

Aportes al estudio de los mecanismos patogénicos del VHC y sus implicaciones en la comprensión de la enfermedad

✉ Viviana Falcón¹, Santiago Dueñas¹, Ivón Menéndez¹, María Cristina de la Rosa¹, Juan Morales¹, José Á Silva¹, Emilio F Acosta⁴, Félix Álvarez¹, Jesús Seoane¹, Zurina Cinza¹, Glay Chinae¹, Jorge V Gavilondo¹, Celia Fernández¹, Dionne Casillas¹, Verena Muzio¹, Eduardo Pentón¹, Hugo Nodarse¹, Liz Álvarez-Lajonchere¹, Gillian Martínez¹, Ivís Guerra¹, Eddy E González¹, Bienvenido Gra², Enríquez Arús², Eduardo Vidal², Julio César Hernández³, Mineko Shibayama⁵, Edel Torres⁶, José Luna-Muñoz⁵, Magdalena Miranda-Sánchez⁵, Juan Kouri⁵, Víctor Tsutsumi⁵, Gerardo Guillén¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB. Ave. 31 e/ 158 y 190, AP 6162, CP 10600, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: viviana.falcon@cigb.edu.cu

² Instituto de Gastroenterología, Ciudad de La Habana, Cuba

³ Centro de Investigaciones Médicas y Quirúrgicas, Ciudad de La Habana, Cuba

⁴ Escuela Latinoamericana de Medicina, Ciudad de La Habana, Cuba

⁵ CINVESTAV, México

⁶ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, S Spíritus, Cuba

RESUMEN

Se estudiaron por microscopía electrónica de transmisión y confocal, biopsias hepáticas y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en 150 pacientes cubanos con hepatitis C crónica. Se hallaron elementos novedosos acerca de la detección de la cápsida del VHC en células extraparenquimatosas del hígado. Se visualizó la presencia de apoptosis en las células hepáticas y en CMSP mediante la técnica TUNEL y la activación de efectores de la apoptosis. Se observó por primera vez, la presencia de cadena positiva y negativa en hepatocitos y en CMSP en más del 80% de las muestras analizadas de pacientes ARN negativo en suero, con mejoría histológica y bioquímica. Se mostró por primera vez, que las células extraparenquimatosas del hígado y las CMSP constituyen reservorios para la replicación del VHC. La presencia en las células estrelladas del AgcHC y de las partículas del núcleo del VHC, detectadas por primera vez, mostraron que el VHC puede infectar directamente a estas células y su transdiferenciación en células similares a miofibroblastos, lo que modula así el proceso de fibrogénesis hepática y demuestra que junto a los fibroblastos, las células estrelladas desempeñan una función relevante en la fibrosis hepática. La aplicación de estos conocimientos tiene implicaciones importantes para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la enfermedad de referencia.

Palabras clave: Virus Hepatitis C, proteína de la cápsida, AgcHC, Células Mononucleares de Sangre Periférica, Microscopía Electrónica de Transmisión

Introducción

Actualmente, los procesos celulares y moleculares implicados en los mecanismos patogénicos del hígado en pacientes infectados con el VHC no están bien dilucidados.

En Cuba, mediante microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal se estudiaron las biopsias hepáticas y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en 150 pacientes con hepatitis C crónica.

Técnicas aplicadas y resultados

En las muestras analizadas de pacientes cubanos, se detectó la presencia de la proteína de la cápsida (AgcHC) del virus de la hepatitis C humana (VHC) en hepatocitos y en células “no parenquimatosas”. Se observó también la presencia de ARN de cadena positiva y negativa en hepatocitos y en CMSP en más del 80% de los pacientes negativos para ARN viral en suero.

Mediante la técnica TUNEL y la activación de efectores de la apoptosis (caspasas 3 y 7) se visualizó en células hepáticas y en CMSP la presencia de

apoptosis. Se detectó que las células extraparenquimatosas del hígado (células Pit, endoteliales, Kupffer, y células estrelladas) y las CMSP son reservorios para la replicación del VHC.

Al aplicar la técnica de inmunomicroscopía electrónica se detectó la relación existente entre la apoptosis mediada por los sistemas Fas y TNF y la lesión hepática, esteatosis hepática, cronicidad de la infección por VHC y hepatocarcinoma. Se detectó por primera vez la presencia del AgcHC y de partículas de la cápsida del VHC en células estrelladas, las cuales demostraban que el VHC puede infectar directamente a estas células y transformarlas en células similares a miofibroblastos y modular así el proceso de fibrogénesis hepática.

Adicionalmente se detectó en los pacientes estudiados que la capacidad de producir fibrosis y cirrosis a corto plazo se correlacionó con el incremento en el número de células estrelladas y fibroblastos, parámetro de valor diagnóstico para pronosticar el desarrollo de estas enfermedades. También mediante este método se

evidenció el proceso de apoptosis en hepatocitos de pacientes con infección crónica por el VHC.

Con la microscopía electrónica de transmisión (MET) se detectaron signos de apoptosis (constricción celular, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos, fagocitosis de células vecinas) y fragmentación del ADN nuclear mediante la técnica de TUNEL.

En ensayos de inmunocitoquímica se observó la activación de efectores de la apoptosis (caspasas 3 y 7) y la asociación del AgcHC con el retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, así como en el núcleo de hepatocitos apoptóticos. Además, el antígeno E1 se inmunolocalizó en citoplasma y mitocondrias de algunos hepatocitos y se detectó la presencia de cuerpos cristaloides colocalizados con este antígeno. Estos datos sugirieron que la localización intracelular de componentes del VHC, el AgcHC y el antígeno E1 está directamente vinculada con la apoptosis y la patogénesis de la enfermedad [1].

El ARN del VHC de polaridad positiva y negativa se detectó en el 80% de los casos de pacientes negativos para el ARN en suero, tanto en muestras de hepatocitos como en CMSP figura 1. La proporción de la expresión celular de la cadena negativa fue menor que la de la cadena positiva en el hígado de los pacientes. Se detectó además dentro de los hepatocitos, los antígenos del core, E1 y E2. Las señales de hibridación e inmunofluorescencia se localizaron en el citoplasma, lo que indicaba que este es el sitio de replicación activa del VHC. No hubo diferencia significativa de la expresión celular en ambas cadenas en las CMSP. Estos resultados proporcionaron evidencias sobre la posible persistencia de la forma replicativa intermedia del genoma del VHC en el hígado y CMSP de pacientes crónicos con resolución clínica aparente de la infección por el VHC [2].

Por otra parte, se mostró por inmunomicroscopía electrónica la presencia del AgcHC en las células

hepáticas “no parenquimatosas” de pacientes con VHC, específicamente en citoplasma y núcleo de linfocitos, células Kuffer, Pit, endoteliales, estrelladas y en fibroblastos. También se localizó en los canalicúlos biliares, lo que sugirió la implicación del sistema biliar en la enfermedad de referencia.

Los datos obtenidos sugirieron que las células hepáticas “no parenquimatosas” pueden constituir un reservorio para la replicación del VHC. Además, este virus puede contribuir a modular la función inmune, la fibrosis y la esteatosis en hígado [3].

También se evidenció en el estudio realizado, la presencia de partículas similares a la nucleocápsida del VHC en el núcleo de hepatocitos de pacientes crónicos infectados con el VHC. Estas partículas fueron similares en tamaño y forma a las partículas recombinantes del AgcHC purificadas en células de *Pichia pastoris*. Además, la proteína del core del VHC se detectó en citoplasma, núcleo y nucléolo de hepatocitos, mediante inmunomicroscopía electrónica. Este hallazgo constituye el primer reporte sobre la localización nuclear de la proteína del core del VHC y partículas similares a la nucleocápsida en hepatocitos durante la infección por VHC *in vivo* [4].

Relevancia del estudio

La importancia del estudio realizado radicó en que se observó por primera vez, la presencia de ARN de cadena positiva y negativa del VHC en hepatocitos y CMSP en más del 80% de los pacientes cubanos estudiados con hepatitis C crónica y negativos para ARN viral en suero. Ello mostró que las células extraparenquimatosas del hígado y las CMSP constituyen reservorios para la replicación del VHC. Estas evidencias dan respuesta a interrogantes sobre la reinfección a corto plazo de pacientes trasplantados de hígado.

Se detectó también por primera vez, la presencia del AgcHC y partículas de la cápsida del VHC en células estrelladas, lo que demuestra que el VHC puede

1. Falcón V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, Luna-Muñoz J, Miranda-Sanchez M, Gavilondo J, et al. Detection of HCV components and pathological reactions in apoptotic hepatocytes from chronically HCV-infected patients. *Am J Infect Dis* 2005;1(1):12-24.

2. Falcón V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, Luna-Muñoz J, Miranda-Sanchez M, de la Rosa MC, et al. Evidences of hepatitis C virus replication in hepatocytes and peripheral blood mononuclear cells from patients negative for viral RNA in serum. *Am J Infect Dis* 2005;1(1):34-42.

3. Falcón V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, China G, Gavilondo JV, de la Rosa MC, et al. HCV core protein localizes in the nuclei of nonparenchymal liver cells from chronically HCV-infected patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329:1320-8.

4. Falcón V, Acosta-Rivero N, China G, de la Rosa MC, Menéndez I, Dueñas-Carrera S, et al. Nuclear localization of nucleocapsid-like particles and HCV core protein in hepatocytes of a chronically HCV-infected patient. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:54-8.

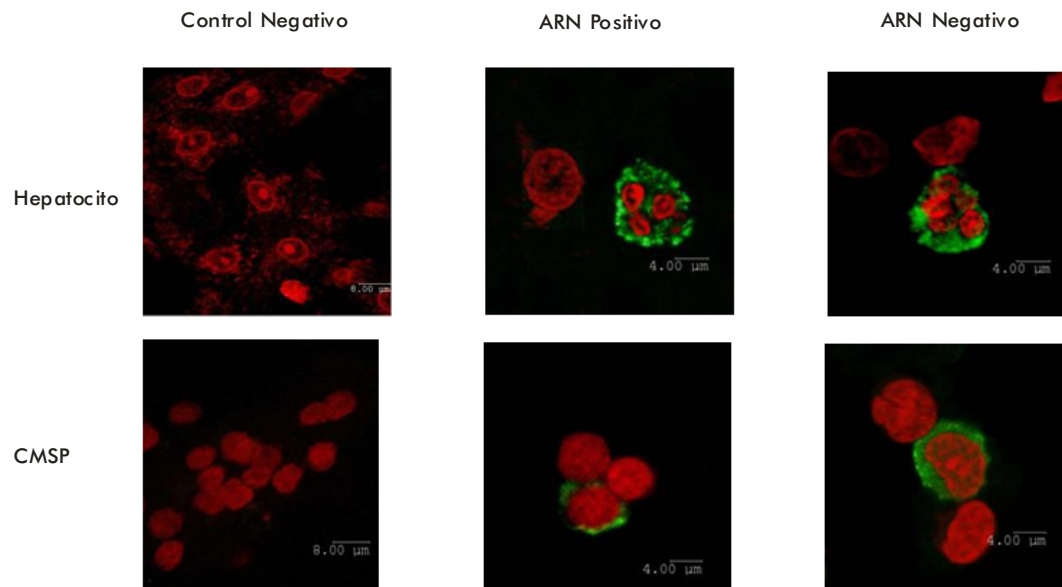


Figura 1. Se observó la presencia de ARN de cadena positiva y negativa en hepatocitos y en CMSP (la marca verde) en más del 80% de las muestras analizadas, de pacientes ARN negativos en suero

infectar directamente a estas células, transformarlas en células similares a miofibroblastos y modular así el proceso de fibrogénesis hepática.

Puede afirmarse que el estudio de CMSP por MET constituye un método rápido confirmativo de la infección por VHC, muy importante para el criterio de evolución-curación de la enfermedad y con gran aplicación práctica.

El presente estudio se realizó por primera vez en pacientes cubanos con VHC negativo para el ARN en suero, con mejoría histológica y clínica y ARN de cadena negativa (replicación viral) en sus CMSP y hepatocitos.

Conclusiones

El estudio realizado aporta novedosas contribuciones a los mecanismos patogénicos del VHC. La aplicación de

los conocimientos obtenidos sobre la infección crónica por VHC constituye una prioridad para el enfrentamiento de este importante problema de salud. Desde el punto de vista científico, los resultados descritos brindan información relevante en cuanto a los procesos celulares implicados en la patogénesis del VHC.

El criterio generado, avalado por publicaciones científicas, contribuye de forma significativa a detectar por MET la presencia de replicación viral en CMSP y hepatocitos de pacientes ARN negativo en suero y aporta una mejor comprensión del manejo adecuado para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de los pacientes crónicos con VHC. Estos conocimientos pudieran incorporarse a la valoración de futuros ensayos clínicos para esta infección.