipo 2 del VHB parece deberse a la aparición de mutaciones en el gen X que ocasiona que el virus se replique y exprese de forma insuficiente, siendo incapaz de estimular una respuesta inmune adecuada³⁹. Desde el punto de vista serológico se caracteriza por presentar reactividad aislada al HBsAg sin seroconversión anti-HBc y ausencia de HBeAg. Transitoriamente puede detectarse anti-HBs con niveles bajos de HBsAg y DNA vírico. El diagnóstico de esta variante implica la introducción de ensayos que empleen anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de la región Pre S2 de subtipo d, o mediante técnicas de PCR del gen S¹⁹.

HEPATITIS C

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado en 1989⁴⁰. El VHC es único en virología ya que fue el primer virus identificado puramente por técnicas de biología molecular y no por las clásicas técnicas de aislamiento viral o microscopía electrónica. El VHC ha sido clasificado en un género separado (Hepacivirus) de la familia Flaviviridae⁴¹. El virus tiene aproximadamente 60 nm de



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

diámetro y consta de una envoltura lipoproteica derivada de la membrana del huésped, dentro de la cual están todas las glicoproteínas virales (E1 -E2) rodeando una nucleocápside y una hebra sencilla de ARN de polaridad positiva de alrededor de 9.600 nucleótidos. El genoma consiste en regiones no codificantes 5' y 3' que flanquean un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica proteínas estructuradas y no estructurales. Las proteínas estructurales codificadas por los genes (C, E1 y E2) son: la proteína de la nucleocápside (core) y las glicoproteínas de envoltura E1 y E2. Las proteínas no estructurales son enzimas relacionadas con la replicación viral y son codificadas por los genes NS2, NS3, NS4 y NS5⁴².

Los VHC aislados alrededor del mundo han sido separados en 6 genotipos principales denominados con números del 1 al 6, cada tipo a su vez puede tener algún subtipo que se denomina con letras minúsculas⁴³. La existencia del genotipo puede tener relevancia en términos de inmunogenicidad así como también en términos de distribución geográfica, con posibles implicaciones en el diagnóstico, historia natural y manejo de la infección^{42, 43, 44}. Otro punto importante con respecto a este virus es que durante la infección se generan las denominadas "quasispecies" que no son más que variantes virales, o sea viriones con genomas que muestran diferencias con el virus original en la secuencia de nucleótidos de su ARN, son producto de mutaciones que aparecen en períodos cortos de tiempo, durante el lapso que dura la infección en un mismo sujeto infectado y que sólo se diferencia entre sí por variaciones menores del 5%. Esta alta tasa de mutaciones, lo cual es característico de los virus ARN, puede ser atribuido a la ARN polimerasa, que tiene la particularidad de ser poco precisa, cometiendo frecuentemente errores en la transcripción y por otra parte careciendo de mecanismos de auto corrección. Esta tendencia del virus a mutar y formar una gran variedad de subtipos virales se incrementa por la acción del sistema inmunológico o por los medicamentos antivirales que ejercen

presión selectiva favoreciendo la aparición de mutantes de escape⁴⁵.

La transmisión es principalmente por vía parenteral. Los grupos de mayor riesgo lo conforman los receptores de productos sanguíneos, los drogaditos IV y los pacientes en diálisis, así como el trabajador de la salud que esta en contacto frecuente con sangre. La transmisión vertical es baja, aproximadamente 6%. La transmisión sexual es infrecuente pero ocurre. Sin embargo, existe un número variable de personas infectadas sin factores de riesgos obvios^{46, 47}. El período de incubación varía desde 2 semanas hasta 6 meses con una media entre 7-8 semanas. Aunque la infección aguda por lo general es oligosintomática y anictérica sólo un 15-25% de las personas infectadas con VHC logran eliminar por completo el virus, el restante 75-85% de las personas desarrollan una infección crónica. Los pacientes infectados crónicamente en un 10-20% desarrollan una cirrosis y el 1-5% carcinoma hepatocelular⁴⁷. Las manifestaciones extrahepáticas de la infección por VHC, pueden en determinados casos constituir la alteración clínica con que se presente el paciente. Se debe principalmente a la presencia de complejos inmunocirculantes formados por antígenos virales y anticuerpos que junto con el complemento tienden a depositarse en los pequeños vasos sanguíneos provocando vasculitis a nivel de la piel, los glomérulos renales, etc. Las diferentes manifestaciones extrahepáticas son las siguientes: crioglobulinemia, porfira cutánea tardía, glomerulonefritis membranoprolifera, trombocitopenia, tiroiditis, sialoadenitis, liquen plano, linfomas, etc⁴⁸.

Existen dos estrategias para el diagnóstico de la infección por VHC:

a. Detección de anticuerpos (Diagnóstico Serológico):

La infección por VHC genera una respuesta de anticuerpos de diferentes especificidades. No ha podido encontrarse una relación precisa entre los diferentes patrones de respuesta inmune y el estadio biológico o clínico de la infección⁴⁹.

La detección de anticuerpos se hace en primera línea con el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Constituye la prueba ideal para el tamizaje en Bancos de Sangre así como para la población general. Es una prueba sencilla de realizar, reproducible y de bajo costo. Estas pruebas han evolucionado progresivamente en la medida en que se han incorporado o modificado los péptidos sintéticos y/o proteínas recombinantes que se utilizan para la detección de los anticuerpos. Esto se ve reflejado en un aumento de la sensibilidad y especificidad de dichas pruebas. Actualmente los estuches comerciales que se utilizan en el país son los de tercera generación y más recientemente los de cuarta generación (incluyen en su formato antígenos de diferentes genotipos), que nos permiten la detección de anticuerpos de tipo IgG. Es importante hacer notar que la detección de anticuerpos del tipo IgM no ha demostrado aportar datos claros y concluyentes sobre la biología o estadio de la infección viral. La duración de la respuesta IgM es habitualmente breve pero es frecuente seguir detectándola en la fase crónica de la enfermedad ^{49,50}. Uno de los inconvenientes de estas pruebas para detección de anticuerpos es la existencia de falsos positivos sobre todo en la población de bajo riesgo. Este problema ha sido parcialmente solucionado con las pruebas confirmatorias, diseñadas para conocer individualmente que antígenos virales son los responsables de la reactividad obtenida mediante una prueba de ELISA. Al igual que las ELISA, estas pruebas confirmatorias han sido mejoradas tanto en sensibilidad como en especificidad. Las pruebas confirmatorias utilizadas con mejores resultados en la actualidad son: el inmunoblot recombinante (RIBA III) y el ensayo inmunoenzimático en línea INNOLIA ³³. Aun con las pruebas confirmatorias de tercera generación se siguen obteniendo algunos resultados indeterminados cuando intentamos confirmar la especificidad de la respuesta antigénica. Incluso puede darse el caso de que una muestra que con un kit de una casa comercial presente reactividad única para un péptido tenga con otro

kit reactividad para otro péptido diferente o puede incluso ser clasificada como positiva. Esto indica que la sensibilidad de las pruebas confirmatorias para diferentes anticuerpos es muy variable y por lo tanto el poder de clasificación de estas es limitado o confuso en sueros con índices de ELISA bajo. Por lo tanto, los resultados clasificados como indeterminados son al menos cuestionables, en cuyo caso son las técnicas de biología molecular que permiten la detección del ARN viral las que nos darán la palabra final. Recientemente se publicaron los resultados de un prototipo de ensayo que permite la detección serológica del antígeno core del VHC. Esta prueba permitirá la detección de donantes infectados con VHC que se encuentran en periodo de ventana ⁵¹.

b. Detección del ARN viral:

La identificación del ARN viral por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es por el momento el mejor marcador de viremia y posiblemente de enfermedad activa. La detección del ARN VHC puede hacerse en plasma y tejido hepático de pacientes seronegativos durante la primera fase de la infección, y para determinar si en un paciente con anticuerpos para VHC hay o no replicación del virus. En pacientes con una infección crónica, la viremia en plasma puede ser intermitente, por lo que se recomienda en aquellos casos en los cuales se observa una alteración, aunque sea mínima, de los niveles de transaminasas, y se sospecha infección por VHC, realizar la detección del ARN viral en una muestra de tejido hepático. La cuantificación de la carga viral permite el monitoreo de la terapia antiviral, y puede ser realizada por diferentes métodos disponibles en el mercado.

La determinación del genotipo puede ser realizada de dos maneras diferentes, una es el empleo de las diferentes técnicas que requieren de una PCR previa, como lo son la secuenciación, la digestión de productos amplificados con enzimas de restricción (RFLPs), la hibridación sobre membranas de nylon (LIPAS), PCR usando cebadores específicos para cada



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

genotipo, etc. Constituyen procedimientos complejos y laboriosos pero que garantizan resultados precisos. La otra forma de establecer el genotipo es estudiar los anticuerpos que se generan en una determinada persona como respuesta a antígenos virales que son exclusivos para cada genotipo. Estos métodos son menos costosos, pero también menos exactos⁴⁹. El conocimiento del genotipo nos aporta datos sobre la posible respuesta al tratamiento, evolución clínica y datos epidemiológicos de este proceso infeccioso⁴⁴.

HEPATITIS D

El virus de la hepatitis D (VHD) es un virus defectivo que requiere de la ayuda del VHB para replicarse. Las partículas virales tienen aproximadamente 36 nm de diámetro. El VHD requiere del VHB para la síntesis de proteínas de envoltura (HBsAg), las cuales son usadas para encapsular el genoma del VHD y el antígeno Delta (VHDAg). El genoma del VHD está constituido por una cadena sencilla de ARN de aproximadamente 1.68 Kb. En base al análisis genético de aislados procedentes de diferentes áreas del mundo, se han descrito 3 genotipos. El genotipo I es el más ampliamente distribuido en el mundo; han sido encontrados en Europa, Norteamérica, Norte de África, Medio Oriente, Pacífico Sur y en el Oriente de Asia. La patogénesis de la infección en estas áreas varía desde hepatitis fulminante hasta infección hepática subclínica. El genotipo II ha sido encontrado solo al oriente de Asia y el cuadro clínico que produce es más suave y con una menor tendencia a producir hepatitis fulminante. El genotipo III es el más divergente y ha sido encontrado solo al norte de América del Sur, donde se han descrito brotes de hepatitis severa con alta morbi-mortalidad⁵².

El mecanismo de transmisión es similar al de la hepatitis B, siendo la exposición percutánea la más eficiente. La transmisión sexual es menos eficiente que en la hepatitis B. La transmisión perinatal es rara. La infección por VHD puede ser adquirida en forma de coinfección con hepatitis B o como superinfección en personas con infección crónica por

VHB. Las personas que cursan con una coinfección VHB-VHD presentan con más frecuencia una infección aguda severa y alto riesgo de hepatitis fulminante si se compara con pacientes que cursan solo con infección por VHB. Sin embargo, se observa una menor tendencia a la cronicidad en los pacientes con una coinfección VHB-VHD. Los portadores crónicos del VHB que adquieren una superinfección por VHD usualmente desarrollan una infección crónica por VHD con mayor tendencia a la aparición de cirrosis hepática. El curso serológico de la infección por el VHD varía dependiendo de la forma como se adquirió la infección, es decir, como coinfección o como superinfección. En las personas con coinfección VHB-VHD es posible detectar tanto anticuerpos del tipo IgM como IgG durante el curso de la infección en la mayoría de los casos. Sin embargo, cerca de un 15% de las personas presentan solo IgM durante la fase aguda de la enfermedad o IgG sólo durante la convalecencia. Los anticuerpos anti-VHD decaen, haciéndose indetectables, una vez que la infección es resuelta (1-2 años). El VHDAg puede ser detectado sólo en 25% de estos pacientes y desaparece simultáneamente con el HBsAg. En los pacientes que desarrollan una superinfección con VHD podemos encontrar los siguientes eventos serológicos: el título de HBsAg declina al mismo tiempo que el VHDAg aparece en sangre, el VHDAg y ARN VHD permanecen detectables en suero por la tendencia a producirse cronicidad en estos pacientes. Altos títulos de IgM e IgG son detectables indefinidamente⁵³. El diagnóstico se realiza mediante la detección del VHDAg, así como de IgM e IgG o el ARN VHD por técnicas de biología molecular.

HEPATITIS E

El virus de la hepatitis E (VHE), tiene un genoma conformado por una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva y 7.6 Kb de longitud. Este virus carece de envoltura y tiene un diámetro de aproximadamente 27-34 nm⁵⁴. No se ha logrado cultivar, por lo que los diferentes aislados de HEV han sido mantenidos in

vivo en primates no humanos, posteriormente el genoma viral ha sido clonado y secuenciado⁵⁵. El VHE de acuerdo a las recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía de Virus pertenece ahora a una familia separada denominada "HEV-like viruses". El análisis de las regiones de la ARN helicasa y la polimerasa dependiente de ARN del VHE y otros virus ARN de cadena sencilla con polaridad positiva, muestra que el VHE, forma un grupo filogenéticamente distinto, más próximo al virus de la rubéola (familia Togaviridae) que a los miembros de la familia Calciviridae. Sin embargo, una clasificación definitiva se realizará en la medida en que se conozcan sus estrategias de expresión y replicación así como la naturaleza, procesamiento y propiedades de sus proteínas⁵⁶. El análisis de la secuencia genética del VHE aislado en diferentes regiones geográficas ha permitido su clasificación en tres genotipos: genotipo I, que incluye los subtipos asiático y africano. Genotipo II, que abarca las cepas de cerdo y humanos de Norte América; Genotipo III limitado al prototipo mexicano. A pesar de la existencia de diferentes genotipos, un solo serotipo ha sido identificado alrededor del mundo⁵⁵. Se han encontrado pequeñas variaciones entre los aislados obtenidos a intervalo de 3-4 años de una misma región. Esta baja tasa de variación ha permitido sugerir que los VHEs de diferentes áreas geográficas representan una expansión independiente de aislados ancestrales de VHE que se han mantenido con una circulación restringida en diferentes áreas del mundo^{57,58}. Este virus ha sido implicado en grandes brotes de hepatitis en países en desarrollo, la infección ha sido asociada con aguas contaminadas, su transmisión es por la vía oral fecal⁵⁹.

La infección causa una hepatitis viral aguda. El período de incubación es de 15 a 50 días, con un promedio de 5 a 6 semanas. En los casos típicos ocurre una fase pre-ictérica que podría durar 10 días y consiste en náuseas, vómitos y dolor abdominal. La fase ictérica tiene una duración de aproximadamente 10 días y la recuperación total ocurre dentro del primer mes, no tiende a la cronicidad.

El curso clínico de la hepatitis E es similar al de la hepatitis A. En los brotes de infección por VHE el mayor porcentaje de enfermedad clínica evidente se reporta entre jóvenes y adultos de mediana edad, se piensa que el bajo porcentaje de enfermedad en niños podría ser el resultado de una infección sub-clínica o anictérica⁵⁸. La hepatitis E es más severa que la hepatitis A con un porcentaje de mortalidad de 1-2% comparada con 0.2% para la hepatitis A^{58, 60}. En mujeres embarazadas la mortalidad aumenta a 22%, principalmente cuando la infección ocurre en el tercer trimestre, produciéndose una hepatitis fulminante⁶¹.

Las partículas virales están presentes en la bilis y en las heces al final del período de incubación y persisten por 1 ó 2 semanas después de iniciarse los síntomas. El virus también está presente en sangre al final del período de incubación, alcanzando un pico máximo de replicación alrededor del 8-11 día del inicio de los síntomas para luego comenzar a disminuir progresivamente⁶². Los anticuerpos anti-VHE de tipo IgA, IgG e IgM aparecen durante el curso de la enfermedad. Los anticuerpos IgM son detectables en la fase aguda y desaparecen entre 3-6 meses, los anticuerpos IgG persisten entre 2 y 13 años⁵⁸. En un 10% de pacientes en quienes se ha detectado viremia o excreción de virus por heces no se detectó respuesta de anticuerpos^{62,63}. Una explicación para este hallazgo es que una respuesta de anticuerpos no es necesaria para que ocurra una hepatitis E o para resolverla y que algunas personas no producen una respuesta de anticuerpos a la infección por VHE. Otra explicación es que estos pacientes fueron infectados con una variante que genera anticuerpos no reconocidos con el ensayo utilizado⁶².

Inicialmente la electroinmunomicroscopía y el FABAs (Fluorescent antibody blocking assay) fueron utilizados, pero estos métodos resultaron muy laboriosos para ser utilizados como rutina y además resultaron incapaces de distinguir entre una infección presente o pasada⁶². Posteriormente, diversos ensayos inmunoenzimáticos y Western-blot usando



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

proteína recombinantes han sido desarrollados para detectar IgM e IgG contra el HEV. Paralelamente técnicas de biología molecular como el RT-PCR se ha utilizado para detectar la excreción viral por heces así como la viremia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Feinstone S.M., Kapikian A.Z., Purcell R.H.: "Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness". *Science* 1973; 182: 1026-8.
2. Gus I.D., Coulepis A.G., Feistone S.M., Locarnini S.A., Moritsugu Y., y cols. "Taxonomic classification of hepatitis A virus". *Intervirology* 1983; 20: (1) 1-7.
3. Weitz M., Baroudy B.M., Maloy W.L., Ticehurst J.R., Purcell R.H.: "Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs". *J. Virol* 1986; 60: 124-130.
4. Cohen J.I., Ticehursts J.R., Purcell R.H., Buckler-White A., Baroudy B.M.: "Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses". *J. Virol* 1987; 61: 50-59.
5. Coulepis A.G., Tannock G.A., Locarnini S.A., Gus I.D.: "Evidence that the genome of hepatitis A virus consists of a single stranded ARN". *J. Virol* 1981; 37: 473-477.
6. Ticehursts J.R., Cohen J.I., Feinstone S.M., Purcell R.H., Jansen R.W., Lemon S.M.: "In Molecular aspects of Picornaviral Infection and Detection. (eds Semler, BL and Ehrenfeld E) pp. 27-50. American Society for Microbiology, Washington, DC 1989.
7. Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B. Totsuka A., Nainan O.V., Siegl G., y cols. "Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions". *J. Gen. Virol* 1992; 73:1365-1377.
8. Lemon S.M., Binn L.N.: "Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization" *Infet. Immun* 1983; 42: 418-420.
9. Stapleton J. T.: "Host Immune. Response to Hepatitis A Virus". *J. Infect Dis* 1995; 171: (Suppl 1) S9-14.
10. Mc Donald G.S.A.: et al "Prolonged IgM antibodies and histopathological evidence of chronicity in hepatitis A". *Liver* 1989; 9: 223-228.
11. Ganem D., Varmus H.E.: "The molecular biology of hepatitis viruses". *Ann. Rev. Biochem* 1987; 56: 651-693.
12. Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M.: "Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis". *Lancet* 1970; 2: 695-8.
13. Almeida J.D., Rubenstein D., Stott E.J.: "New antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis". *Lancet* 1971; 2: 1225-7.
14. Robinson W.S., Clayton D.A., Greeman R.L.: "DNA of a human hepatitis B virus candidate" *J virol* 1975; 14: 384-91.
15. Gerlich W., Robinson W.S.: "Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its compete DNA strand". *Cell* 1980; 21: 801.
16. Kaplan P. M. Greenman R.L., Gerin J.L., Purcell R.H., Robinson W.S. "DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen". *J. Virol* 1973; 12: 995-1005.
17. Robinson W.S., Greeman R.L.: "DNA polymerase in the core of human hepatitis B virus candidate". *J. Virol* 1974; 13: 1231-6.
18. Takahashi K., Akahane Y., Gotanda T., Mishiro T., Imai M., Miyakawa Y. y cols.: "Demonstration of hepatitis e antigen in the core of Dane particles". *J. Immunol* 1979; 122: 275-279.
19. Información suplementaria tomada de <http://www.seimc.es/control/revi-Sero/Rvirhbs.htm>
20. Ganem D., Varmus H.E.: "The molecular biology of hepatitis viruses". *Ann. Rev. Biochem* 1987; 56: 651-693.
21. Will H., Kuhn C., Cattaneo R., et al: "Structure and funtion of the hepatitis B virus genome. In "Primary and Tertiary Structure of Nucleic Acids and Cancer Research", (ed Miwa M.) Japan Science Society Press, Tokyo. Pp. 237-247.
22. Raney A.K., Mc Lachlan A.: "The biology of hepatitis B virus". In. Mc Lachlan, A., ed. *Molecular biology of hepatitis B viruses*. Boca Raton. CRC Press: 1992; 1-38.
23. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H. Sastrose Wignjo R. Imai M., Miyakawa M.: "Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide secuence: comparison of surface antigen subtypes". *J. Gen Virol* 1988; 69: 2575-2583.
24. Magnius L.O., Norder H.: "Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S gene". *Intervirology* 1995; 38: 24-34.
25. Norder H., Couroucé A-M., Magnius L.O.: "Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes". *J. Gen. Virol* 1992; 73: 3141-3145.

26. Le Bouvier G.L.: "The heterogeneity of Australia antigen". *J. Infect Dis* 1971; 123: 671-5.
27. Couroucé-Panty A.M., Lemaire J.M., Roux J.F.: "New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category". *Vox sang* 1978; 35: 304-308.
28. Ohnuma H., Machida A., Okamoto H., Tsuda F., Sakamoto M., Tanaka T., y cols.: "Allelic subtypic determinants of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y o/w r". *J. Virol* 1993; 67: 927-932.
29. Shiira S., Fujino H., Uta Y., Tagawa K., Unuma T., Yoneyama M., y cols.: "Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease". Part I: Analysis of 1.744 HBsAg carriers". *Am. J Gastroenterol* 1991; 186: 866-871.
30. Yasmin M.: "Molecular biology of fulminant hepatitis B viruses". PhD Thesis, University of Glasgow, Glasgow. UK
31. Robinson W.S.: "Virus de hepatitis B y virus de hepatitis Delta". En *Enfermedades infecciosas*. Eds. Mandell et al. 3era Edición. 1990; 125: 1269-1297.
32. Bayer M.E., Blumerg B.S., Werner B.: "Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukemia. Down's syndrome and Hepatitis". *Nature (Lond.)* 1968; 218: 1057-59.
33. Dow B.C.: "Microbiology confirmatory test for blood donors". *Blood Reviews* 1999; 13: 91-104.
34. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., y cols.: "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *Lancet* 1990; 336: 325-9.
35. Girones R., Miller R.H.: "Mutation rate of hepadnaviruses" *Virology* 1990; 64: 613-620.
36. Carman W.F., Yacyna M.R., Hadziyannis S., Karayannis P., McGarvo M.J., Makris A. y cols.: "Mutation preventing formation of e antigen in patients with chronic HBV infection". *Lancet* 1989; 2: 588-591.
37. Carman WF: "Molecular variants of hepatitis B virus" *Clin. Lab. Med. (Hepatitis and chronic Liver Disease)* 1996; 16: 407-428.
38. Omata M, Ehata T., Yokosuka O., Hosoda K., Ohto M.: "Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis". *N Engl. J. Med* 1991; 324: 1699-1704.
39. Echevarria J.M., Leon P., Domingo CJ, Lopez J.A. Ecvhaarria J.E., Contreras G. y cols.: "Characterization of HBV2 -Like Infection in Spain". *J. Med. Virol* 1991; 33: 240-247.
40. Choo Q., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M.: "Isolation of a cDNA clone derived from a blood -borne non-A, non-B viral genome". *Science* 1989; 244: 359-361.
41. Rice C.M. in *Fields Virology*. (Fields B.N., Knippe D.N., Howley P.M., eds), Lippincot-Raven 1996; 931-960.
42. Van Der Poel C.L., Cuypers H.T., Reesink H.W.: "Hepatitis C virus six years on". *Lancet* 1994; 344: 1475-1479.
43. Simmonds P.: "Variability of hepatitis C virus". *Hepatology*, 21: 570-583.
44. Dusheiko G., Schmilovitz-Weiss H., Brown D., McOmish F., Yap P.L., Sherlock S., y cols.: "Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease". *Hepatology* 1994; 19: 13-18.
45. Forns X., Purcell R.H., Bukh J.: "Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus". *Trends in Microbiology* 1999; 7: 402-410.
46. Jenny-Avital E.R.: "Hepatitis C". *Curr Opin Infect Dis* 1998; 11: 293-299.
47. Cohen J.: "Scientific challenge of hepatitis C". *Science* 1999; 285: 26-30.
48. Información suplementaria tomada de: <http://caibco.ucv.ve>.
49. Información suplementaria tomada de: <http://www.innogenetics.com>
50. Quintin I., Hassan W.F., El Salman D., Shalaby H., El Zimatty D., Monier M.K. y cols.: "Hepatitis C virus-specific B cell activation: IgG and IgM detection in acute and chronic hepatitis C". *J Hepatol* 1995; 23(6): 640-647.
51. Peterson J., Green G., Lida K., Caldwell B., Kerrison P., Bernich S., y cols.: "Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative "window" phase of hepatitis C infection". *Vox Sang* 2000; 78(2): 80-85.
52. Esteban J.I., Martell M., Curman W.F., Gomez J.: "The Impact of Rapid Evolution of the Hepatitis Viruses". In *Origen and evolution of viruses*. E. Domingo (Edit) by Academic Press 1999; Cap. 13: 345-376.
53. Fields H.A., Hadler S.C.: "Delta Hepatitis". A review. *J. Clin Inmunoassay* 1986; 128-142.
54. Reyes G.R., Purdy M.A., Kim J.P., Luk K.C., Young L.M., Fry K.E. y cols.: "Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis". *Science* 1990; 247: 1335-1339.



55. Información suplementaria tomada de: <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/9900127-1h.htm>.
56. The International Committee on Taxonomy of Viruses 8th. Report (in press). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>.
57. Yin S., Purcell R.H., Emerson S.U.: "A new Chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions". *Virus Genes* 1994; 9: 23-32.
58. Panda S.K., Jameel S.: "Hepatitis E virus: from epidemiology to molecular biology". *Viral Hepat* 1997; 3: 227-251.
59. Skidmore S.J.: "Factors in spread of hepatitis E". *Lancet* 1999; 354: 1049-1050.
60. Chauhan A., Jameel S., Dilawari J.B., Chawla Y.K., Kaur U., Ganguly N.K.: Hepatitis E transmission to a volunteer. *Lancet* 1993; 341: 149-150.
61. Houssaini S.H., Skidmore S.J., Richardson P., Sherrat L.M., Cooper B.T., O'Grady J.G.: Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J. Virol. Hepat* 1997; 4: (1), 51-54.
62. Clyson E.T., Myint K.S., Snitbham R., Vougn D.W., Innis B.L., Chan L., y cols.: Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG response in patients with hepatitis E. *J. Inf. Dis* 1995; 172: 927-933.
63. Panda S.K. et al: Protracted viremia during acute sporadic Hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108: 225-230.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LAS HEPATITIS

Dra. Patricia Mantilla Guevara *

Instituto de Oncología y Hematología, MSDS, U.C.V.

RESUMEN

La hepatitis viral aguda es causada por siete diferentes virus: virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis F y virus de la hepatitis G. Aunque los primeros cinco virus pueden diferenciarse por sus propiedades antigénicas, los cinco producen enfermedades similares cuyo espectro clínico va desde una infección asintomática que pasa inadvertida hasta infección aguda fulminante y mortal, desde infección subclínica persistente hasta una enfermedad hepática crónica rápidamente progresiva que lleva hasta la cirrosis e incluso al carcinoma hepatocelular.

No es posible distinguir con claridad los diferentes tipos de hepatitis viral basándose únicamente en características clínicas o epidemiológicas. La forma más segura de diferenciar los distintos tipos de hepatitis se basa en pruebas serológicas específicas.

El virus de la hepatitis A, hepatitis E y hepatitis F son transmitidos por la ruta fecal-oral, tienen similar pronóstico y no son causa de infección crónica. Alrededor del 10% de personas infectadas con virus de la hepatitis B desarrollan infección crónica y 20-30% de estos progresan a cirrosis. El 80% de individuos infectados con hepatitis C se hacen crónicamente enfermos y el 30-40% desarrollan carcinoma hepato-celular. El virus de la hepatitis C es un virus defectuoso que sólo puede infectar en presencia del virus de la hepatitis B. El virus de la hepatitis G es transmitido por transfusiones y puede causar hepatitis crónica en forma similar al virus de la hepatitis C. Solo hay disponibilidad de vacuna para la hepatitis A y hepatitis B.

PALABRAS CLAVE: HEPATITIS VIRAL, HEPATITIS AGUDA, HEPATITIS CRÓNICA, HEPATITIS A, HEPATITIS B, HEPATITIS C, HEPATITIS D.

ABSTRACT

Acute Hepatitis is caused by seven different viruses: Hepatitis A virus, Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, Hepatitis D virus, Hepatitis E virus, Hepatitis F virus, and Hepatitis G virus. Even when the first five can be distinguished by their antigenic properties, the five viruses produce similar diseases which clinical spectrum goes from an infection asymptomatic that cannot be warned to an fulminant and deadly acute infection, from a persistent subclinical infection to a chronic hepatic disease which quick progress takes to a cirrhosis and even to a hepato-celular carcinoma.

It is not possible to distinguish clearly the different kinds of viral hepatitis only based on the clinical or epidemiological characteristics. The safest way to distinguish the different kinds of hepatitis is based on specific serological tests.

The Hepatitis A virus, Hepatitis E virus and Hepatitis F virus are transmitted by the oral-fecal route. They are not cause chronic infection and have a similar prognosis. Around 10% of people infected with Hepatitis B develop chronic infection and 20-30% of these progress to cirrhosis.. Around 80% of people infected with Hepatitis C, became chronically infected and 30-40% desarrolled hepato-celular carcinoma. Hepatitis D virus is a defectuose virus that can only infect an individual in the presence of Hepatitis B virus. Hepatitis G virus is transmitted by transfusions and can be persistent and cause chronic Hepatitis like the Hepatitis C virus. A vaccine is only available for Hepatitis A and Hepatitis B.

KEY WORDS: VIRAL HEPATITIS, ACUTE HEPATITIS, CHRONICAL HEPATITIS, HEPATITIS A, HEPATITIS B, HEPATITIS C, HEPATITIS D.

HEPATITIS VIRAL AGUDA

La Hepatitis viral aguda es una infección sistémica que afecta predominantemente al hígado. En su patogenia han sido involucradas siete clases de agentes virales: virus de la Hepatitis A (VHA), virus de la Hepatitis B (VHB), virus de la Hepatitis C (VHC), virus de la Hepatitis D (VHD) o agente delta, asociado al VHB, virus de la Hepatitis E (VHE), virus de la Hepatitis F (VHF) y virus de la Hepatitis G (VHG). Aunque los primeros cinco virus pueden diferenciarse por sus propiedades antigénicas, los cinco producen enfermedades similares cuyo espectro clínico va desde una infección asintomática que pasa inadvertida hasta infección aguda fulminante y mortal, desde infección subclínica persistente hasta una enfermedad hepática crónica rápidamente progresiva que lleva hasta la Cirrosis e incluso al Carcinoma Hepatocelular.

No es posible distinguir con claridad los diferentes tipos de Hepatitis viral basándose únicamente en características clínicas o epidemiológicas. La forma más segura de diferenciar los distintos tipos de Hepatitis se basa en pruebas serológicas específicas¹.

Características clínicas y de laboratorio.

Los pacientes con hepatitis viral aguda se presentan con manifestaciones clínicas similares cualquiera que sea el agente etiológico específico. Los síntomas iniciales más comunes son fatiga, lasitud, anorexia y náuseas, dolor en el hipocóndrio, prurito, mialgias y artralgias. Puede presentarse una artritis franca. Muchos de los síntomas constitucionales ceden en el momento en que aparece la ictericia o poco después. En el examen físico, los rasgos más notables son la piel y las escleróticas ictericas. El hígado a menudo está agrandado y es doloroso a la palpación. El bazo es palpable en alrededor de 10% de los pacientes.

La bilirrubina sérica no suele superar los 15 a 20 mg/dl. Los niveles de la

aspartato-aminotransferasa (ASL o SGOT) y de la alanina-aminotransferasa (ALT o SGTP) se elevan de una a dos semanas antes del comienzo de los síntomas y comienzan a descender poco después de la aparición de estos. El grado de elevación no se correlaciona necesariamente con la gravedad de la enfermedad. Las elevaciones de las transaminasas suelen desaparecer a las ocho a doce semanas después del comienzo de la enfermedad.

Son signos de mal pronóstico en Hepatitis Aguda Viral la elevación de Tiempo de Protombina (TP), severa hipoglicemia y severa anemia².

Hepatitis viral fulminante

En menos del 1% de los casos, los pacientes con hepatitis viral entran en coma y mueren en cuestión de días a semanas. La hepatitis viral fulminante es una enfermedad que dura menos de ocho semanas. La mortalidad es alta en extremo (>80%).

Diagnóstico diferencial de la hepatitis viral aguda

- *Hepatitis viral:* La hepatitis causada por el virus de Epstein-Barr, el Citomegalovirus, el virus del Herpes Simple y el Coxsackie virus puede parecerse a la enfermedad aguda asociada con la infección por el virus de la hepatitis. Anticuerpos heterófilos, anticuerpos IgM contra el antígeno de la capsida del virus de Epstein-Barr o la prueba de los anticuerpos inmunofluorescentes para Citomegalovirus pueden tener utilidad para realizar el diagnóstico correcto.
- *Hepatitis tóxica:* Drogas como alfa-metildopa, isoniacida, rifampicina y acetaminofeno pueden producir hepatitis aguda. La suspensión de estos agentes debe dar lugar a la resolución de la enfermedad.
- *Hepatitis alcohólica:* A diferencia de la hepatitis viral, las transaminasas séricas suelen tener valores inferiores

a 500 UI/L y la AST esta desproporcionadamente elevada en comparación con la ALT.

- *Insuficiencia cardiaca derecha o izquierda:* En ocasiones puede parecer una Hepatitis viral aguda ^{1,2}.

HEPATITIS VIRAL CRÓNICA

De 5% a 10% de los pacientes con Hepatitis B aguda y 50% a 60% de aquellos con hepatitis C desarrollan una infección crónica.

La Hepatitis viral crónica se puede dividir desde el punto de vista morfológico en:

- *Hepatitis crónica persistente:* las alteraciones inflamatorias se limitan principalmente a la región del espacio portal y la hepatopatía raras veces es progresiva.
- *Hepatitis crónica activa:* la lesión del hepatocito adyacente al espacio portal se observa con necrosis parcelar o focal, se puede acompañar de necrosis en puente y es un trastorno variablemente progresivo que a menudo evoluciona a cirrosis y posiblemente a insuficiencia hepática. Las anomalías bioquímicas más acentuadas suelen implicar una hepatitis crónica activa y la presencia de estigmas de hepatopatía avanzada (hipertensión portal y ascitis) siempre indica hepatitis crónica activa.

La biopsia hepática percutánea es esencial para establecer el diagnóstico.

La mayor parte de los pacientes en los que se establece el diagnóstico sobre la base de anomalías del hepatograma o positividad de HBsAg luego de la evaluación de rutina (en la oportunidad de la donación de sangre) no tienen síntomas o sólo refieren una fatiga leve.

HEPATITIS A

A diferencia de los otros virus de la hepatitis descritos, la infección por VHA siempre es autolimitada.

El riesgo de infección por el VHA depende de las condiciones higiénicas

sanitarias del área; así, se presenta con frecuencia en pequeñas epidemias debido a la contaminación fecal de alimentos o del agua. El virus puede sobrevivir en la materia fecal contaminada contenida en las manos o alguna superficie por 4 horas a temperatura ambiente. El contacto directo con una persona infectada, es otra vía confirmada de infección (besos y sexo anal). También se ha reportado contaminación en adictos a drogas endovenosas. Cuando las condiciones de vida declinan durante los desastres naturales, la guerra o la depresión económica, la prevalencia de la enfermedad aumenta. La diseminación del VHA es mayor entre los hombres homosexuales promiscuos. Se han reportado varios brotes en centros de asistencia infantil de niños en edad de utilizar pañales. Con frecuencia, estos brotes originan casos de hepatitis A (HA) entre el personal, los padres y familiares. También se han reportado brotes en instituciones militares y de discapacitados mentales. La enfermedad tiene una distribución mundial.

La hepatitis A tiene un periodo de incubación de 4 semanas aproximadamente (2 a 16 semanas). La excreción fecal, la viremia y la infectividad declinan rápidamente una vez que aparece, la ictericia.

En la fase aguda de la enfermedad, cuando la actividad sérica de transaminasas está elevada y persiste todavía la excreción fecal de virus (7 días antes de los síntomas hasta 2 semanas luego de la aparición de los síntomas), se pueden detectar ya anticuerpos contra el VHA (anti-VHA). Esta respuesta precoz de anticuerpos es predominantemente del tipo IgM y persiste durante 3 a 6 meses. Por tanto, el diagnóstico de HA en la fase aguda se basa en la detección de títulos elevados de anti-VHA de tipo IgM. Durante la convalecencia, pasada la enfermedad aguda el anticuerpo anti-VHA que se hace predominante es de tipo IgG, y sigue siendo detectable indefinidamente. Los pacientes con este anticuerpo en suero son inmunes a la reinfección.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Diagnóstico
clínico de las
Hepatitis

El 25% a 30% de los pacientes con Hepatitis viral fulminante corresponden a la HA³.

Prevención

La HA se puede prevenir en más del 80% al 90% de los pacientes expuestos al VHA mediante la rápida administración de inmunoglobulina, porque todos los lotes contienen una concentración adecuada de anti-VHA.

Profilaxis pre-exposición:

- Para quienes viajan a países tropicales y en desarrollo se recomienda la inmunoglobulina en dosis de 0,02 ml/kg cuando el viaje es a corto plazo y va a durar menos de tres meses y no da tiempo de que se produzca la inmunidad activa.
- Está indicada además en hipersensibilidad a los componentes de la vacuna.

Profilaxis post-exposición:

Como el periodo de incubación de la HA es breve, individuos que han estado en contacto con pacientes infectados deben recibir inmunización pasiva en un período no mayor de 2 semanas. Siempre que se identifiquen casos de hepatitis A se debe administrar inmunoglobulina a la dosis de 0,02 mg/kg. con la vacunación a:

- Contactos de personas infectadas en centros asistenciales, guarderías, penitenciarias, instituciones militares.
- Manipuladores de alimentos.
- Familia que habita en la misma residencia del infectado.
- Cuando se ha realizado vacunación un mes antes, no se requiere Ig.

La vacunación debe realizarse en personas con alto riesgo para adquirir y/o transmitir la infección, dos dosis con intervalo de 6 meses.

HEPATITIS B

Existen diferentes zonas endémicas:

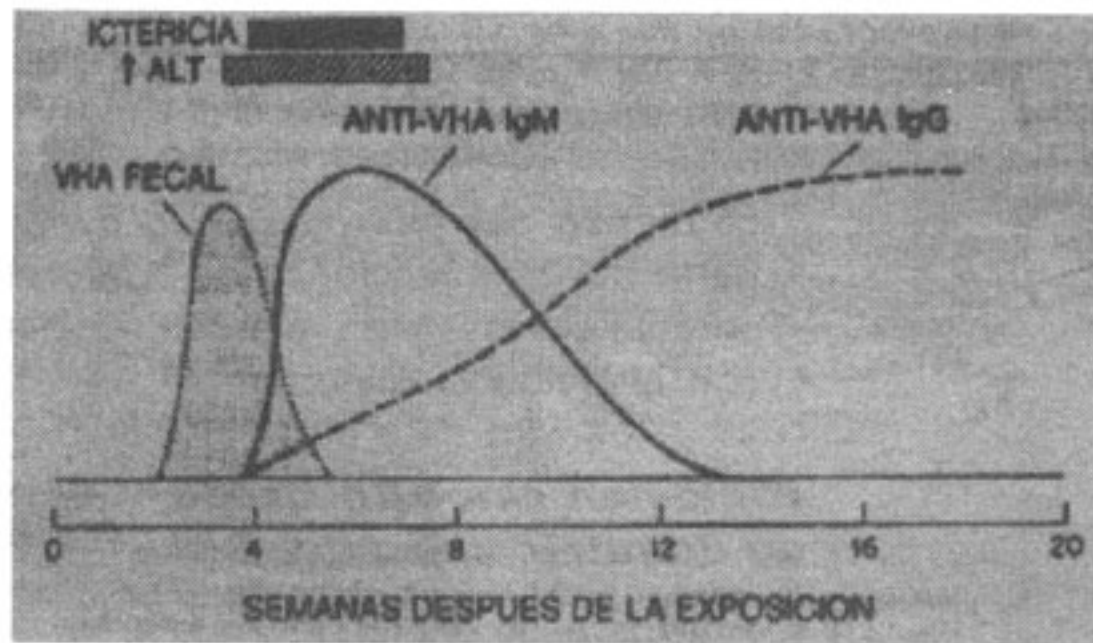


Gráfico N° 1
Infección por virus de la hepatitis A

1. *Zonas de baja endemia:* La prevalencia del antígeno de superficie (HBsAg) es de 0.2 a 0.5%; predomina la exposición parenteral y sexual, y la población afectada, es la población de alto riesgo para adquirir la infección: adictos a drogas endovenosas, profesionales de la salud, pacientes hemofílicos, pacientes sometidos a hemodiálisis, homosexuales y prostitutas. Abarca el oeste de Europa, USA y Australia.
2. *Zonas de endemia intermedia:* La prevalencia del HBsAg es del 2 al 7%; predomina la transmisión vertical, parenteral y sexual. Afecta a la población general y se incrementa en la población de alto riesgo. Abarca Asia Central, India, Oeste de Europa, países del Mediterráneo y América Latina.
3. *Zonas de alta endemicidad:* La prevalencia del HBsAg es del 8 al 20%; predomina la transmisión vertical y afecta a la población general. Abarca China, Sureste de Asia y África Tropical.

Existen tres formas responsables de la transmisión del VHB:

1. *Transmisión parenteral:* transfusiones (hemofílicos, pacientes sometidos a hemodiálisis, adictos a drogas endovenosas, accidente laboral (profesionales del área de salud y trabajadores de laboratorio).
2. *Transmisión sexual:* por semen y secreciones vaginales.
3. *Transmisión vertical:* La transmisión perinatal se produce en niños nacidos

de madres portadoras de HBsAg o que han padecido hepatitis B (HB) en el tercer trimestre del embarazo o al comienzo del puerperio. La mayor parte de las infecciones se producen durante el parto y no guardan relación con la lactancia materna.

Población con alto riesgo de adquirir hepatitis B

- Adictos a drogas endovenosas.
- Promiscuos homosexuales y heterosexuales. La infección se presenta con una frecuencia diez veces mayor en hombres homosexuales en comparación con la población general.
- Pacientes con hemofilia.
- Pacientes en hemodiálisis.
- Personas que recibieron transfusiones sanguíneas antes de 1975.
- Personas que tienen sexo con individuos enfermos crónicamente o transportadores asintomáticos.
- Trabajadores de la salud.
- Personal paramédico.
- Dentistas o asistentes dentales.
- Agentes de policía.
- Trabajadores en funerarias.
- Pacientes o trabajadores de instituciones psiquiátricas o para discapacitados mentales.
- Personal de instituciones militares.
- Prisioneros y personal de la prisión.
- Viajeros a zonas de alta incidencia de HB.
- Neonatos nacidos de madres HBsAg positivo.
- Grupos étnicos con mayor tasa de infección: nativos de Alaska, indios americanos, pobladores de China, Corea, Indonesia, Filipinas, islas del Caribe (Haití).

El 40% de los casos no están asociados con una vía de exposición identificable. Todas las clases principales de líquidos corporales han mostrado contener el virus con la posible excepción de las heces no contaminadas con sangre. Cualquier contacto de sangre u otro fluido con la boca, ojos o piel con pérdida de continuidad puede producir la infección. El VHB no se transmite por vía oral, nasal ni respiratoria ^{4,5}.

El periodo de incubación de la hepatitis B oscila entre 30 y 180 días.

La mayor parte de los pacientes con infección aguda por VHB permanecen asintomáticos, tienen subictericia o se presentan con una enfermedad pasajera de tipo gripal.

Un 10%-20% de los casos presenta un pródromo similar a la enfermedad del suero, con fiebre, artralgias o artritis, o erupciones cutáneas, maculopapulares o urticarianas. Este pródromo es consecuencia de los complejos circulantes HBsAg/anticuerpo contra el HBsAg (HBsAc) que activan el complemento y se depositan en la sinovial y en las paredes de los vasos sanguíneos cutáneos. Estas características ceden pronto en el curso de la enfermedad antes de que se manifieste la hepatopatía y de que se produzcan los niveles máximos de las transaminasas.

El VHB no es citopático y se cree que los efectos nocivos de la infección son consecutivos a la respuesta inmune del huésped. La existencia de portadores asintomáticos de Hepatitis B con función e histología hepática normales avala que el virus no es directamente citopático. En pacientes con compromiso del sistema inmunológico o con coinfección por VIH, se incrementa el riesgo de que la enfermedad se haga crónica, y el daño del hígado es menor en relación a las personas no infectadas.

La multiplicación del VHB desencadena una respuesta inmunológica específica contra el virus. La naturaleza y calidad de ésta respuesta inmune desencadena 4 tipos de reacciones en el hospedero:

1. *Fuerte respuesta del hospedero*, resulta en la eliminación de las partículas virales circulantes y de los hepatocitos infectantes. Se manifiesta clínicamente como Hepatitis B Aguda. Puede llegar a necrosis hepatocelular masiva y hepatitis fulminante.
2. *Reacción moderada y adecuada*: la infección es asintomática en el 90% de los casos.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Diagnóstico
clínico de las
Hepatitis

3. *Reacción moderada pero inadecuada:* se instala una tolerancia parcial combinando replicación prolongada del VHB (persistencia del HBsAg y destrucción crónica del tejido hepático, manifestándose clínicamente como hepatitis crónica que puede persistir por meses o años y aún, progresar a cirrosis (5 a 10%) y/o cáncer hepatocelular.
4. *Reacción ausente:* esta situación corresponde al portador sano que en algunas ocasiones tolera perfectamente la replicación del VHB.

Diagnóstico Serológico

Tras la infección por VHB, el primer marcador viral detectable en el suero es el HBsAg, anteriormente conocido como antígeno Australia, marcador temprano que aparece después de 1 a 3 meses de la infección. La elevación del HBsAg precede a las elevaciones de la actividad de las aminotransferasas séricas y a la aparición de la sintomatología por un periodo de 2 a 4 semanas, y sigue siendo detectable durante toda la fase ictericia o sintomática de la HB y aun después de la normalización de las transaminasas. Raras veces persiste mas allá de 6 meses. Una vez que desaparece el HBsAg, se hace detectable en suero el anticuerpo contra el HBsAg (HBsAc) y sigue siéndolo indefinidamente. Este periodo durante el cual se negativiza el HBsAg y se hace positivo el HBsAc se denomina periodo de ventana.

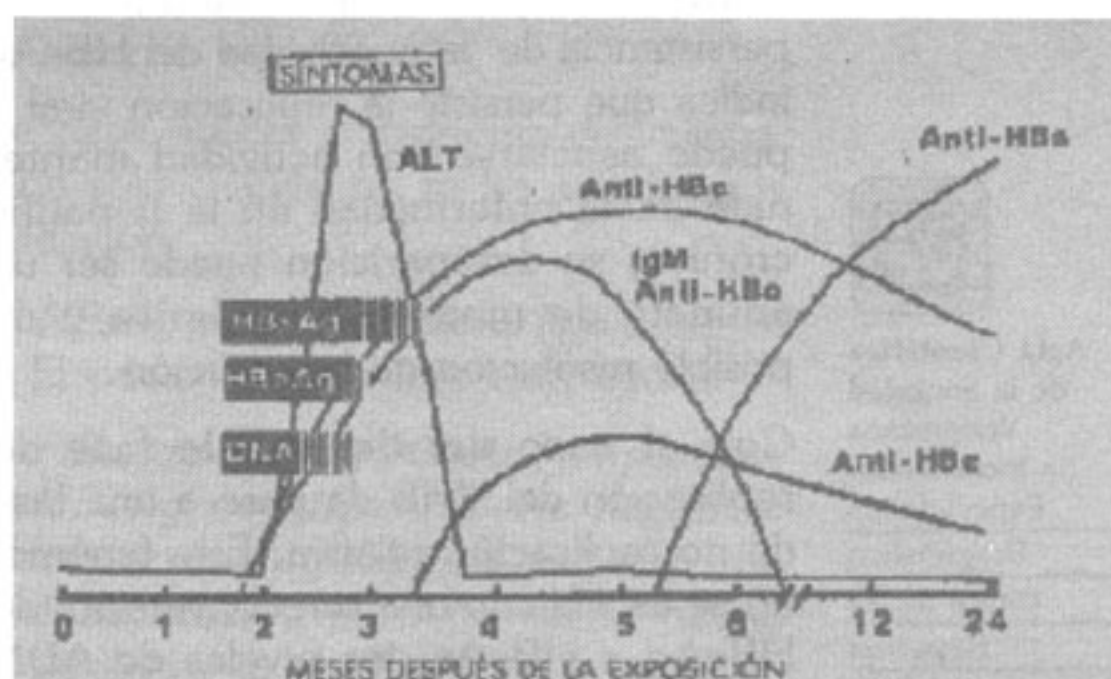
El segundo marcador en aparecer es el anticuerpo contra el antígeno core (HBcAc) que se detecta 1 o 2 semanas después que el HBsAg y semanas o meses antes que el HBsAc. Durante este periodo de "Ventana", la presencia de HBcAc puede ser un índice serológico de infección actual o reciente. Para dilucidar si una infección por VHB es reciente o antigua puede determinarse el tipo de inmunoglobulina a que corresponde el HBcAc detectado. Los HBcAc de tipo IgM (IgM HBcAc) predominan aproximadamente durante los 6 meses que

siguen a la infección aguda, mientras que los HBcAc de tipo IgG predominan al cabo de este periodo. Por tanto, los pacientes con hepatitis B actual o reciente, incluidos los que están en la fase de ventana tienen HBcAc de tipo IgM en el suero. En los pacientes que se han recuperado de una Hepatitis B padecida mucho tiempo atrás, así como en los que padecen infección crónica por VHB, el HBcAc que predomina es de tipo IgG. Raras veces, en no mas del 1 al 5% de los pacientes con infección aguda por VHB, las concentraciones de HBsAg son demasiado bajas como para ser detectadas; en estos casos la presencia de HBcAc de tipo IgM establece el diagnóstico de hepatitis B.

Por lo general, en las personas que se han recuperado de una hepatitis B, la positividad para anti-HBs y HBcAc persiste indefinidamente. El HBsAc es el anticuerpo neutralizante que confiere protección o inmunidad. Por tanto, las estrategias para prevenir la infección por VHB (vacuna) se basan en la administración de HBsAg a las personas susceptibles para que ellas produzcan el HBsAc. La inmunización natural difiere de la inmunización por vacuna por la presencia combinada de HBcAc y HBsAc.

La presencia de HBsAc y/o HBcAc en ausencia de HBsAg, es generalmente tomado como indicador de resolución de la infección, sin embargo, interesantes estudios han reportado bajos niveles de ADN del VHB en suero e hígado, años después de recuperarse de la infección.

Gráfico N° 2
Infección por virus de la hepatitis B



El antígeno e (HBeAg) es otro marcador virológico de la hepatitis B, que aparece al mismo tiempo o poco después que el HBsAg, coincide con una elevada replicación del virus y refleja la presencia de viriones intactos circulantes y de ADN del VHB. En la infección por VHB que cura espontáneamente, el HBeAg se hace indetectable poco después de que la elevación de la actividad de las transaminasas alcance su máximo y antes de que desaparezca el HBsAg (10 semanas); a continuación se hace detectable el anticuerpo contra el HBeAg (HBeAc). En algunos casos, la conversión de HBeAg a HBeAc ocurre sin período de ventana, así, el suero puede contener los 2 marcadores simultáneamente. El HBeAg no tiene utilidad para el diagnóstico etiológico de hepatitis B, pero sí tiene un valor pronóstico. Su persistencia más allá de la fase aguda de la enfermedad sugiere una progresión hacia la cronicidad ^{4,5}.

Hepatitis Crónica

En la infección crónica por VHB, el HBsAg sigue siendo positivo al cabo de 6 meses, el HBeAc es fundamentalmente del tipo IgG y el HBsAc es indetectable o se detecta en concentraciones bajas. Durante la fase inicial de la infección crónica por VHB es posible detectar el ADN del VHB tanto en el suero como en el núcleo. Esta fase de replicación de la infección por VHB coincide con la máxima infecciosidad y con el mayor grado de lesión hepática; durante ella el HBeAg se comporta como marcador cualitativo y el ADN del VHB como marcador cuantitativo. La persistencia de la positividad del HBeAc indica que persiste la replicación viral y puede asociarse con actividad mantenida de la enfermedad en la hepatitis crónica; su desaparición puede ser un anuncio de mejoría bioquímica y de posible resolución de la infección.

Con el paso del tiempo, la fase de replicación del VHB da paso a una fase de no replicación relativa. Este fenómeno se asocia con una seroconversión: de HBeAg a HBeAc; los niveles de ADN

disminuyen sustancialmente, haciéndose en algunos casos indetectable, y la hepatitis crónica mejora. En la mayoría de los casos, esta seroconversión coincide con una elevación transitoria, de la actividad de transaminasas, que se considera reflejo de la eliminación de hepatocitos infectados por virus. La tasa de depuración del HBeAg va del 8 al 12% al año, y es mayor en mujeres que en hombres y en jóvenes que en adultos.

Ocasionalmente se produce el tránsito inverso, y una infección no replicativa se convierte en replicativa. Esta reactivación espontánea se acompaña de la reaparición de HBeAg y de ADN del VHB y de una exacerbación de la lesión hepática.

La eficacia de un tratamiento antiviral puede ser determinada por seroconversión de HBeAg a HBeAc ⁶.

Un suero HBsAg positivo que también contenga HBeAg tiene muchas posibilidades de ser más infeccioso y de asociarse con la presencia de viriones de hepatitis B que un suero HBeAg negativo o HBeAc positivo.

Recientemente ha aumentado el interés por las variantes moleculares del VHB. Se producen variaciones del VHB debido a mutaciones acaecidas en una o múltiples zonas del genoma. Por ejemplo, se han descrito variantes que carecen de proteínas de la nucleocápside, de la envoltura. Se trata de enfermos con infección crónica grave por VHB con ADN del VHB detectable, pero anti-HBeAc en lugar de HBeAg. Los enfermos portadores de estos mutantes a nivel de la región precore que carecen de la capacidad de segregar HBeAg tienden a padecer una enfermedad hepática grave que evoluciona rápidamente a cirrosis y que responde mal al tratamiento antiviral.

Los antígenos y el ADN del VHB se han identificado en tejidos extrahepáticos, como ganglios linfáticos, médula ósea, linfocitos circulantes, bazo y páncreas. Su presencia en estos reservorios se ha argumentado para explicar la recurrencia



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Diagnóstico
clínico de las
Hepatitis

de infección por VHB tras la práctica de transplante de hígado.

Estado de Portador Crónico

Se identifica como aquella persona que posee el HBsAg durante un período mayor a 6 meses, no tiene signos, síntomas ni alteraciones bioquímicas, pero constituye un riesgo, ya que es capaz de infectar a otras personas. Los portadores sanos que tienen mayor riesgo que la población general para adquirir la infección pueden progresar a carcinoma hepatocelular o falla hepática.

Una persona que se conozca como portador sano no debe tener sexo sin protección a menos de que la otra persona tenga inmunidad natural o halla sido vacunado contra la HB. No debe consumir alcohol y debe realizarse estudios de función hepática y descarte de carcinoma hepatocelular (CHC) anualmente (determinación de afeto proteína).

Un 0,3% depuran el HBsAg anualmente y desarrollan HBsAc.

Transmisión Vertical

La probabilidad de transmisión perinatal del VHB depende de la presencia o no de HBeAg. En la mayoría de los casos la infección aguda en el neonato es asintomática, pero las posibilidades de que el niño se transforme en un portador de HBsAg son muy elevadas. La severidad de ésta infección depende del grado de replicación viral en la madre, reflejado serológicamente por el e HBeAg:

- Cuando la madre es positiva para el HBeAg, existe un riesgo de transmisión del 90 al 100%.
- Cuando la madre es negativa para el HBeAg, el riesgo de transmisión disminuye a un 5-20%

La aparición de la infección antes de los 6 meses de edad se asocia con progresión a cronicidad en el 90% a 100% de los casos; cuando la infección aparece luego de los 12 meses, sólo el 10% progresa a cronicidad.

Todas las mujeres embarazadas deben realizarse determinación serológica para hepatitis B y todos los neonatos deben ser vacunados al nacimiento.

La HBIG 0,06 ml/kg se recomienda para la profilaxis posexposición del personal de la salud no vacunado que ha tenido una exposición accidental a material HBsAg positivo.

Se recomienda otro plan (0.1, 2, y 12 meses) para la profilaxis posexposición cuando se necesita una inmunidad rápida, tal es el caso de los neonatos nacidos de madres HBsAg positivo. También debe ser vacunada toda la población sometida a mayor riesgo de adquirir la infección ^{4,5}.

Prevención

Se recomienda la profilaxis post-exposición con HBIG a dosis de 0,06mg/kg para:

- Personas no inmunizadas o inmunizadas inadecuadamente que tienen exposición con sangre o contacto sexual con portador crónico HBsAg positivo o persona con infección aguda.
- Neonatos nacidos de madres HBsAg positivo: es preferible administrar 0,5 ml de HBIG en el nacimiento y vacunar con HBV (0,5 ml de cualquiera de las vacunas) a partir del mismo momento con repetición de la dosis al mes y a los seis meses o con el esquema 0, 1, 2 y 12 meses.
- La vacunación se debe realizar a todas las personas de alto riesgo ⁶.

¿Cuándo vacunar?

Se debe aplicar el esquema de vacunación sólo cuando no se ha adquirido la infección.

- *HBsAg positivo y HBcAc IgM positivo:* El paciente tiene infección aguda.
- *HBsAg positivo y HBcAc IgM positivo: HBeAg negativo, HBcAc negativo:* Infección aguda, el HBeAg ha desaparecido pero no se ha hecho positivo aún el HBcAc.

- *HBsAg positivo, HBcAc IgM positivo:* HBeAg positivo: Infección aguda temprana.
- *HBcAc positivo y HBeAc positivo:* Infección resuelta con HBsAc no detectable aún o infección actual con bajos límites de HBsAg.
- *HBsAg positivo y HBcAc IgG positivo:* El paciente es portador.
- *HBsAg positivo y HBcAc IgG positivo, HBeAg negativo, HBeAc negativo:* Infección crónica durante el período de baja replicación.
- *HBsAg positivo y HBsAc negativo:* el paciente tiene la infección crónica o es un portador.
- *HBsAg negativo y HBcAc positivo:* El paciente ha sido expuesto al virus probablemente. Debe pedirse HBsAc:
 - *HBsAg negativo, HBcAc positivo y HBsAc positivo:* el paciente tiene inmunidad natural. No requiere vacunación.
 - *HBsAg negativo, HBcAc positivo y HBsAc negativo:* El paciente tiene niveles indetectables de *HBsAg* y aún no ha hecho inmunidad a la infección. Puede también ser un falso positivo para HBsAc, estar recobrándose de una infección aguda (si el HBcAc es del tipo IgM), supresión del HBsAg por una infección del virus Delta, variantes antigénicas del HBsAg que no se pueden detectar con pruebas habituales
- *HBsAg negativo y HBcAc negativo:* El paciente es susceptible a adquirir la infección. Debe recibir el esquema completo de vacunación
- *HBsAg negativo y HBsAc positivo:* El paciente ha sido expuesto a la infección y ha desarrollado inmunidad. No requiere vacunación ^{4,5}.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Diagnóstico
clínico de las
Hepatitis

HEPATITIS C

El período de incubación de la hepatitis C (HC) es de aproximadamente 60 días. Entre 15 y 160 días.

Corresponde al 20% de todos los casos de hepatitis aguda, 70% de los casos de hepatitis crónica, 40% de los casos de cirrosis terminal, 60% de los casos de CHC y al 30% de los trasplantes hepáticos. El 60% de los casos son asintomáticos y en un 20%, la aparición de los síntomas precede a la seroconversión: positividad para anticuerpos contra el VHC (HCAcs).

Vías de transmisión:

1. El patrón de diseminación es principalmente parenteral. Constituye en la actualidad el 90% al 95% de los casos de hepatitis postransfusionales en el mundo. En algunas ocasiones se ha asociado con la colocación de tatoo, piercing o acupuntura (igual que para VIH y HIV). También se han reportado casos en trabajadores de la salud.
2. Se ha observado una prueba positiva para anti-VHC en un 60% a un 80% de casos adquiridos a través del uso de drogas intravenosas.
3. La transmisión por vía sexual u otro contacto íntimo ocurre con menor frecuencia en comparación con el VHB; 20%. Cuando un paciente es positivo para el VHC, debe usar condón durante la menstruación o durante sexo anal. El embarazo no está contraindicado en las mujeres infectadas
4. Transmisión en el hogar: por tijeras, cortañas, afeitadora, cepillo dental, (los artículos de uso personal deben mantenerse aislados). No se transmite por besos ni por compartir vasos, platos o baños.
5. Lactancia materna. Esta vía de transmisión es incierta.
6. Transmisión vertical: Un neonato nacido de una madre positiva para el VHC tiene usualmente HCAcs hasta los 12 meses. Son los Acs tipo IgM que pasan de la madre. Menos del 6% de los neonatos adquieren el virus de las madres infectadas. El riesgo aumenta a un 14% cuando hay coinfección con el VIH. Si la madre está en la etapa Aguda de la infección o adquirió la

infección durante el embarazo, tiene mayor riesgo de transmitir el virus.

7. El riesgo de infección por VHC esta incrementando en los receptores de transplantes de órganos y en los pacientes con infección por VIH.

8. En el 11% no se conoce la vía de transmisión.

La seroconversión se produce 6 semanas después de la infección o 2 semanas luego de la aparición de los síntomas. La detección del VHC ARN Durante estas 6 semanas, las pruebas de anticuerpos dan negativas.

Cuando la infección se cronifica, tiende a ser fluctuante, pero la mayoría permanecen asintomáticos aún con cambios histológicos de cirrosis^{7,8}.

Factores del hospedero que influyen en el curso de la enfermedad:

- Edad mayor de 50 años
- Sexo femenino tiene mejor pronóstico
- Ruta de infección: la infección adquirida por transfusiones evoluciona más tórpidamente que cuando es adquirida por uso de drogas endovenosas.
- Diabetes: Incrementa el riesgo de adquirir HC.
- Sobrecarga de hierro: influencia la progresión a hepatitis C.
- Coinfección con VHB: incrementa la progresión a CHC.
- Abuso de alcohol: incrementa la progresión a Cirrosis.
- Cigarrillo: incrementa el riesgo de CHC^{9,10}.

Tasas de progresión en hepatitis C:

- Casos agudos que se resuelven: 15-25%.
- Casos agudos que evolucionan hacia la cronicidad: 80-85%
- Número de casos crónicos que desarrollan cirrosis:
 - A los 10 años post-infección: 5 a 6%.
 - A los 20 años post-infección: 12 a 15%.
 - A los 30 años post-infección: 18-25%.

- Tasa de ocurrencia de CHC:
 - A los 3 años: 4% desarrolla CHC.
 - A los 5 años: 7% desarrolla CHC.
 - A los 10 años: 14% desarrolla CHC (9,10,11).

Diagnóstico:

Los test para la detección de anti-VHC son el ELISA y RIBA. Tienen el inconveniente que no diferencian entre el 20% que se recupera de la infección y el 80% que evoluciona a la cronicidad.

ELISA: En poblaciones de alto riesgo tiene alta sensibilidad y especificidad. En poblaciones de bajo riesgo, la sensibilidad y especificidad es baja.

RIBA: (Recombinant Immunoblot assay): Confirma o excluye un ELISA positivo. Especialmente de ayuda en poblaciones de bajo riesgo, como donadores de sangre o pacientes positivos para VHC por ELISA pero con ALT normales. Se considera positivo cuando hay reacción con 2 o más antígenos, mientras que cuando solo hay reacción con un antígeno del VHC, se considera indeterminado

El algoritmo diagnóstico para HC, depende del contexto clínico:

I. En sujetos asintomáticos:

1. Asintomáticos de bajo riesgo o donadores de sangre sanos:

- a. Con ELISA de 3ra. generación positivo, el diagnóstico debe ser confirmado, especialmente si las ALT son normales.

- Debe confirmarse por RIBA:

- Aquellos con RIBA positivo o indeterminado deben realizarse RT-PCR o bDNA. El 30% de donadores de sangre RIBA positivo, son negativos para ARN VHC.
- Cuando el RIBA es negativo, se reporta como no reactivo para VHC.

- Puede confirmarse directamente por RT-PCR.

- b. En sujetos asintomáticos de bajo riesgo cuando el ELISA es no reactivo, debe descartarse el VHC.

2. En individuos de alto riesgo, con hepatitis aguda o con compromiso inmunológico, el ELISA de 3^a generación positivo, debe ser confirmado con PCR o bDNA:

- Cuando se detecta el ARN para el VHC, se deberá realizar biopsia hepática. Si se considera el tratamiento, deberá realizarse genotipo y PCR cuantitativo.
- Cuando el ARN no se detecta se debe repetir en 6 meses.

II. En pacientes con enfermedad hepática crónica y ALT elevadas:

1. Con ELISA positivo para VHC: si no hay positividad para otros virus de hepatitis, no requiere prueba confirmatoria, ya que el 90% tienen RIBA positivo y el 78 a 98% tienen ARN VHC detectable.

2. El ELISA puede dar un 10% de falsos negativos en pacientes inmunosuprimidos, por lo tanto, en pacientes inmunosuprimidos sintomáticos con ELISA negativo debe realizarse determinación de ARN VHC.

VHC ARN: Un solo test negativo no excluye la infección porque el curso de la HC crónica es intermitente.

El RT-PCR cualitativo puede ser de ayuda junto con los test de anticuerpos en las siguientes situaciones:

- Para confirmar una infección aguda en un paciente de alto riesgo que aún no ha desarrollado anticuerpos.
- Para distinguir infección crónica de infección pasada en pacientes con ELISA o RIBA positivos.
- Permite confirmar RIBA indeterminado.

El PCR cuantitativo debe realizarse:

- Antes de iniciar terapia con IFN.
- Para evaluar la respuesta del IFN.
- Para ayudar a distinguir anticuerpos adquiridos pasivamente de infección activa en un neonato cuya madre es positiva para VHC.
- No se usa como diagnóstico ^{12,13}.

Estudio genotípico: Solo recomendado previo al tratamiento. Pacientes con

genotipo 1b tienen mayor progresión a cirrosis y CHC y menos respuesta a tratamiento con IFN.

Biopsia Hepática: Constituye el método para evaluar el grado de severidad de la necro-inflamación y la progresión a fibrosis y debe ser recomendada en individuos positivos por ELISA o RIBA que tienen niveles elevados de ALT. La realización de biopsia hepática con ALT normal es controversial, sin embargo, hay reportes en la literatura de evidencias de cambios histológicos en un 30% de pacientes con ALT normales ^{12,13}.

¿Quiénes deben realizarse el ELISA para VHC?

1. El estudio está formalmente indicado en los grupos de alto riesgo:

- Pacientes con Hepatitis Aguda inexplicable (negativos para HA y HB).
- Pacientes con Hepatitis Crónica inexplicable (negativos para HA y HB).
- Niveles elevados y persistentes de ALT.
- Aquellos que han recibido transfusión sanguínea antes de 1987.
- Pacientes hemofílicos.
- Pacientes en Hemodiálisis.
- Sujetos con historia de uso de drogas endovenosas.
- Homosexuales y/o prostitutas.
- Parejas sexuales y/o contactos caseros.
- Donadores de órganos para trasplante.
- Trabajadores de la salud que han sufrido exposición con pacientes infectados: debe realizarse ELISA y ALT cada 4 meses

2. Su indicación es incierta en:

- Receptores de trasplantes.
- Adictos a cocaína.
- Sujetos con tatuos o piercing.
- Embarazadas.

3. No se recomienda la prueba en:

- Población de bajo riesgo ¹⁴.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Diagnóstico
clínico de las
Hepatitis

Criterios para iniciar tratamiento

- Biopsia hepática que evidencie hepatitis activa.
- Test para anticuerpos positivo.
- ALT elevadas. No se recomienda iniciar tratamiento con niveles de ALT normal.
- No estar embarazada.
- No tener historia de hepatitis autoinmune ¹⁵.

Consejería para las personas infectadas

1. Medidas para prevenir mayor daño hepático:

- No ingerir alcohol.
- No ingerir nuevas medicaciones inclusive medicinas naturales sin previa prescripción médica.
- Vacunación contra Hepatitis A y B.

2. Medidas para reducir el riesgo de transmisión a otras personas:

- No donar sangre, órganos, semen u otros tejidos.
- En caso de lesiones en piel que sangren, evitar el contacto con otras personas y cubrirlas.
- Discutir con su pareja que existe un bajo riesgo de transmisión por vía sexual, ya que podrían decidir tomar medidas de protección de barrera.
- Informar a la mujer embarazada que el riesgo de transmisión vertical es bajo: 5% y que no existe data sobre la transmisión por lactancia materna, por lo tanto, no hay contraindicación para el embarazo y pudiera indicarse evitar la lactancia materna.
- No compartir artículos de uso personal: cepillo dental, rasuradora, cortaúñas, vasos, platos, cubiertos.

3. Medidas para evaluar el desarrollo de enfermedad hepática crónica:

- Determinación de enzimas hepáticas y alfa-fetoproteína cada 6 meses ¹⁴.

Factores predictores de respuesta al IFN

- Negatividad para VIH.
- Bajos niveles en suero e Hígado de VHC ARN: menor de 2 millones de copias y ARN indetectable después de 3 meses de tratamiento.
- Bajo peso.
- Ausencia de Cirrosis.
- Otro genotipo del VHC diferente al 1.
- Corta duración de la enfermedad.
- Bajo contenido en hierro hepático.
- Moderada inflamación limitada al tracto portal.
- Mutaciones en la región NSS del virus.
- Normalización de ALT a las 12 semanas de tratamiento.

La meta del tratamiento es tratar de normalizar los niveles de ALT y hacer indetectable en suero el ARN VHC. Algunos pacientes presentan discrepancia entre la respuesta bioquímica y virológica, es decir, pacientes que normalizan los niveles de ALT pero permanecen positivos para el ARN VHC. Estos pacientes tienen más posibilidades de recaídas luego del tratamiento que los pacientes con ALT normales ¹⁵.

Las complicaciones extrahepáticas en infección por VHC son menos frecuentes que en la HB, con la excepción de la Crioglobulinemia Mixta Esencial. Algunos pacientes con HC, tienen positividad para anticuerpos microsomaes y algunos pacientes con hepatitis autoinmune dan falsos positivos para VHC, lo cual puede dificultar el diagnóstico ¹⁶.

HEPATITIS DELTA

El VHD es un virus defectuoso que, puede replicarse solo en presencia del VHB cuya envoltura toma prestada.

La infección de VHD puede ocurrir en dos circunstancias:

- *Coinfección*: primoinfección simultánea de B-Delta, generalmente se presenta en la forma de hepatitis B común. VHD no aumenta el riesgo de progreso hacia la cronicidad. La extinción de la replicación de VHB

automáticamente induce a la eliminación del VHD. En contraste, la combinación de los dos virus aumenta el riesgo a hepatitis fulminante, pero, paradójicamente, el pronóstico de hepatitis fulminante por coinfección es mejor que la Hepatitis por VHB solamente. El pronóstico de coinfección es favorable: generalmente el HBsAg desaparece, hay resolución de la hepatitis B, esto lleva a cura de la Hepatitis Delta.

- **Superinfección:** primoinfección de Delta en un sujeto que ya está infectado crónicamente con VHB. La Superinfección de Delta interfiere con la intensidad de replicación de VHB, llevando a una reducción o hasta la desaparición de los marcadores de la replicación de VHB (HBsAg, VHB-ADN, ADN-polimerasa). En raros casos, esta interferencia puede llevar hasta a la pérdida de HBsAg. La primoinfección de VHD en un sujeto infectado crónicamente con VHB generalmente causa un episodio de hepatitis aguda y, ocasionalmente, hepatitis fulminante. En la mayoría de los casos, a pesar de la forma clínica de la primoinfección, la replicación de VHD persiste y la enfermedad progresa muy rápidamente hacia hepatitis crónica activa. La gravedad de las lesiones hepáticas es probablemente causa de un efecto directo cito patológico de VHD. La replicación de VHB no desaparece lo que permite la instalación de replicación crónica de VHD¹⁷.

Modos de transmisión

Estudios epidemiológicos han confirmado la posibilidad transmisión sexual y parenteral de VHD. En contraste, la transmisión de madre a hijo, que corresponde a coinfección, no parece jugar un papel predominante de transmisión. Disminuyendo la intensidad de replicación de VHB, el VHD limita su propio nivel de infección¹⁷.

Epidemiología

En los países mediterráneos la infección delta es endémica entre los sujetos con

hepatitis B, y la enfermedad se transmite preferentemente por vía no percutánea, sobre todo por contacto personal íntimo. En las zonas no endémicas, como Estados Unidos y norte de Europa, la hepatitis por VHD se limita a las personas con exposición frecuente a sangre y hemoderivados, en particular, drogadictos y hemofílicos.

El periodo de incubación de la hepatitis D oscila entre 30 y 180 días. Pueden transcurrir 30 a 40 días desde la aparición de los síntomas hasta que el HDAc se hace detectable.

De manera típica, la hepatitis delta aguda se acompaña de un patrón bifásico de transaminasas, con un pico causado por el daño celular hepático inducido por el VHB y el otro por el agente Delta.

Diagnóstico serológico de Hepatitis Delta

El diagnóstico de hepatitis Delta sólo puede ser sugerido cuando el HBsAg es positivo, y el HBcAc IgM constituye un marcador clave, ya que puede hacer la diferencia entre coinfección (HBcAc IgM positivo) y la Superinfección (HBcAc IgM negativo).

El antígeno de HD (HDAg) dura de 1 a 4 semanas. El anticuerpo contra HD (HDAc) aparece tarde en el curso de la enfermedad: esto resulta en un periodo de ventana de duración variable, dependiendo de las pruebas utilizadas, entre la desaparición del HDAg o su ausencia en el comienzo de la hepatitis aguda y la aparición de HDAc. Anti-HD IgM es detectado por un periodo acerca de 3 meses¹⁷.

VHD-ARN puede ser detectado por hibridación molecular.

Hepatitis Delta crónica

La hepatitis Delta crónica casi siempre es el resultado de una superinfección. La coinfección solo progresa excepcionalmente hacia la cronicidad.

Dos tipos de perfiles serológicos son posibles:



- *Perfil serológico clásico.* Después de antigenemia transitoria durante la fase aguda de la superinfección, HDAc IgM se convierte en el único indicador serológico de infección de VHD y su desaparición puede ser interpretada como cura de la infección por Delta.
- *Perfil serológico particular:* antigenemia persistente del virus Delta con o sin HDAc asociado. Tal perfil serológico parece estar relacionado con la serología positiva para el VIH.

Prevención

La prevención de hepatitis B y hepatitis Delta es la misma. La vacuna contra la VHB previene efectivamente la hepatitis delta.

HEPATITIS E

Sus características epidemiológicas son similares a las de la hepatitis A. No se ha demostrado la transmisión por vía sanguínea. Las epidemias en la India, Pakistán, África, Sudeste Asiático, Asia Central y México parecen relacionarse con la contaminación del agua potable.

Esta enfermedad se asocia con una elevada mortalidad (10%-20%) en las mujeres embarazadas.

El periodo de incubación de la hepatitis E oscila entre 14 y 60 días.

El virus de hepatitis E (VHE) se excreta por las heces durante la fase final del periodo de incubación. Es posible detectar anticuerpos anti-VHE de los tipos IgM e IgG, pero sus títulos disminuyen rápidamente tras la infección aguda, llevando a niveles muy bajos a cabo de 9 a 12 meses.

HEPATITIS G.

Es transmitida por vía parenteral en aproximadamente 1 a 2% de individuos sanos. No existen datos acerca de infección adquirida en la comunidad y poco se sabe de su asociación con hepatitis viral fulminante y hepatitis crónica¹⁸.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ et al: Hepatitis Viral Aguda. Principios de Medicina Interna. 16ta edición; Vol. 2, (266):1676-1698.
2. Stein YH.: Hepatitis Viral e inmune. Medicina Interna 1998; Vol 1(89):599-610.
3. Keeffe EB.: Is Hepatitis A more severe in patients with chronic hepatitis B and other chronic liver disease? Am J Gastroenterol 1995; 90(2):201-205.
4. Lee W.: Hepatitis B Virus Infection. N England J Med 1997; 337: 1733-1745.
5. Irwin GR, Allen AM, Segal HE et al. Persistence of antibody to hepatitis B surface antigen. J Clin Microbiol 1976; 3(5):465-468.
6. Zimmerman RK, Ruben FL, Ahwesh ER. Hepatitis B virus infection, hepatitis B vaccine and hepatitis B immune globulin. J Fam Pract 1997; 45(4):295-315.
7. Ebeling F.: Epidemiology of the hepatitis C virus. Vox sang 1998; 74 Suppl2:143-146.
8. Lunel F, Stuyver L, Brechot C.: Update on hepatitis C virus: its variability and the implications. Transfus Clin Biol 1998; 5(2):147-165.
9. Sharara AI, Hunt CM, Hamilton JD.: Hepatitis C. Ann Intern Med 1996; 125:658-668.
10. EASL (The European Association for the Study of Liver Disease). International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 1999; 26-28.
11. Hoofnagle JH. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. Hepatology 1997; 26(3 Suppl 1):15S-19S.
12. Schiff ER, Medina M, Kahn RS.: New perspectives in the diagnosis of Hepatitis C. Sem in Liver Dis 1999; 19(Suppl 1):2-14.
13. Lok AS, Gunaratnam NT: Diagnosis of Hepatitis C. Hepatology 1997; 26(Suppl 1):48S-56S.
14. Recommendations for prevention and control of Hepatitis C Virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. MMWR October 16, 1998; 47(RR-19).
15. Herrine SK.: Controversial issues in HCV. American Association for the Study of Liver Disease 50th Annual Meeting. 1999.
16. McHutchison JG.: What's new clinically in viral hepatitis? Digestive Disease Week May 16, 1999.
17. Dubois F, Goudeau A.: Serological diagnosis of Hepatitis B and Delta. Diagnostics Pasteur 1999.
18. Batis KP.: Hepatitis G. A virus in search of a disease. Am J of Clin Pathol 1998; 108 (6): 616-618.



Acta Científica

de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Contenido

Biología de los Virus de Hepatitis Dra. Flor Helene Pujol	5
Variabilidad genética del virus de la Hepatitis B y sus implicaciones M. Sc. Marisol Devesa. Lic. Carmen Luisa Loureiro	13
Infección oculta por el virus de la Hepatitis B (VHB) M. Sc. Cristina del Rosario Gutiérrez G.	29
Biología Molecular del virus de Hepatitis C Dr. Félix Toro	39
Marcadores Serológicos en las Hepatitis Virales Dra. Patricia Chacón, Dr. Carlos Aponte	53
Diagnóstico Clínico de las Hepatitis Dra. Patricia Mantilla Guevara	66
Tipsciences	80