

Original

Variabilidad del virus de la hepatitis C e inhibición de las rutas del interferón

B. Fernández¹, M. Basaras¹, S. Blanco², S. Sánchez¹, E. Arrese¹, B. de las Heras² y R. Cisterna^{1,3}

¹Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao; Servicios de ²Digestivo y ³Microbiología, Hospital de Basurto, Bilbao

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo principal determinar la hipotética relación entre la variabilidad de la región PePHD (relacionada con la codificación de un pseudosustrato para una enzima viral) del virus de la hepatitis C y la evolución de la terapia con interferón, con el fin de determinar si la aparición de mutaciones en esta región es el factor determinante de la respuesta al tratamiento. El valor que expresa la variabilidad es la detección de un elevado número de cuasiespecies. Para ello se emplearon técnicas ya utilizadas en estudios anteriores, como la transcripción inversa, la doble amplificación (RT-PCR anidada) y SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism). Se analizaron 24 enfermos, todos ellos infectados crónicamente por el virus de la hepatitis C. Se clasificaron en tres grupos diferentes dependiendo de la respuesta a la terapia: 8 pacientes con respuesta sostenida, 8 pacientes con respuesta parcial y 8 pacientes no respondedores. Todos los casos analizados presentaron un grado de heterogeneidad bajo. Este resultado se obtuvo independientemente de otros factores relacionados con la falta de respuesta, como son la edad y el sexo de los pacientes o el genotipo del virus. El hecho de que la secuencia sea tan poco variable indica que es una región funcionalmente importante para la persistencia viral. Se necesitan estudios más profundos para determinar el papel que realmente tiene esta región en las interacciones de la célula y el virus.

Palabras clave: Virus de la hepatitis C - Enzima PKR - Región PePHD - Interferón - Variabilidad genética

Hepatitis C virus variability and interferon-mediated pathway inhibition

SUMMARY

The most important aim of this study was to describe the hypothetical relationship between the PePHD region variability (related to the synthesis of a cellular enzyme pseudosubstrate) of the hepatitis C virus and the response of patients to interferon therapy. This interaction could be a determining factor in the antiviral effect of interferon. All samples (from 24 patients with chronic hepatitis C infection) were analyzed using a previously described method based on RT-PCR and nested PCR mediated by single-strand conformation polymorphism assay (SSCP). The patients were divided into three groups with respect to the response to therapy: 8 patients with sustained response, 8 patients with transient response and 8 nonresponders. In all samples a low genetic heterogeneity pattern was detected, which was independent of other factors involved in the lack of response to treatment, such as age, sex or viral genotype. This genetic homogeneity is an indirect indication of the importance of the region on viral persistence. However, more studies are needed to evaluate the real role of this sequence on the interaction between cells and the virus.

Key words: Hepatitis C virus - PKR enzyme - PePHD region - Interferon - Genetic variability

INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una infección extendida por todo el mundo y que afecta aproximadamente a un 3% de la población mundial. La diana del virus de la hepatitis C (VHC) es el hepatocito, y puede producir una cirrosis o incluso un hepatocarcinoma. Una de las características más peculiares de esta infección es su elevada tasa de cronicidad, que a su vez es la que permite que se produzca el daño hepático con el paso de los años. Esta persistencia pone de relieve la gran capacidad del virus para eludir todos los sistemas de defensa del huésped. Además, en la actualidad, no existen fármacos que actúen sobre dianas específicas para interrumpir el ciclo de replicación viral. El único tratamiento disponible es la administración por vía parenteral de interferón (pegilado en los tratamientos más avanzados) con o sin rivabirina, pero su efectividad no es elevada (40% a 45%) y origina numerosos efectos secundarios.

En términos generales, el interferón desencadena una cascada de reacciones dentro de las células eucariotas que desembocan en la inhibición de la síntesis proteica y la apoptosis celular, evitando así la realización del ciclo viral y la propagación. Uno de los factores que inicia estas reacciones antivirales es la detección en el interior celular de un RNA bicatenario, producido normalmente en la replicación de numerosos virus. Esta molécula induce la activación de la enzima PKR, una proteincinasa que forma parte de las reacciones que producen la síntesis de interferón celular; sin embargo, parece ser que el VHC es capaz de inhibir la acción de la PKR. El mecanismo fue propuesto por Taylor y cols. en 1999 (1) y se basa en la existencia, dentro del gen E2 del VHC, de una secuencia similar al sitio de fosforilación de eIF-2 (*eukaryotic Initiation Factor 2 alpha phosphorylation homology domain*), diana de la enzima PKR. Esta secuencia se ha denominado PePHD (*PKR- eIF-2 Phosphorylation Homology Domain*), consta de 12 aminoácidos y actúa como un pseudosustrato, impidiendo por tanto que las rutas antivirales continúen (2).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que el VHC presenta una elevada variabilidad dentro del genoma, debido a que al replicarse mediante RNA polimerasa se puede originar una gran cantidad de variantes genéticamente cercanas denominadas cuasiespecies, que son sometidas a la presión evolutiva del medio. Aquellas que presenten un mejor mecanismo de supervivencia podrán a su vez diferenciarse en las generaciones posteriores, constituyendo un nuevo reservorio de variantes que pueden ser resistentes. Por tanto, y a falta de medios de cultivo que permitan analizar en profundidad el comportamiento del VHC en el interior celular, el estudio de la resistencia y de la variabilidad genética que la origina se convierte en un arma de gran importancia pa-

ra entender las bases de la patogenicidad y la persistencia de la infección en el huésped.

El objetivo del presente trabajo ha sido analizar la relación entre la existencia de mutaciones en la región PePHD (expresada como la presencia de elevada variabilidad) y el tipo de respuesta clínica de los pacientes al tratamiento con interferón alfa (IFN- α).

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se estudiaron 24 pacientes del Servicio de Digestivo del Hospital de Basurto en Bilbao, diagnosticados de hepatitis crónica C sin evidencia de otra causa de enfermedad hepática y tratados durante un año con IFN- α , 3 MU tres veces por semana. Las muestras de suero se obtuvieron antes del tratamiento, a los 6 y 12 meses de tratamiento y 6 meses después de finalizarlo.

Los pacientes estudiados tenían una edad media de 38,08 años y la proporción de mujeres y hombres fue 8/16.

En relación con la respuesta al tratamiento dividimos a los pacientes en tres grupos:

- Ocho pacientes con respuesta sostenida: normalización de las transaminasas y no detección del genoma viral al finalizar el tratamiento y a los 6 meses.
- Ocho pacientes con respuesta parcial: normalización transitoria de las transaminasas y detección continuada del genoma viral.
- Ocho pacientes no respondedores: sin normalización de las transaminasas y detección continuada del genoma viral.

Extracción y detección del genoma viral

A partir de 100 μ l de suero se llevó a cabo el proceso de extracción del RNA de las muestras mediante una solución de lisis con SDS y proteinasa K seguido de fenol-clorofor-mo-isoamilalcohol. Para poder analizar la heterogeneidad de las muestras se desarrolló en nuestro laboratorio una doble amplificación (RT-PCR anidada) del genoma viral seguida de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*). Los iniciadores empleados derivan de las regiones conservadas que flanquean la región hipervariable.

La síntesis del DNAc se realizó empleando 16,5 pmol de iniciador externo antisentido y 10 U de transcriptasa inversa (Promega) y 20 U de RNasina (Promega) a 42 °C durante 60 minutos.

Tras la transcripción inversa se realizó la primera amplificación, empleando 1 U de Taq DNA polimerasa (Boehringer Mannheim) y 20 pmol de iniciador sentido y 8 pmol de iniciador antisentido. Las secuencias de los iniciadores

fueron las siguientes (3): 5'-TGA CTA CCC ATA CAG GCT CT-3' (nucleótidos 1826-1845) y 5'-AAG GAA GGA GAG ATT GCC AT-3' (nucleótidos 2288-2307). Las secuencias de los iniciadores para la segunda amplificación fueron: 5'-AAG GTT AGG ATG TAT GTG GG-3' (nucleótidos 1881-1900) y 5'-ATT GAG GAC CAC CAG GTT CT-3' (nucleótidos 2246-2265), obteniendo un producto final de 384 pares de bases.

Las condiciones de la reacción de amplificación en el termociclador fueron las siguientes: tras una desnaturalización a 95 °C durante dos minutos, el DNAC fue amplificado durante 40 ciclos (95 °C un minuto, 50 °C un minuto, 72 °C dos minutos) con una elongación final de diez minutos a 72 °C. Para realizar la segunda amplificación se utilizaron 5 µl de la primera, repitiéndose los mismos ciclos de amplificación. El producto final se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio y posterior exposición a luz ultravioleta.

Análisis de cuasiespecies

Para realizar el análisis de cuasiespecies se ha utilizado el método descrito previamente (4), basado en una técnica denominada SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) y posterior tinción con plata.

Genotipificación del VHC

La genotipificación de las muestras se realizó mediante PCR anidada empleando iniciadores para la región del core, seguida de hibridación con sondas de oligonucleótido VHC específicas de subtipo marcadas con 5'-biotina para detectar cada subtipo mediante DEIA (*DNA Enzyme Immunoassay*) como se ha descrito previamente (5).

RESULTADOS

En este estudio se ha analizado la variabilidad de la región PePHD del genoma del VHC en un total de 24 pacientes crónicamente infectados. Mediante la técnica SSCP se determinó arbitrariamente que una elevada variabilidad consistía en un número de bandas superior a cinco, tal como se determinó en estudios anteriores. El número de bandas observadas en el presente trabajo varía entre dos y cinco. Por tanto, todas las muestras presentaron un bajo grado de variabilidad, es decir, la población de cuasiespecies presenta una relativamente baja heterogeneidad (Fig. 1).

Al analizar en el mismo paciente las muestras obtenidas a lo largo del tratamiento no se han detectado cambios apreciables en el número y posición de las bandas, sugiriendo

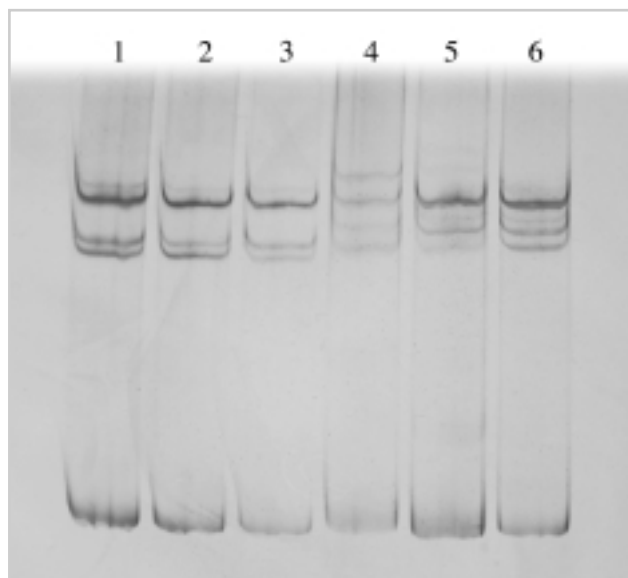


Figura 1. Cuasiespecies detectadas en la región PePHD del virus de la hepatitis C en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata obtenidas al inicio, a los 6 meses y después de haber finalizado el tratamiento. Pocillos 1-3: paciente con genotipo 1b con respuesta parcial. Pocillos 4-6: paciente con genotipo 3a con respuesta parcial.

que no hay cambios en las secuencias que infectan al paciente; sin embargo, no en todas las muestras se obtienen las mismas bandas. Este hecho indica que a pesar de no existir variabilidad, y por tanto evolución dentro de un mismo paciente, no todos los pacientes comparten las mismas secuencias.

En los pacientes no respondedores se detectaron dos a cuatro bandas. En el caso de los respondedores el número fue de dos o tres bandas, a excepción de una muestra que presenta cinco bandas en total, observándose además una cierta variabilidad. Los pacientes que respondieron parcialmente al tratamiento presentan tres o cuatro bandas. Por tanto, el número y la posición de las bandas no constituyen una diferencia a tener en cuenta en los pacientes con distintos tipos de respuesta final al tratamiento.

En cuanto al análisis del genotipo viral, el 8,33% de los pacientes estaban infectados por el genotipo 1a, el 45,83% por el genotipo 1b, el 4,17% por el genotipo 2 y el 41,67% por el genotipo 3a. En cuanto a la variabilidad detectada en cada genotipo, los individuos infectados por el genotipo 1 presentaron entre dos y cinco bandas; en los pacientes con genotipo 1b se detectaron dos a cuatro bandas y en los de genotipo 1a de dos a cinco, por lo que tampoco hay diferencias entre estos dos subtipos. En los infectados por el genotipo 2 se detectaron tres bandas; todos los pacientes infectados por el genotipo 3a presentaban tres o cuatro bandas. En una de esas muestras se produce una cierta variabilidad, sobre todo al final del tratamiento. Por tanto, no hay

Tabla 1. Representación de la diferente variabilidad de las dos regiones encontradas en el gen E2 del VHC.

	Pacientes con elevada variabilidad	Pacientes con baja variabilidad
Región HVR-1	6	6
Región PePHD	0	24

diferencias en las cuasiespecies en las infecciones por los distintos genotipos.

Según la edad y el sexo tampoco hay diferencias significativas en cuanto a variabilidad.

La escasa variabilidad de la región PePHD contrasta con la detectada en otras regiones del mismo gen, como es el caso de la HVR 1 (región hipervariable 1). En esta región se ha comprobado la existencia de una mayor variabilidad y una relación entre el menor número de cuasiespecies y la respuesta al tratamiento (Tabla 1). El número máximo de cuasiespecies detectado en el caso de la PePHD ha sido de cinco bandas, mientras que en el caso de la HVR fue de 12. También hay que indicar que las bandas de un mismo paciente variaban a lo largo del tiempo en la mayoría de los casos, mientras que en el presente estudio las bandas no varían durante la terapia.

DISCUSIÓN

El virus de la hepatitis C carece de un mecanismo de reparación innato, con lo que se producen numerosas mutaciones en la replicación viral. Además, no todas las regiones del genoma presentan el mismo grado de variabilidad, siendo por ejemplo las menos variables las regiones 5' UTR, core, NS5B y NS3, y las más variables aquellas que forman parte de las dos proteínas de la envuelta, como la E1 y E2 (6).

Varias han sido las regiones del genoma que se han considerado como posible causa de la falta de efectividad del tratamiento aplicado a los pacientes infectados por el VHC, como son las regiones hipervariables del gen E2, la región ISDR (*Interferon Sensitive Region*) del gen NS5A, etc. En el caso del presente estudio, el objeto de análisis es otra zona del gen E2, la denominada PePHD, que ha sido localizada (7) entre los aminoácidos 665 y 676. Esta región, de pequeño tamaño, se encuentra en un gen que codifica una glucoproteína estructural. El interés de esta secuencia se encuentra en la similitud que posee con el sustrato natural de una proteína que forma parte de los mecanismos de resistencia celulares. Tal característica permitiría a este fragmento no funcionar como una proteína estructural, sino co-

mo un pseudosustrato para la enzima PKR. En el caso de que se produzcan mutaciones en esa secuencia se inhabilitaría la unión y el paciente respondería teóricamente a la terapia con IFN. Gale y cols. (8) han demostrado la inhibición funcional de la PKR por la proteína NS5A en pacientes infectados por el genotipo 1. De esta manera se escaparía de los efectos del IFN, pero hasta el momento dicha relación sólo ha sido demostrada *in vitro*. Con todo, al aplicar la técnica no se han detectado cambios lo suficientemente significativos como para afirmar que podría existir una relación entre la presencia de mutaciones en la región PePHD y el tipo de respuesta clínica. A pesar de que los pacientes presentaban una respuesta clínica diferente, no se han detectado diferencias en el tipo de variabilidad, por lo que no podemos establecer ninguna clase de correlación entre secuencia y resistencia.

Mediante el empleo de esta misma técnica se ha determinado en otras regiones la existencia de correlación, como es el caso de la HVR 1. Por tanto, la técnica empleada en ambos casos, SSCP, es válida para detectar los cambios. Esta falta de heterogeneidad no puede atribuirse a fallos metodológicos, sino a que el IFN es incapaz de producir cambios en la región PePHD. La variabilidad en la región PePHD, por tanto, no podría considerarse como un factor de predicción del tipo de respuesta al tratamiento. En cuanto a la relación de la variabilidad en esta región y otros factores relacionados con la falta de respuesta al tratamiento, como son la edad, el sexo del paciente y el genotipo, tampoco se ha relacionado la cantidad de cuasiespecies con ninguna de estas características.

Esta conservación de la secuencia refuerza la hipótesis de que es una región funcionalmente importante e imprescindible para la supervivencia; sin embargo, resulta complicado establecer cuál es el papel concreto de esta secuencia, sobre todo teniendo en cuenta que no se conoce totalmente la relación entre las proteínas celulares y virales. Sería imprescindible saber cuál es la función de cada proteína en la replicación, la patogenicidad y la resistencia antiviral.

Como se ha indicado en estudios anteriores (9, 10), hay que tener en cuenta que de la misma manera en que los sistemas antivirales son polifuncionales, los mecanismos de resistencia que presenta el virus pueden tener un carácter sinérgico. Como consecuencia de esto, en el estudio de la variabilidad ha de considerarse el efecto sinérgico de los productos de varias regiones del genoma. Por tanto, aunque no se hayan detectado cambios en la secuencia, ello no significa que no influya en la resistencia a los antivirales, sino que podríamos desconocer el mecanismo que emplea para hacerlo.

Tras el análisis de la población de cuasiespecies sería interesante realizar un estudio más profundo de la secuen-

cia y así encontrar una posible relación entre la presencia de mutaciones y cómo afecta esto a la conformación final de la proteína y al tipo de respuesta. Es posible que un análisis de la estructura secundaria indique una diferenciación entre respondedores y no respondedores. Del mismo modo, podría encontrarse una secuencia predominante, que sería la que dominase el comportamiento de toda la población y determinase la respuesta clínica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a una financiación de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU 00093.327-EA-8065/2000). Las autoras B. Fernández y S. Sánchez disfrutan de sendas becas predoctorales de la U.P.V./E.H.U.

Correspondencia: Bihotz Fernández, Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Apdo. 699, 48080 Bilbao. Tel. 946 015 584. Fax: 944 649 266. E-mail: bihotz_es@yahoo.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., Lai, M.M.C. *Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein*. Science 1999; 285: 107-110.
2. Taylor, D.R., Tian, B., Romano, P.R., Hinnebusch, A.G., Clai, M.M.C., Mathews, M.B. *Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain*. J Virol 2001; 75: 1265-1273.
3. Puig-Basagoiti, F., Sáiz, J.C., Forns, X. y cols. *Influence of the genetic heterogeneity of the ISDR and PePHD regions of hepatitis C virus on the response to interferon therapy in chronic hepatitis C*. J Med Virol 2001; 65: 35-44.
4. Fernández, B., Basaras, M., Blanco, S. y cols. *Cuasispecies virales y su implicación en el tratamiento antiviral*. Rev Esp Quimioterap 2002; 15: 49-54.
5. Basaras, M., Lombera, N., de las Heras, B., López, C., Arrese, E., Cisterna, R. *Distribution of HCV genotypes in patients infected by different sources*. Res Virology 1997; 148: 367-373.
6. Major, M.E., Feinstone, S. *The molecular virology of hepatitis C*. Hepatology 1997; 25: 1527-1538.
7. Sarrazin, C., Brukner, M., Herrmann, E. y cols. *Quasispecies of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy*. Virology 2001; 289: 150-163.
8. Gale, M.J., Korth, M.J., Tang, N.M. y cols. *Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by non-structural 5A protein*. Virology 1999; 230: 217-227.
9. Lo, S.Y., Lin, H.H. *Variations within hepatitis C virus E2 protein and response to interferon treatment*. Virus Res 2001; 75: 107-112.
10. Gerotto, M., Dal Pero, F., Pontisso, P., Noventa, F., Gatta, A., Alberti, A. *Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon*. Gastroenterology 2000; 119: 1649-1655.