A microscopic image showing numerous Hepatitis B virus particles. The particles are rod-shaped and have a characteristic surface with small spikes. They are scattered across the field of view, with some appearing in larger numbers. The background is dark, making the orange and yellow particles stand out.

Virus hepatotropos

Lisbeth Berrueta Carrillo
IDIC-ULA, 2009

Causas virales de Hepatitis

- Como manifestaciones de infección general

EBV, Herpes, Citomegalovirus ,fiebre amarilla, fiebre hemorrágica

- Como una manifestación de uno de los virus hepatotropos

Hepatitis B

Hepatitis A

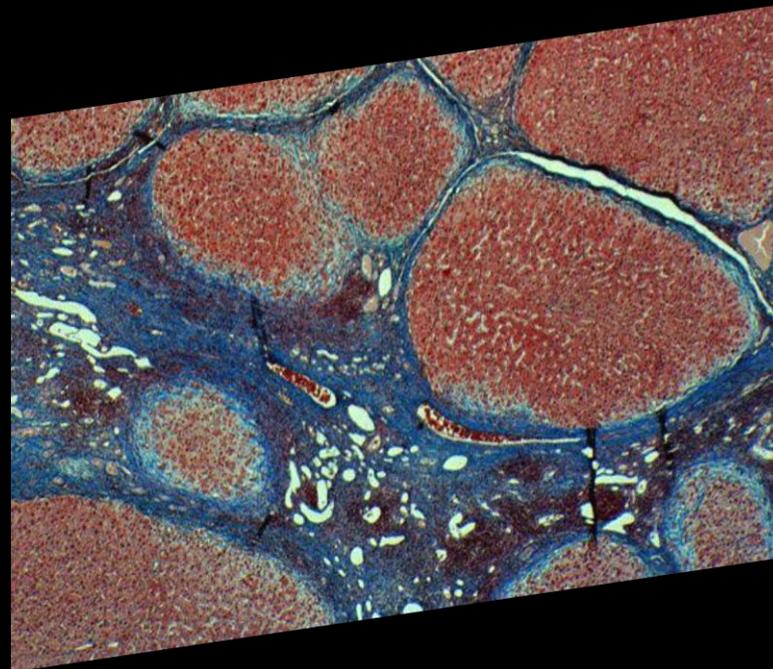
Hepatitis C

Hepatitis E

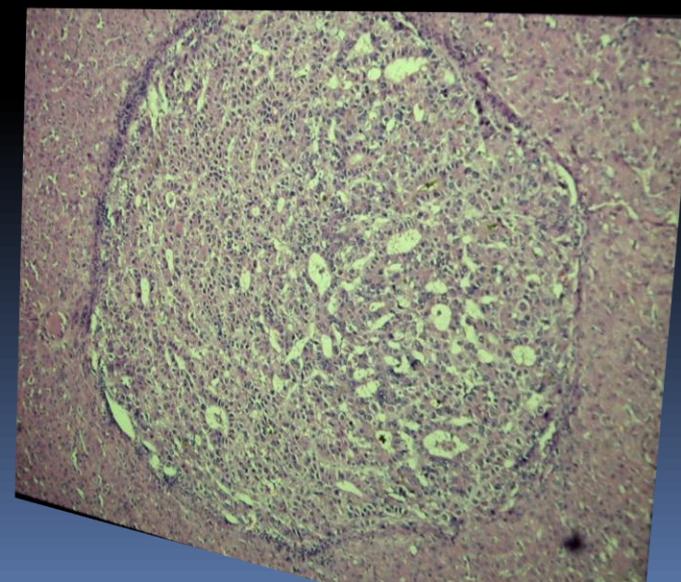
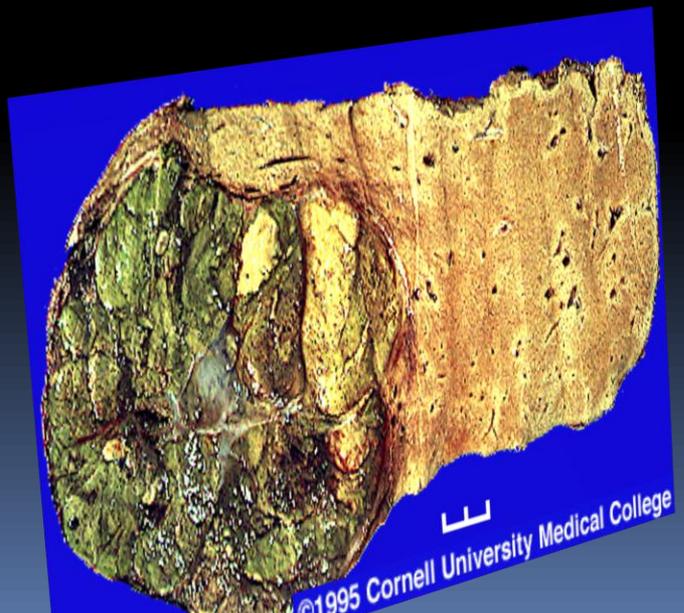
Hepatitis D



Cirrosis hepática con fibrosis



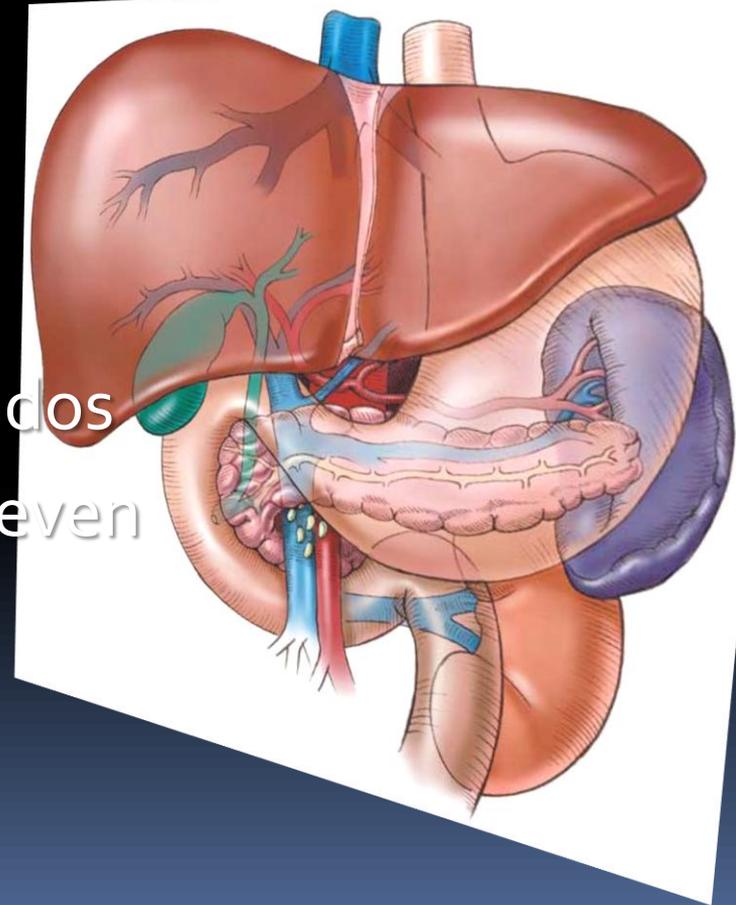
Hepatocarcinoma



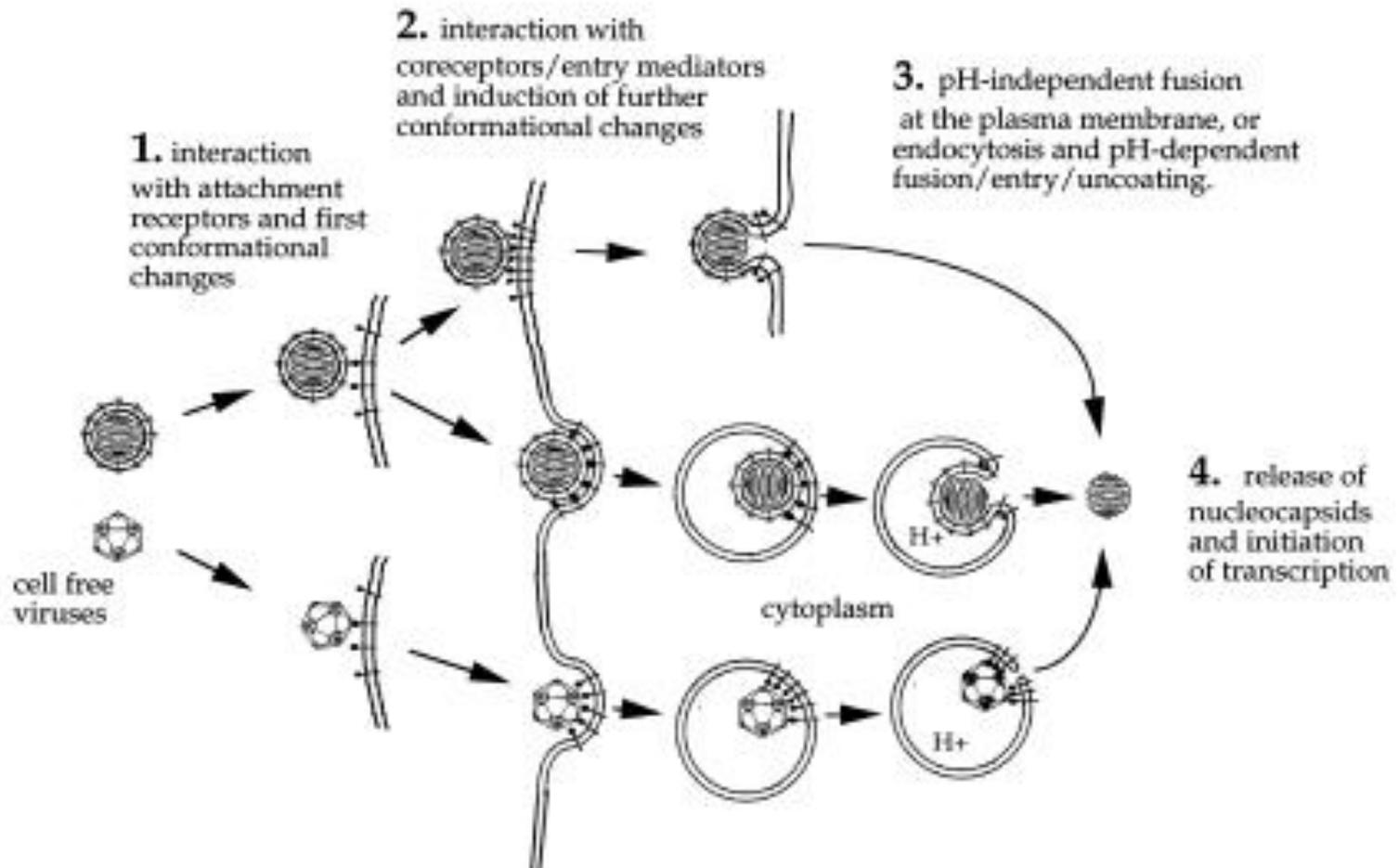
Receptores celulares para virus: conexión entre tropismo y patogénesis

Entrada del virus:

- Fusión a la superficie celular
Independiente del pH
- Fusión dependiente de pH a endosomas ácidos
- Endocitosis de virus no encapsulados
- Cambios conformacionales que lleven al desempacamiento del virus



Pasos para la entrada de los virus a la célula blanco

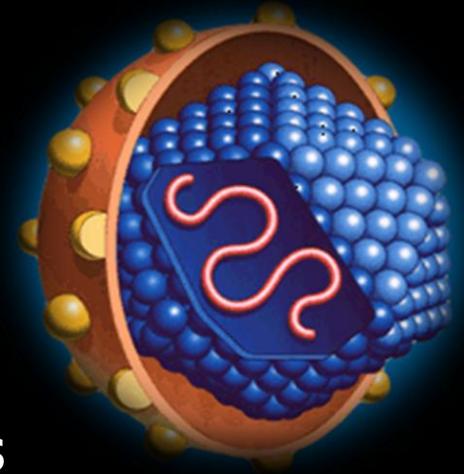


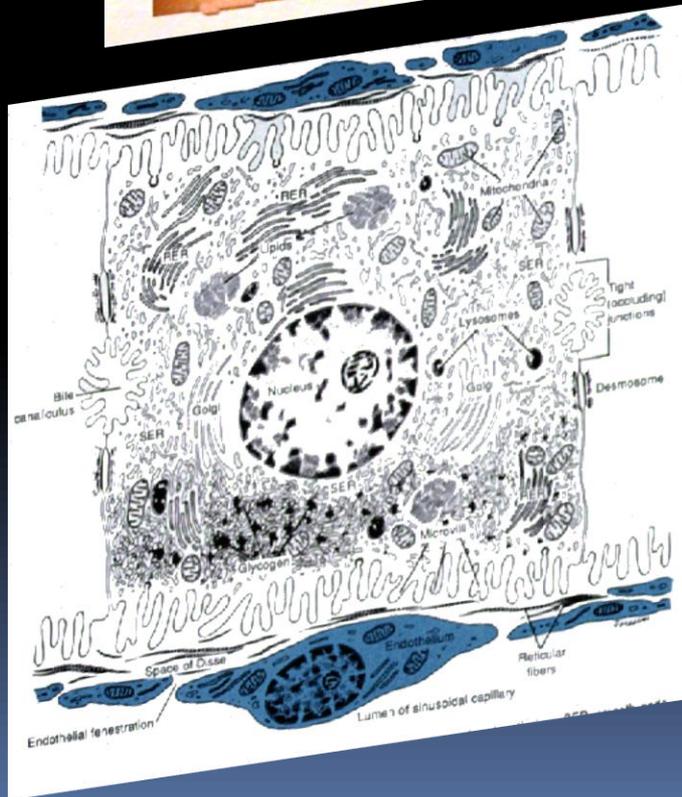
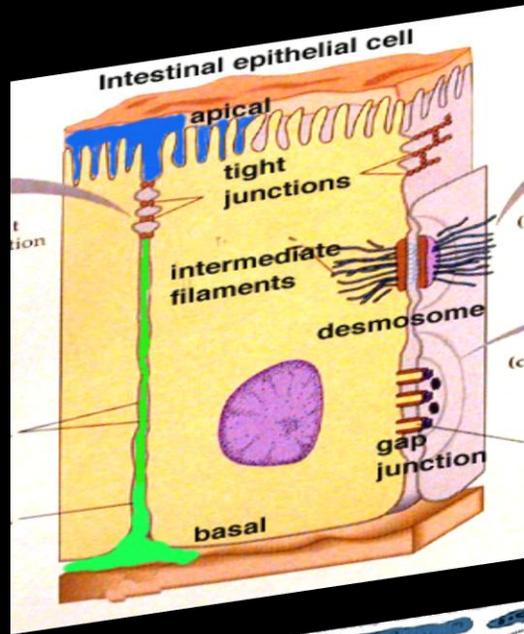
Tropismo hepático: papel de los receptores

- ▶ **Receptor celular para VHA (HAVcr-1):** Glicoproteína de membrana análoga a la mucina de clase I. PH bajo durante la endocitosis induce cambios conformacionales en la capsida para desempaquetamiento viral. El receptor se expresa en múltiples órganos
- ▶ **El VHB** se une a un factor HBV BF de 50 kDa, metaloproteinasa neutra, la cual escinde la porción N-terminal de la proteína de envoltura pre-S₂ y probablemente induce cambio conformacional en pre-S₁ que facilita la unión del virus a la célula. El tropismo de VHB puede ser determinado por este proceso de activación de la envoltura viral
- ▶ **La captura del DHB** se realiza a través de la carboxipeptidasa D, una proteína residente del golgi recircula entre la superficie y el interior de la célula y puede contribuir a la endocitosis del virus

Effect of Cell Polarization on Hepatitis C Virus Entry

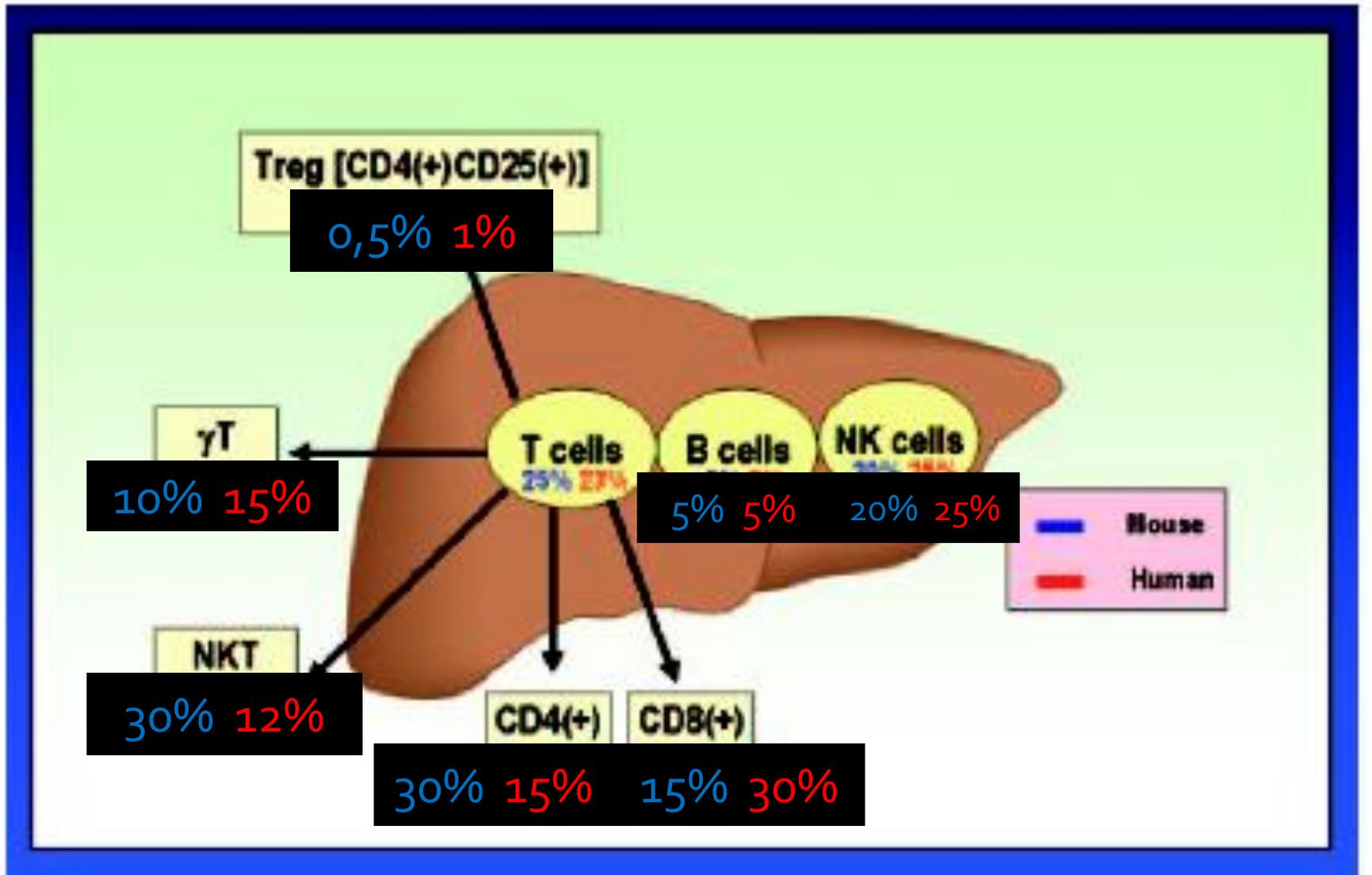
- ▶ HCV miembro único de la familia Hepacivirus genus dentro de Flaviviridae
- ▶ 170 millones de infectados en el mundo
- ▶ Reservorio principal: Hepatocitos
- ▶ Desarrollo del sistema de seudopartículas retrovirales (HCVpp) y capacidad de la cepa JFH-1 para liberar partículas infecciosas en cultivos celulares (HCVcc)
- ▶ Entrada del virus mediante acoplamiento a receptor (Tropismo)
- ▶ HCVpp solo infecta células humanas derivadas del hígado
 - Por lo menos 3 moléculas son importantes para la entrada: CD81, SR-B1 y la proteína de las uniones estrechas (TJ- CLDN1: Claudina 1)





- ▶ CD81 se expresa en la mayoría de los tejidos, se localiza en superficie basolateral de líneas celulares polarizadas
- ▶ SR-B1 se localiza en región apical y basolateral
- ▶ CLDN1 participa en la formación de TJ y se expresa en forma elevada en el hígado
- ▶ TJ separan el dominio apical (canalicular-secreción biliar) del basolateral (sinusoidal-secreción proteica)
- ▶ Función importante en defensa contra infecciones

Subpoblaciones linfocitarias en el microambiente hepático



Infecciones crónicas por virus hepatotropos: Mecanismos de alteración de la respuesta inmune celular

- ▶ Daño inflamatorio hepático proviene de la respuesta inmune del hospedador
- ▶ Respuesta CD4+ y CD8+ específicas contra VHB y VHC se mantiene por décadas en curados mientras que es débil o limitada en pacientes con infección crónica
- ▶ Disminuida capacidad de secretar citocinas en infecciones crónicas y reducida capacidad citotóxica
- ▶ Respuesta celular deficiente asociada con elevados títulos de antígenos virales (al igual que en LMCV). Agotamiento de respuesta celular (“exhaustion”)
- ▶ Contacto frecuente entre células T y antígenos virales en infecciones por VHC y VHB

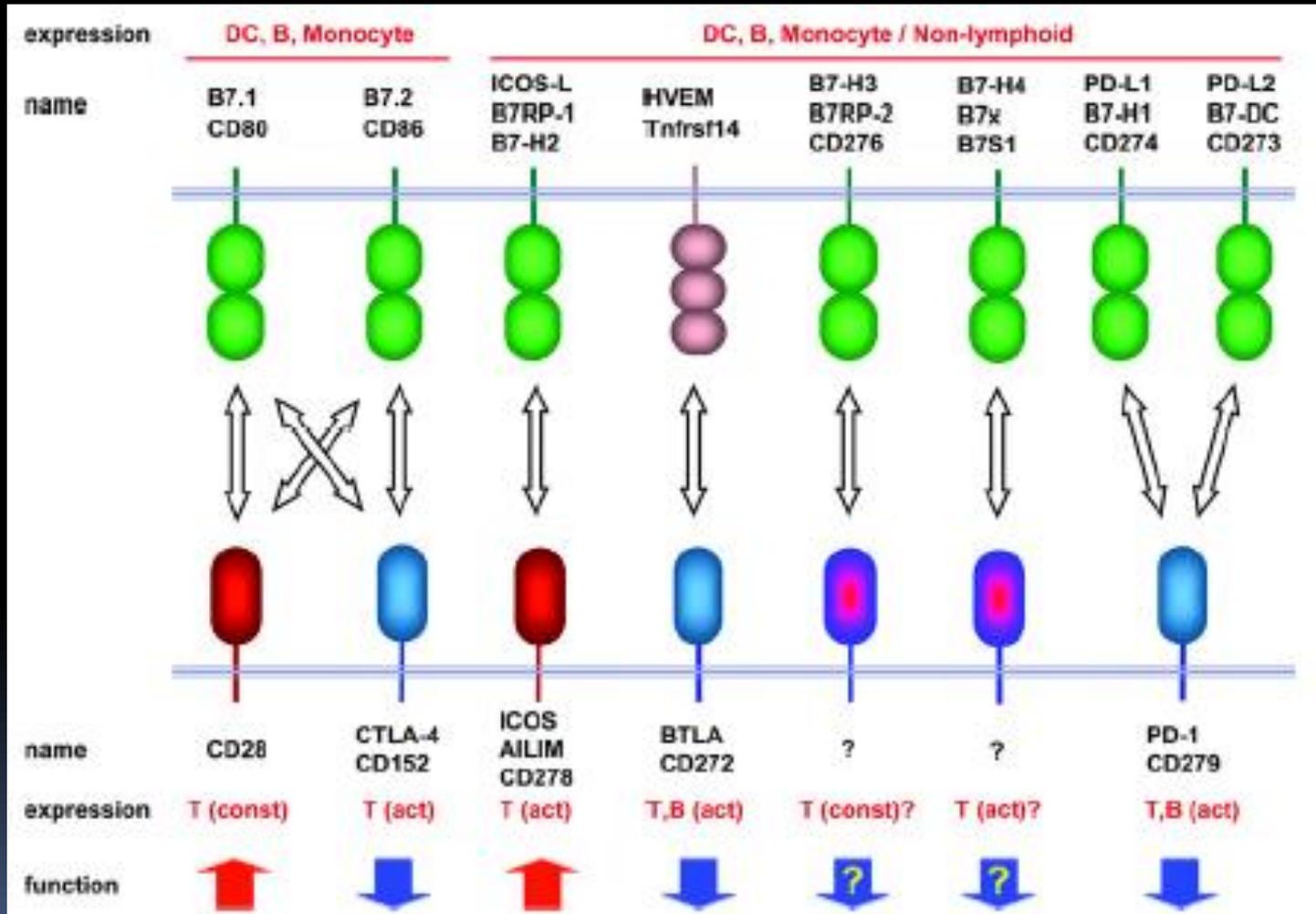
Infecciones crónicas por virus hepatotropos: Mecanismos de alteración de la respuesta inmune celular

- Cantidades elevadas del HBeAg son secretadas en la sangre y se han implicado en la tolerancia neonatal
- El core de VHC disminuye la producción de IL-12, inhibe proliferación, IL-2 e IFN- γ por unión a C1q
- En hepatitis crónica (LCMV) se requiere de la cooperación de CD40
- Mutaciones virales interfieren con el procesamiento de epítopes de T
- Respuesta de T contra epítopes virales dominantes tiende a desaparecer en las infecciones crónicas mientras que persiste la respuesta contra epítopes subdominantes. Cambios en jerarquía de epítopes

Las células T específicas contra virus muestran defectos endógenos durante infecciones crónicas

- La respuesta proliferativa de CD8 anti-HBV puede ser restaurada si la carga viral es reducida con tratamiento previo a vacunación. Esto no ocurre en HCV
- En el modelo murino de LCMV la re-estimulación de células T específicas contra el virus con APC de ratones no infectados no restaura la capacidad proliferativa

Papel de PD-1 en la activación de linfocitos T



Mecanismos Endógenos de Control de células T: Como revertirlos?

- **Vía PD₁/PD-L₁/PD-L₂:** mecanismo inhibitorio de células T a través de CD28. PD-L₁ está constitutivamente expresado en APC, células endoteliales del sinusoides hepático, células de Kupffer, en células estrelladas.
 - PD-L₁ es inducido además por IFN- α
 - La interacción PD-L₁/PD-1 disminuye actividad de T anti-viral, disminuye producción de IFN- γ
 - En el modelo de LCMV, el bloqueo de PD-1 o PD-L₁ restaura la actividad proliferativa, producción de citocinas y citotoxicidad de CD8 específicas anti-LCMV
 - En hepatitis C crónica los niveles de PD-1 permanecen elevados, declinando en los casos de resolución de la infección

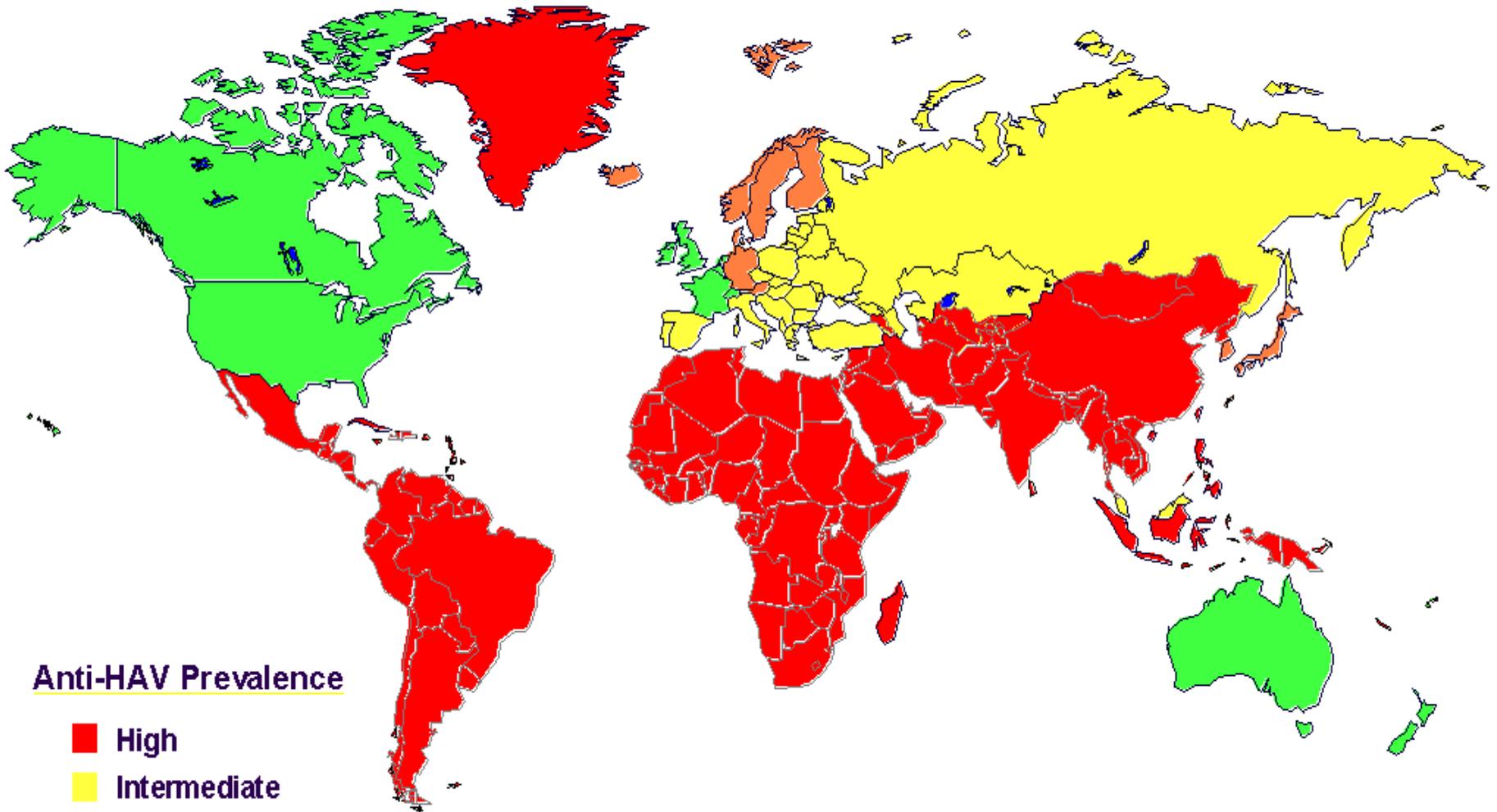
Mecanismos Endógenos de Control de células T: Como revertirlos?

- ▶ **IL-10:** Producido por una variedad de células
 - Inhibe la función de APC y de células T
 - Promueve apoptosis de células dendríticas plasmocitoides
 - Niveles incrementados de IL-10 en plasma y en biopsias hepáticas de pacientes infectados con VHC
 - Niveles incrementados en células CD₄+FoxP₃+ en pacientes infectados con HBV
 - Bloqueo de IL-10 restaura respuesta inmune anti-viral
- ▶ **CD27-CD70:** Familia de TNF. Durante la infección aguda por LCMV CD70 se expresa en un grupo de células T, B y APC. La señalización crónica a través de CD27 conduce a depleción de T

Seminars in Liver Disease. 2007, 27:2

Barboza L et al, Virology. 2007 Nov 10;368(1):41-9

Distribución mundial de la infección por VHA

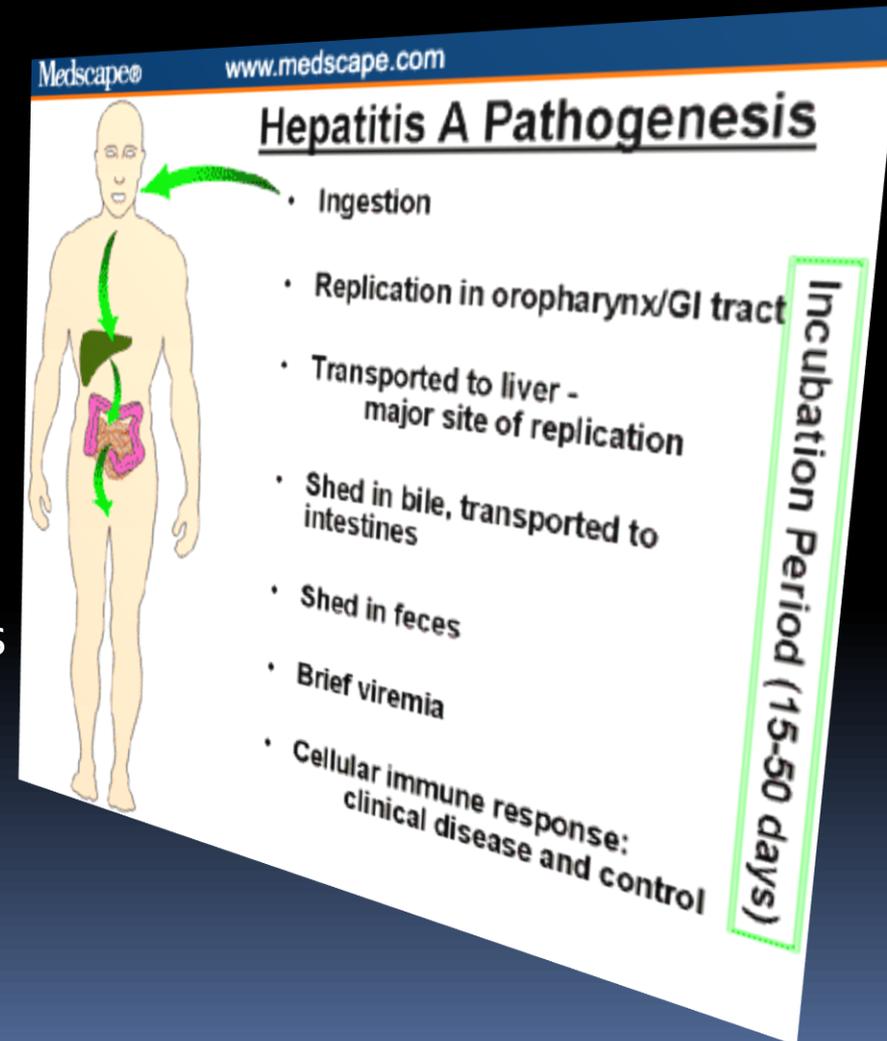


Anti-HAV Prevalence

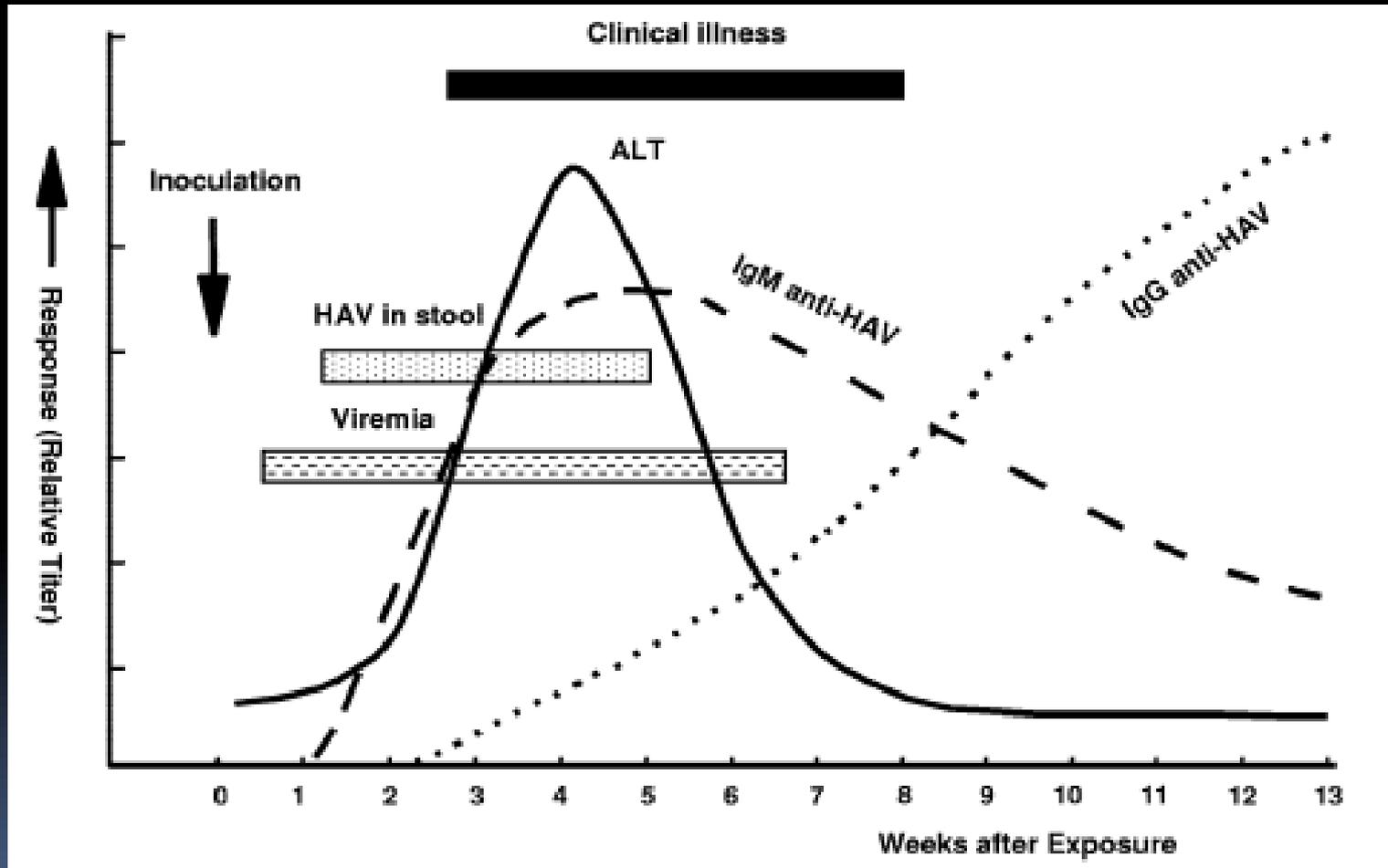
- High
- Intermediate
- Low
- Very Low

Transmisión del VHA

- ▶ Contacto cercano personal (ej: contacto casero, contacto sexual, guarderías)
- ▶ Indigentes– malos hábitos higiénicos
- ▶ Alimentos contaminados, agua (ej: manipuladores de alimentos)
- ▶ Exposición a sangre y derivados (Es rara: hemofílicos, usuarios de drogas endovenosas, posttransfusional)



Eventos bioquímicos e inmunológicos durante la infección por VHA



Diagnóstico de Laboratorio de la infección aguda por VHA

- Detección de IgM anti-HAV mediante Elisa
- Detección de antígeno o del genoma viral en muestras de heces
- La inmunidad anti-VHA es confirmada mediante la determinación de niveles de inmunoglobulinas en suero (IgG)
- Atención: Falsos positivos ante reacciones de IgM positiva post vacunación

Epidemiología de la Hepatitis B

- **O.M.S.:** 2 millones de personas infectadas
- 350 millones portadores crónicos



Venezuela:
Prevalencia
intermedia
(1-5%)

Zonas de riesgo:

Delta Amacuro

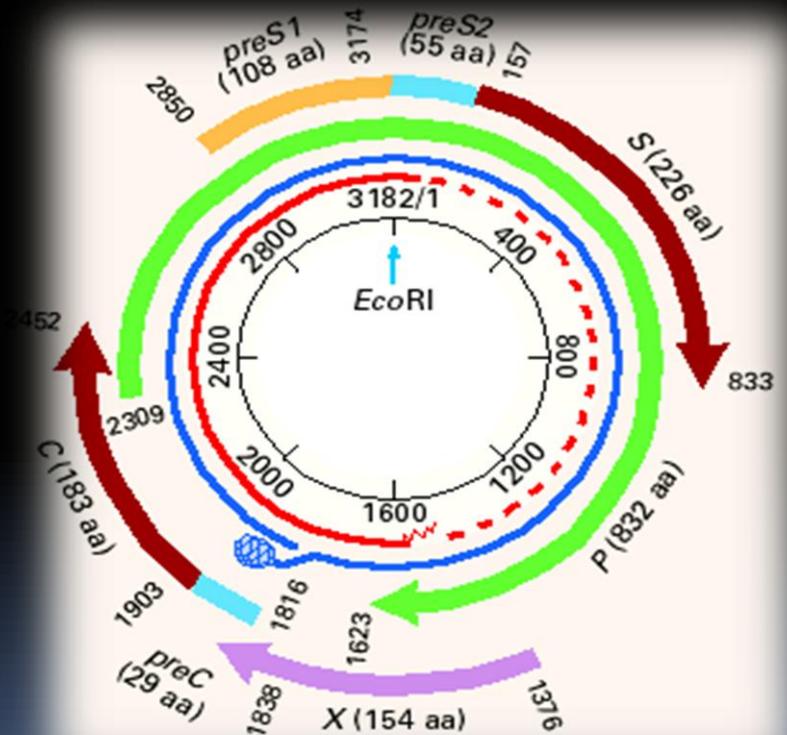
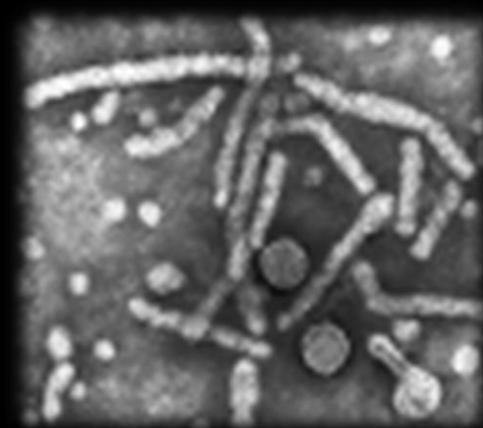
Barinitas

Amazonas

Zulia

Genoma Viral (VHB)

- El VHB pertenece a la familia Hepadnaviridae
- Está compuesto por un genoma de doble cadena helicoidal de ADN de 3.2 Kb
- Tiene capacidad de replicación por transcripción reversa
- El ADN del virión contiene 4 ORF (S, C, P y X)
- Aprovechamiento del material genético: 7 proteínas virales
- Partículas vacías circulantes



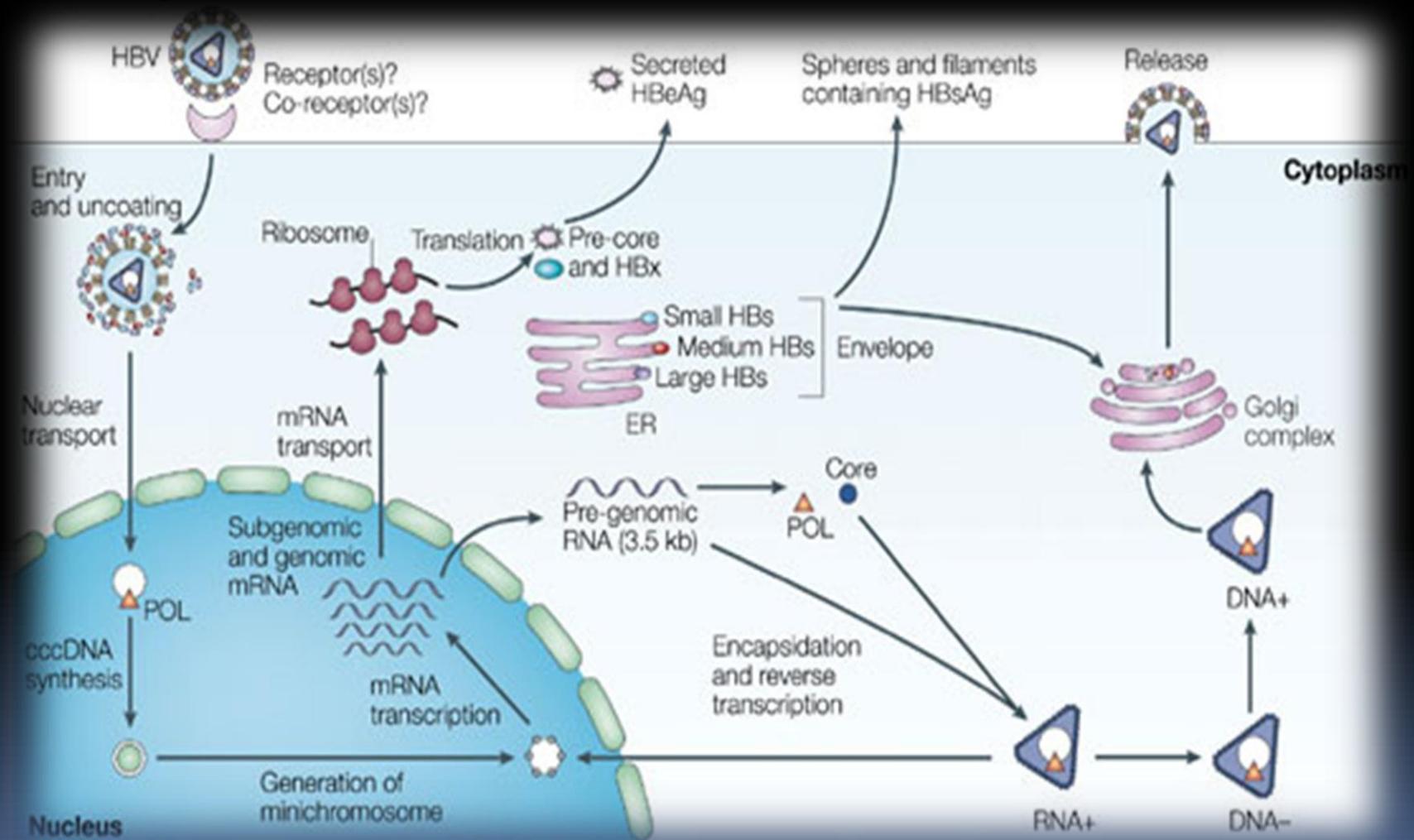
Hepatitis B Virus

Bruguera C, M. (1996). *Medicina Interna*. 315 - 323.

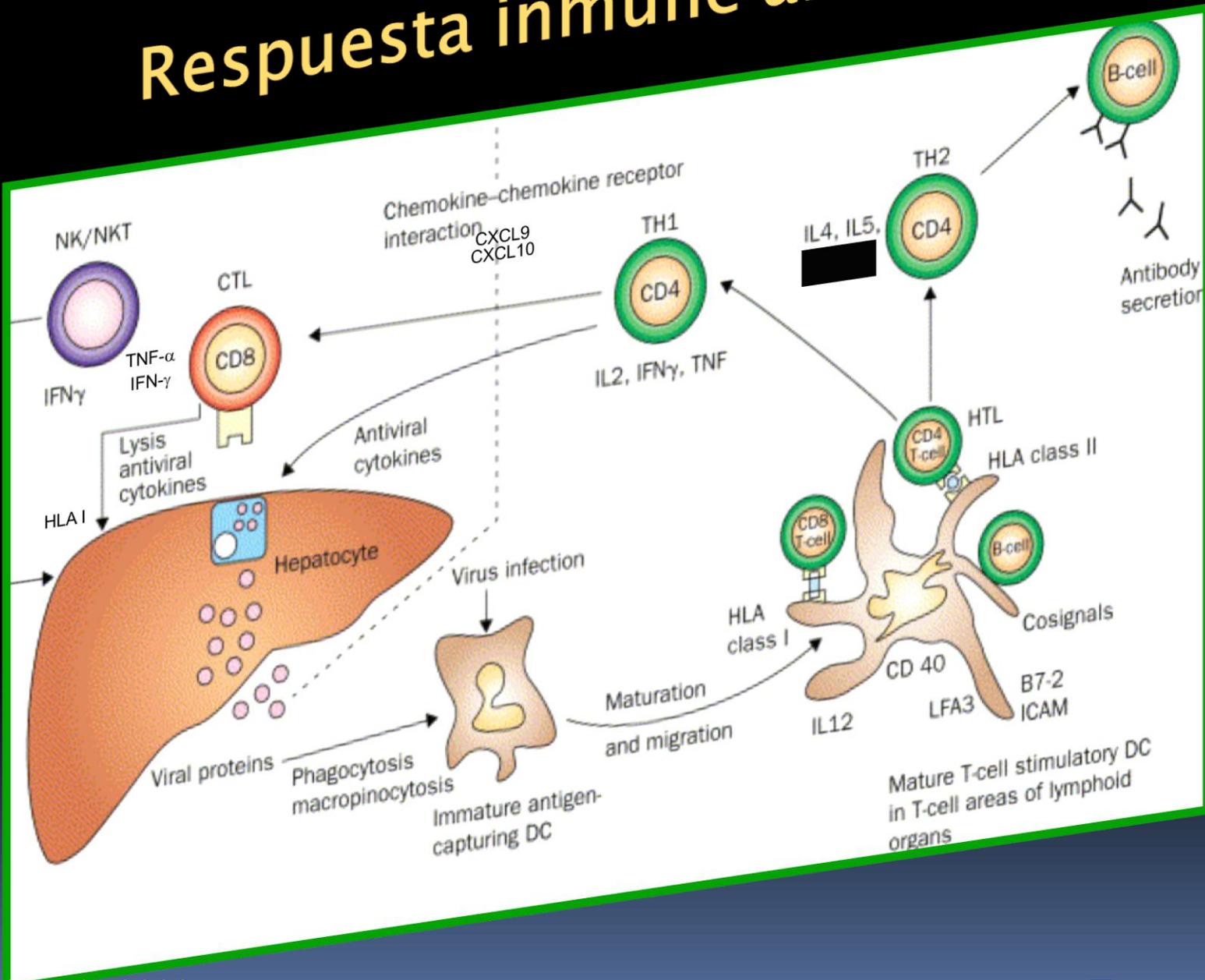
Chen, H., M. Kew, et al. (1992). *Journal of Virology* 66: 5682 - 84.

Chísari F, 2000

Ciclo de vida del VHB



Respuesta inmune anti-HBV



VACUNACIÓN ANTI-VHB

- Preparaciones de HBsAg altamente purificadas
- La eficacia protectora relacionada con el desarrollo de anticuerpos anti-HBsAg
- Aproximadamente entre 4 a 10% de adultos sanos inmunocompetentes, no producen niveles protectores de anticuerpos anti-HBsAg

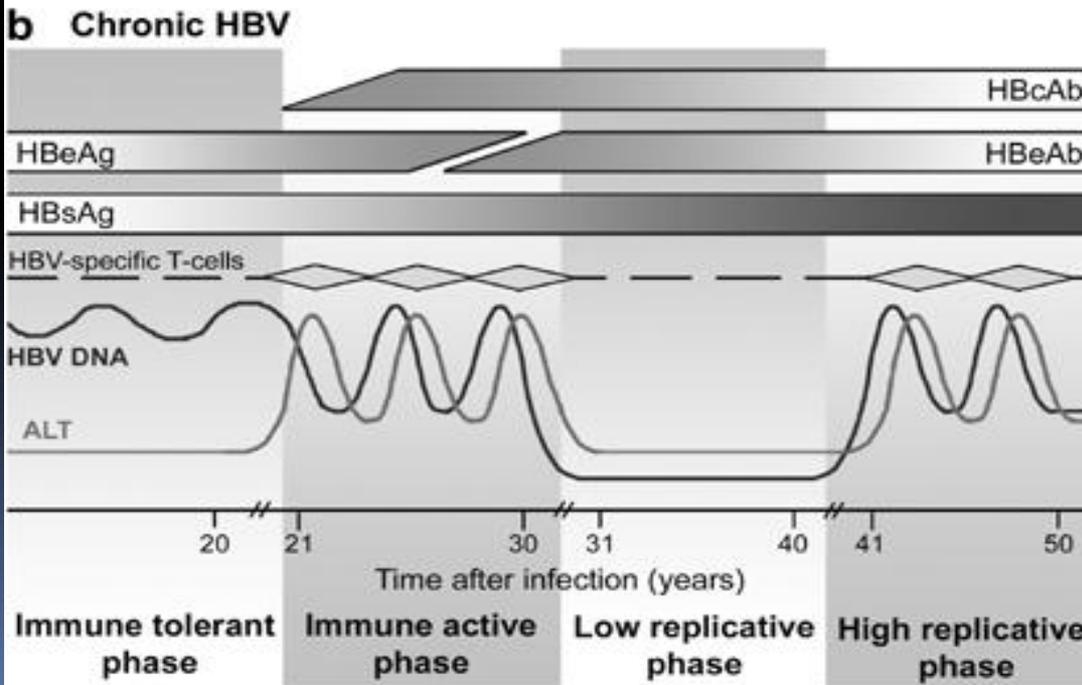
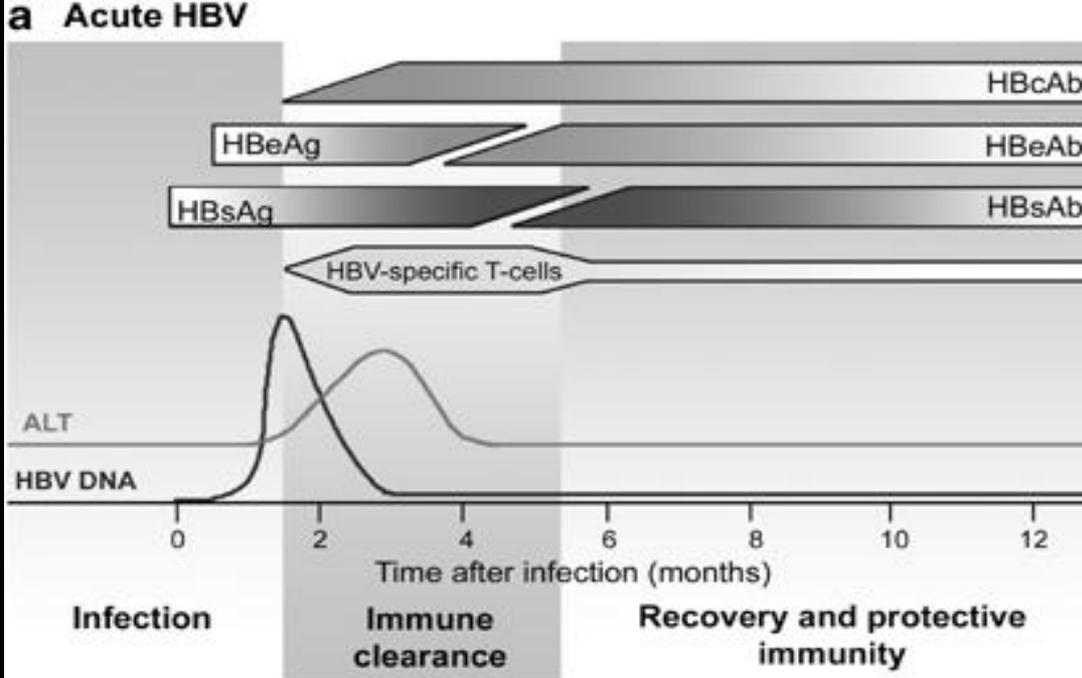


Poster for first African trial of HB Vaccine
Senegal, early 1980's

Respuesta deficiente a la vacunación

- Repertorios de linfocitos T y B defectuosos (destrucción de clonas específicas mediado por CTL)
- Tolerancia inmunitaria y defectos funcionales en la cooperación dependiente de los linfocitos CD4, necesaria para la producción de inmunoglobulinas
- Alteraciones en los perfiles de citocinas producidas por linfocitos T CD4⁺ en respuesta al HBsAg

Patrón serológico, bioquímico y virológico de la infección por VHB

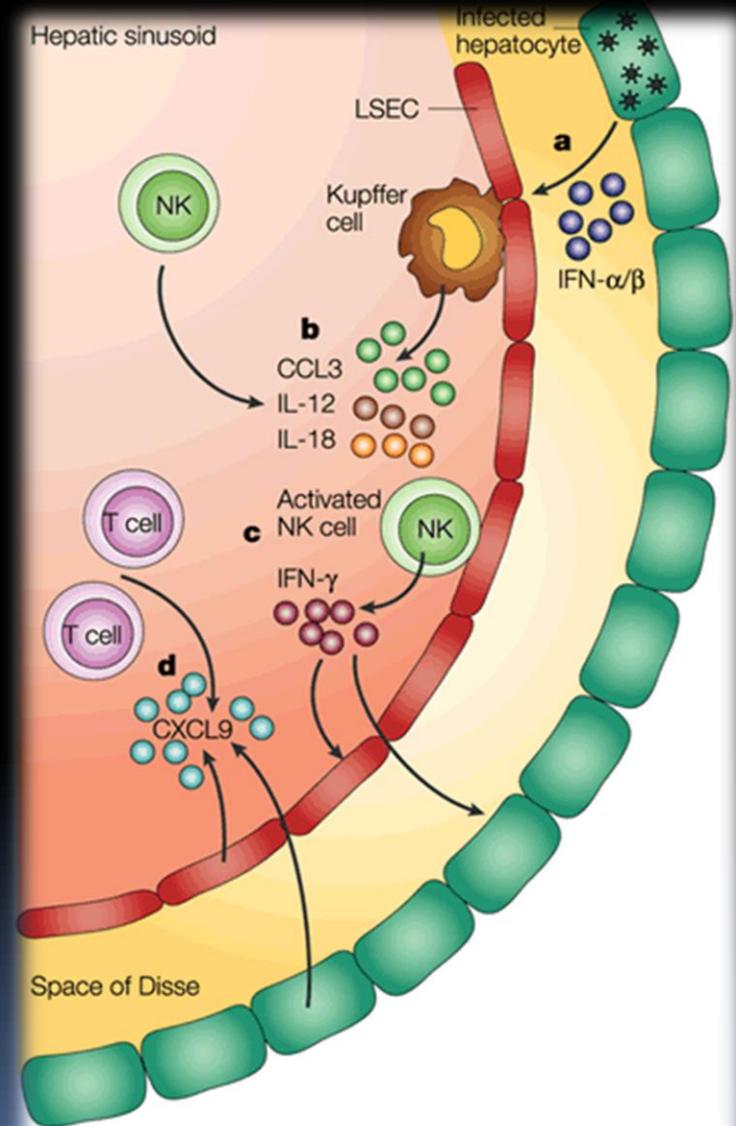


Inmunopatogenia de la Hepatitis B

- La patogenia es iniciada por una respuesta inmune celular que conduce a la eliminación de las células infectadas
- Citocinas asociados con la resolución espontánea de la hepatitis B aguda: patrón Th1 con predominancia de IL-2, IFN- γ y TNF- α
- Respuesta celular restringida en infección crónica, Predominio de patrón Th2

Ian Nicholas Crispe *Nature Reviews Immunology* (2003)

Guidotti and Chisari, 2001. Chisari, 2000. Tang et al , 2003



RESPUESTA INMUNITARIA EN HEPATITIS B: papel de NK y NKT

- ▶ Células NK pueden limitar la replicación del virus
- ▶ Actividad elevada de NK en fase aguda de hepatitis B
- ▶ Actividad disminuida *in vitro* por efecto de HBsAg
- ▶ Apoptosis dependiente de NK en hepatocitos
- ▶ Ratones transgénicos infectados con VHB, inducción intrahepática de IFN- γ producido por NKT

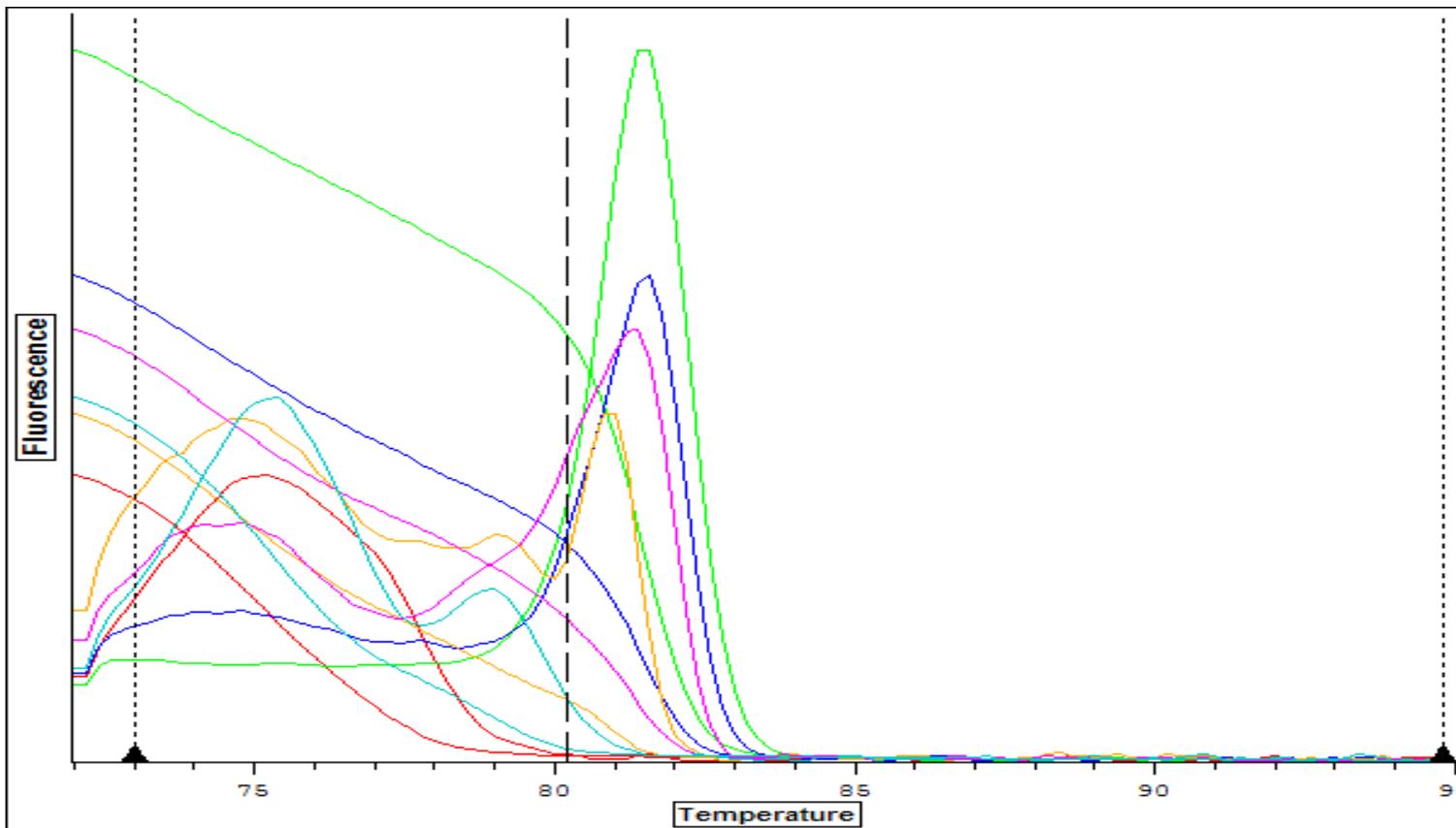
See et al., 1997. Guidotti et al., 1999

Kakimi et al., 2000.

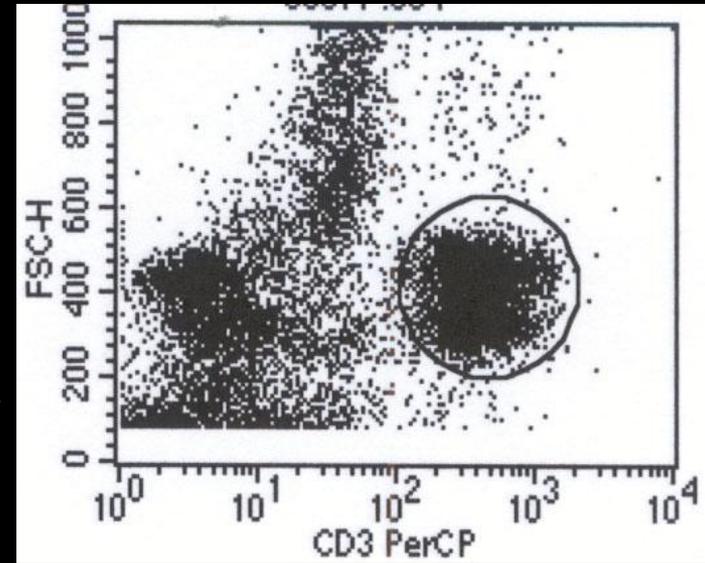
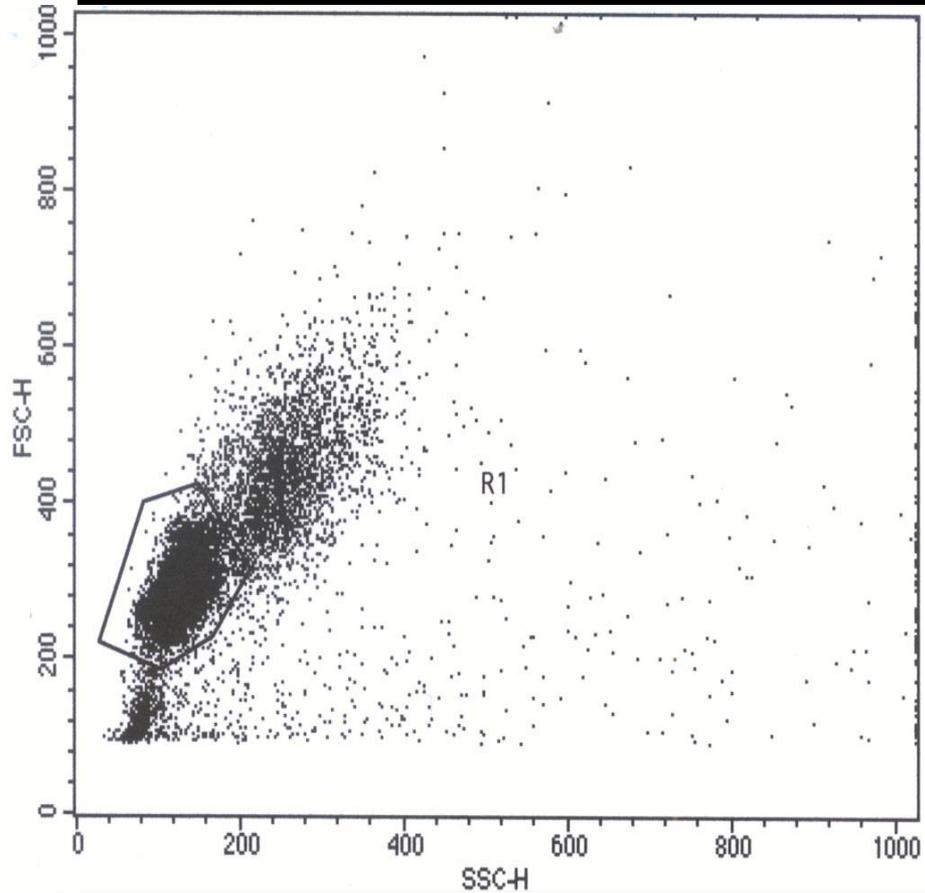
Estado Serológico y Viroológico de los individuos en estudio

	Sujetos		Serología		
	Edad	Sexo (F/M)	AgSHB	AcAgSHB	AcAgCHB
Grupo A (vacunados respondedores)	25-35 (30)	13 (11/2)	-	+	-
Grupo B (vacunados respondedores) no	30-40 (40)	7 (3/4)	-	-	-
Grupo C (No vacunados)	25-45 (35)	8 (3/5)	-	-	-
Grupo E (curados de la infección por VHB)	25-35 (30)	10 (6/4)	-	+	+

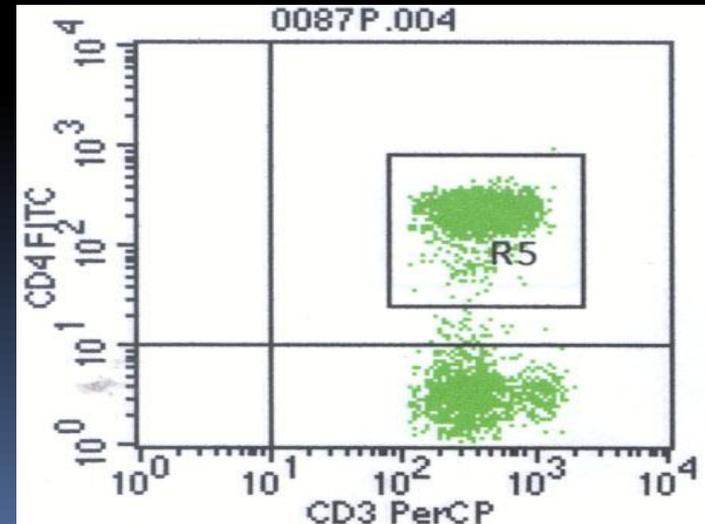
Análisis de las amplificaciones realizadas del VHB mediante PCR en tiempo real a muestras de pacientes HBV+ y controles



Análisis mediante citometría de flujo



CD3+

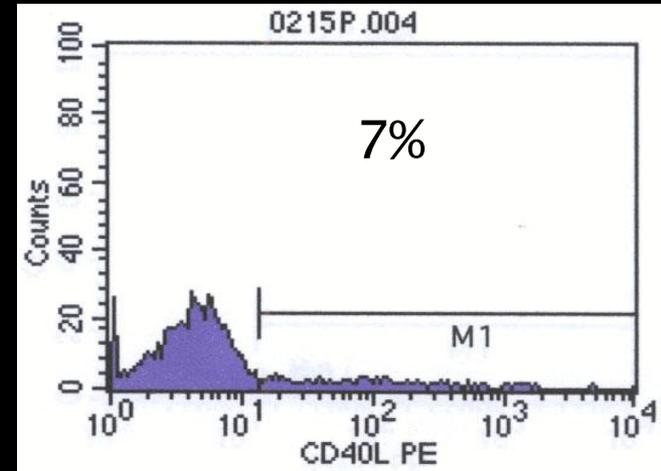
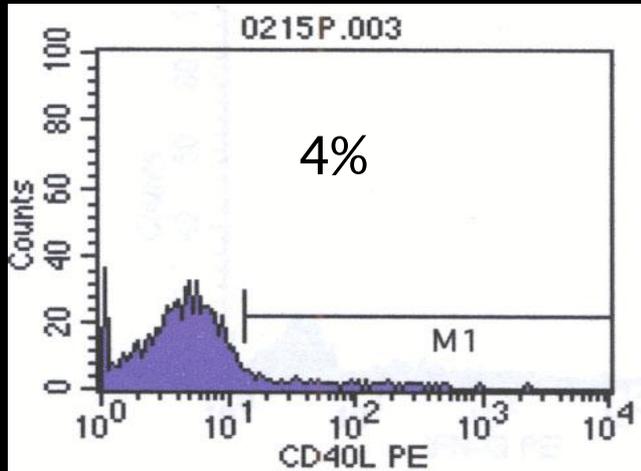


CD4+

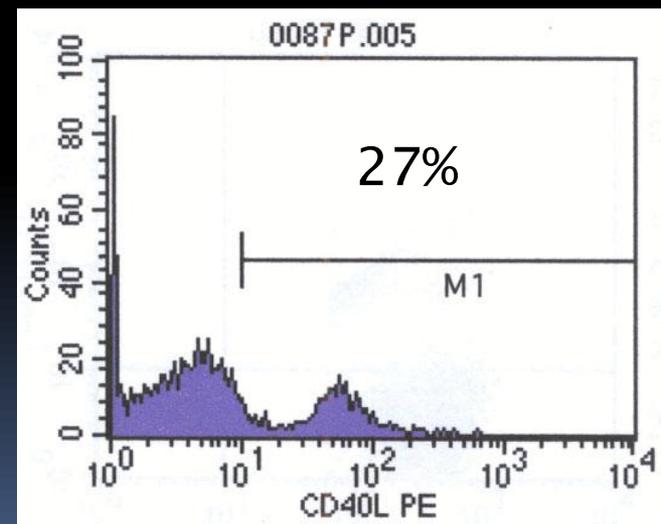
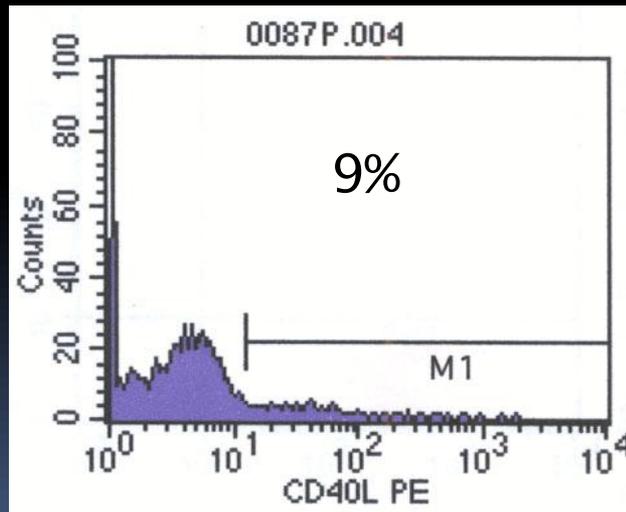
Muestra de sangre periférica
Población linfoide

Expresión de CD40L en CD4: PBL estimulados con 5ug HBsAg, durante 48h

VNR



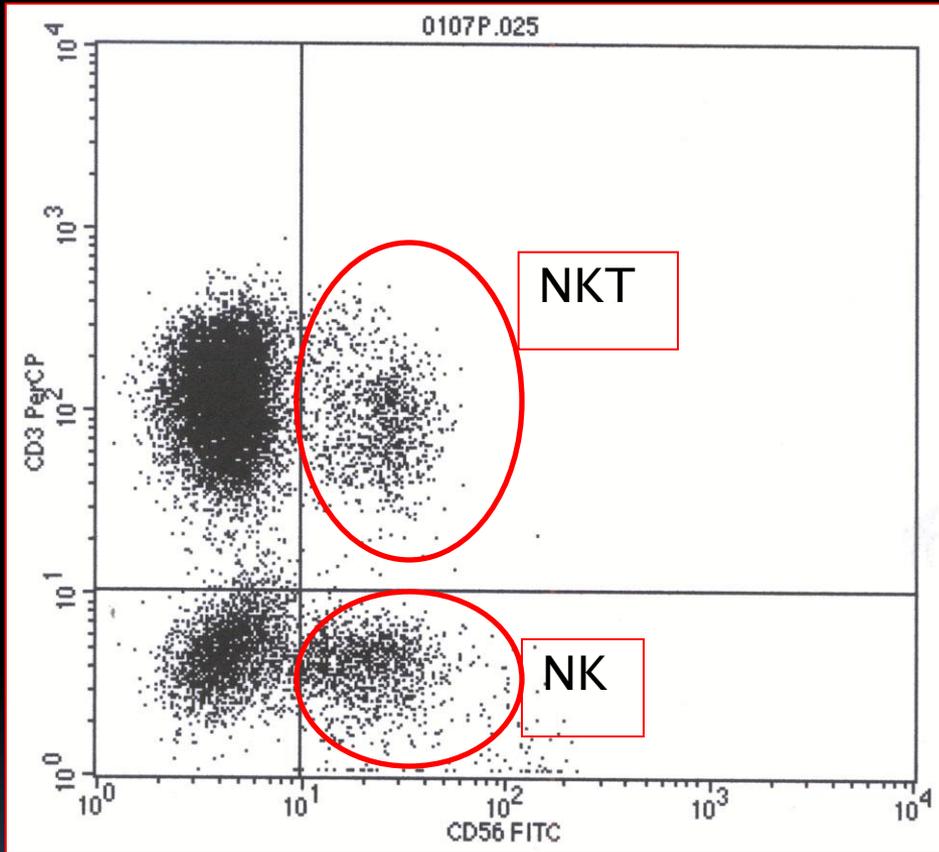
VR



(-)

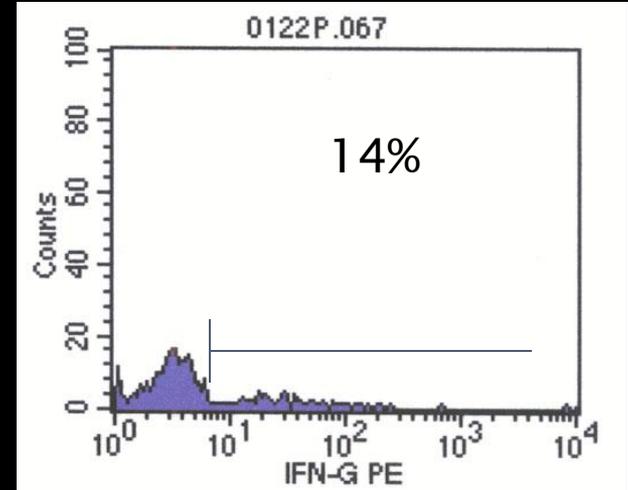
(+)

Expresión intracitoplasmática de IFN- γ en NK de VR: PBL estimulados con 5ug HBsAg, durante 96h

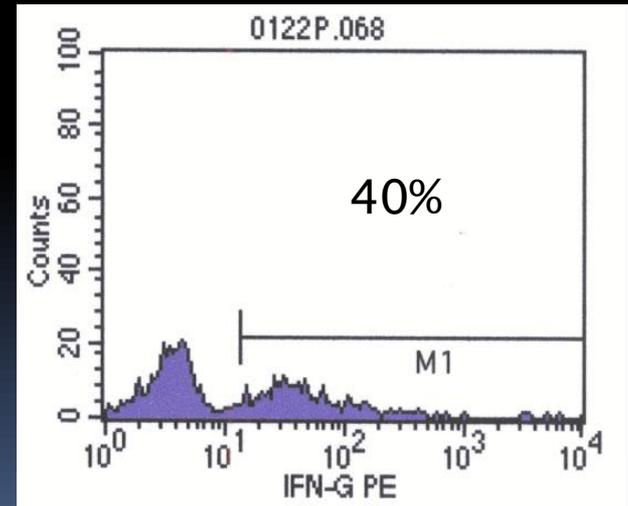


Mononucleares SP
Ficoll

(-)



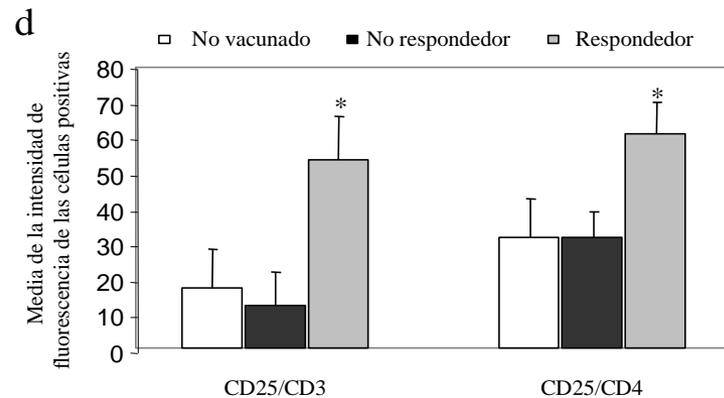
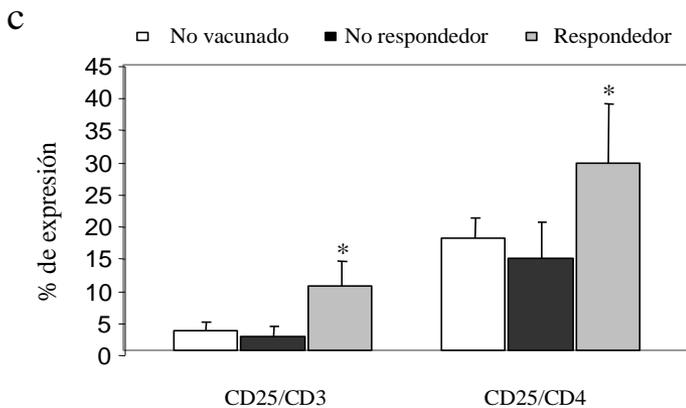
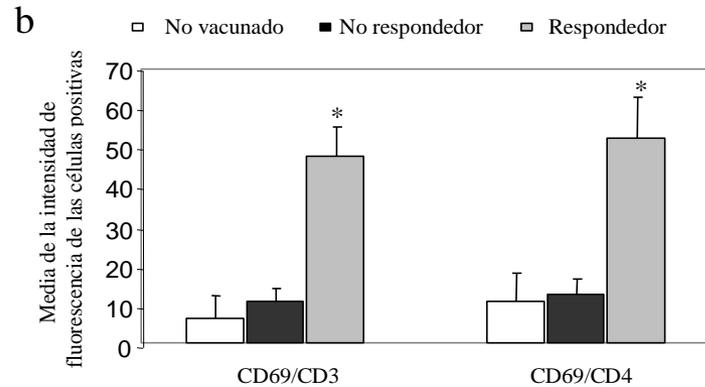
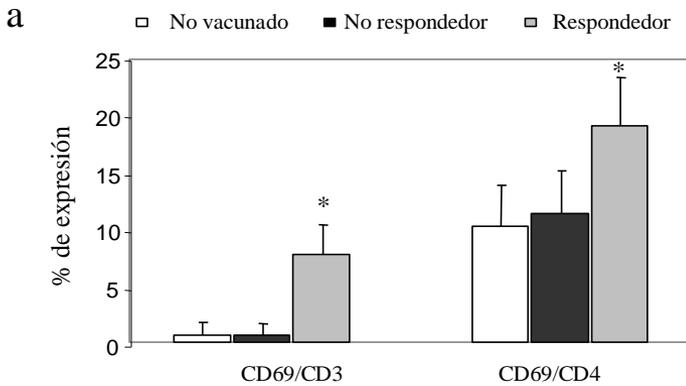
(+)



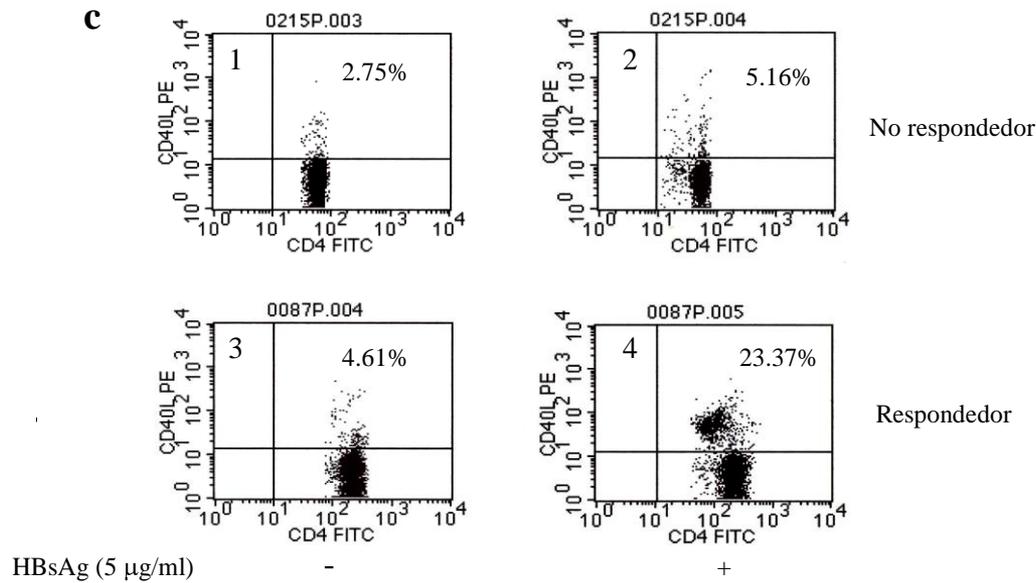
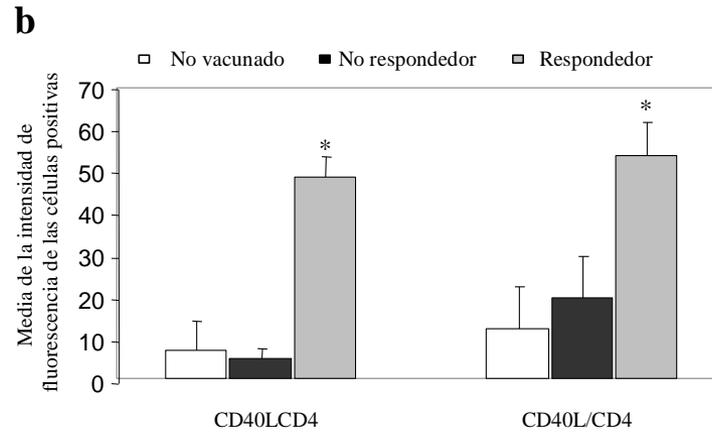
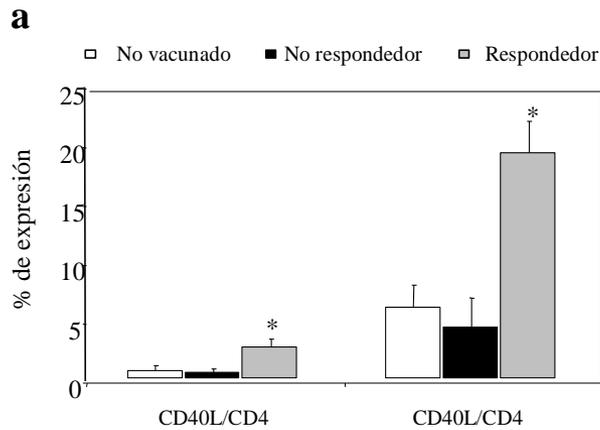
Respuesta proliferativa en CMSP

7días

		HBsAg (5 µg/mL)	PWM (3 µg/mL)
		IP	IP
NV 1		-6,67	12,9
NV 2		-0,07	20,8
NV 3		0,6	80
NV 4		-0,17	36,2
NV 5		-0,4	14,8
NV 6		0,7	69,9
NV 7		-0,03	34,8
NV 8		0,7	72,7
media		0.67 1.4	42.76 ± 16.47
VNR 1		0,38	19,96
VNR 2		0,7	26,8
VNR 3		0,45	58,4
VNR 4		0,01	48,8
VNR 5		0,4	35,2
VNR 6		0,6	44,2
VNR 7		0,5	36,2
media		0.38 ± 0.18	37.83 ± 11.94
VR 1		3,03	16,12
VR 2		10	22
VR 3		1,7	6,9
VR 4		2,23	11,09
VR 5		18,5	97,8
VR 6		11	283,6
VR 7		13,6	21,5
VR 8		26	190,6
VR 9		2,71	68,5
VR 10		2,9	9,5
VR 11		9,88	26,9
VR 12		1,34	5,7
VR 13		2,24	9,2
media		8.08 ± 3.62 (p < 0,05)	59.19 ± 40.22



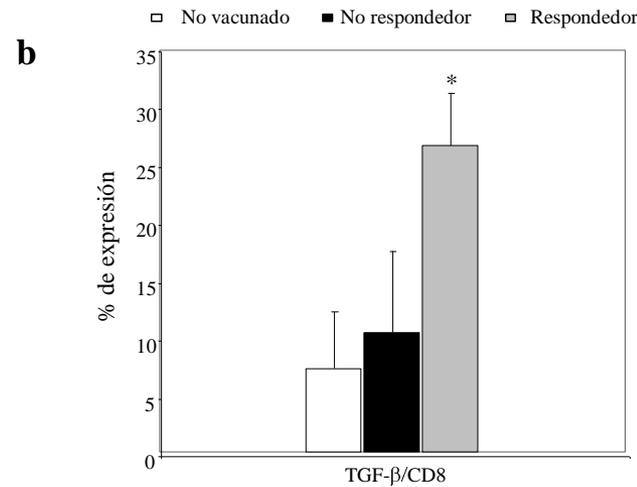
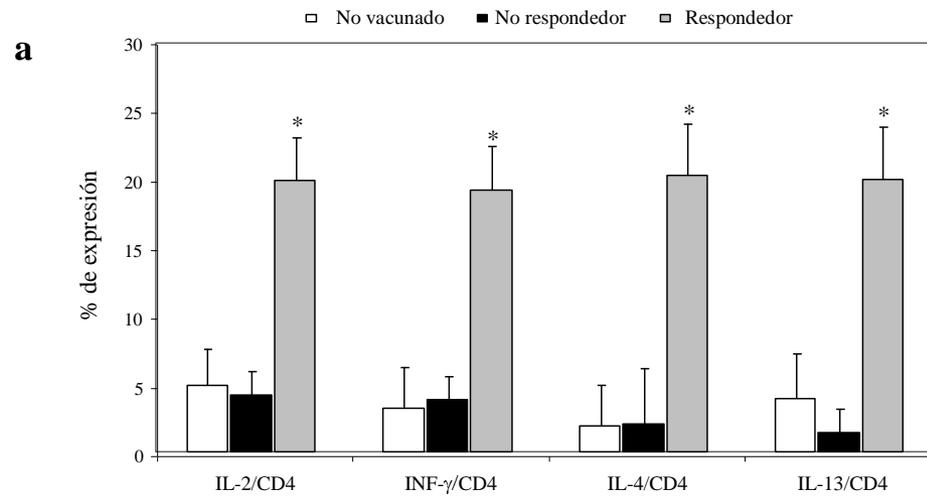
Inducción de los marcadores de activación CD69 y CD25 en respuesta al HBsAg en un grupo de individuos vacunados contra la hepatitis B (respondedores y no respondedores)



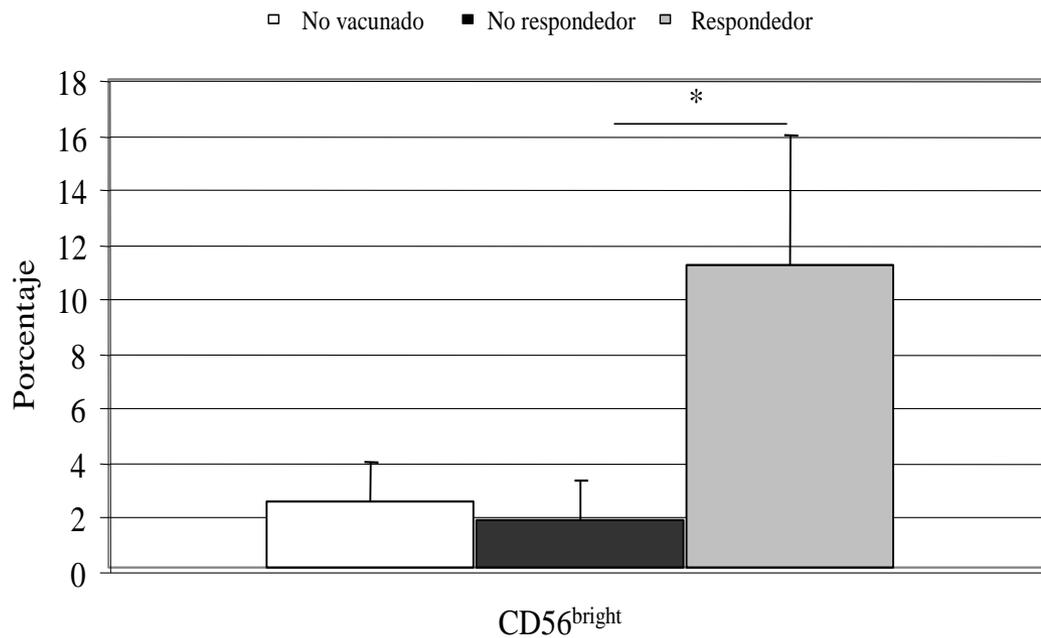
Expresión e inducción específica de CD40L en respuesta a estímulo con el

HBsAg en sujetos vacunados y no vacunados contra la hepatitis B

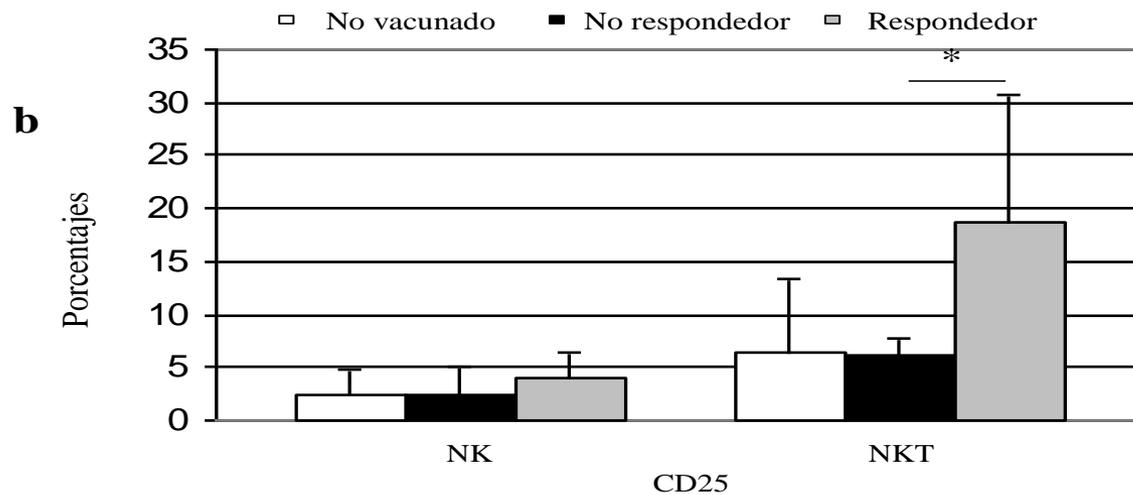
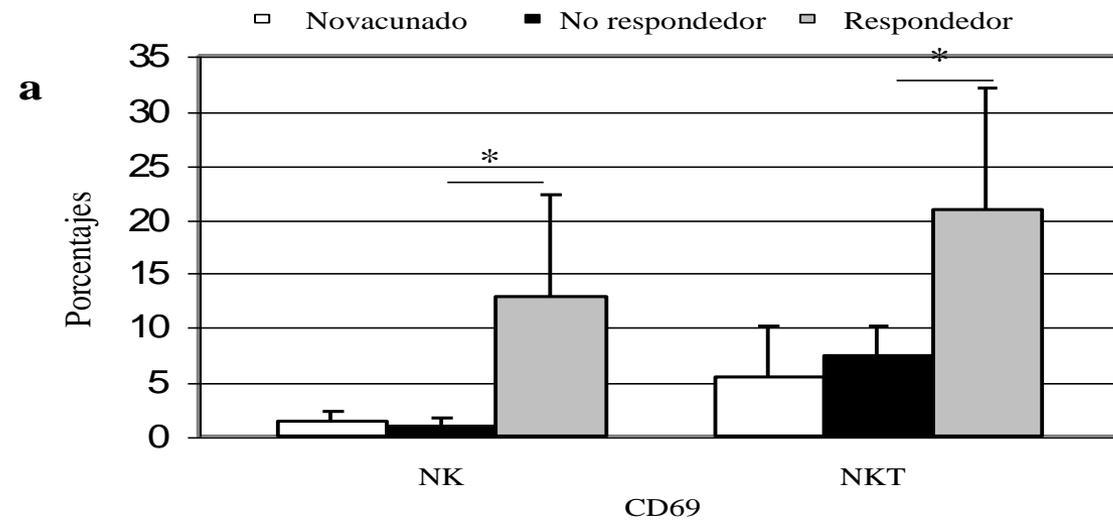
Goncalves L, et al. Virology. 2004 Aug 15;326(1):20-8



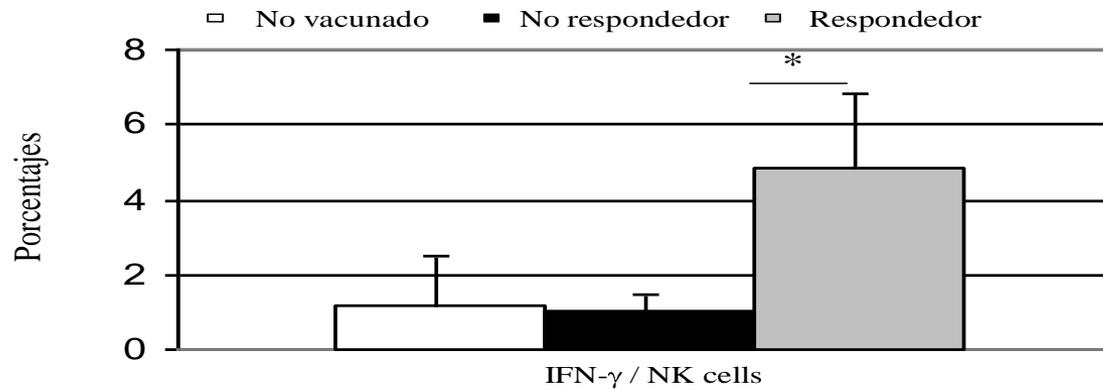
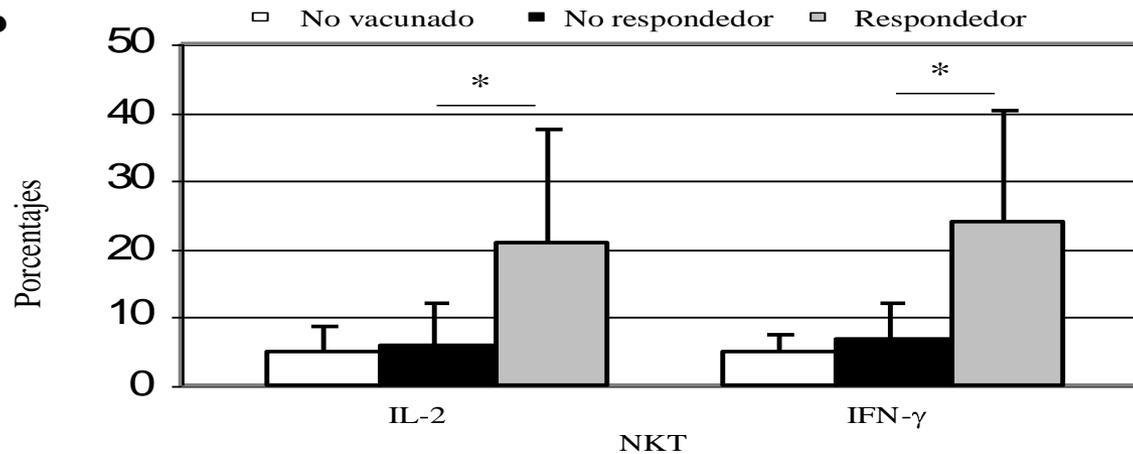
Perfil intracelular de citocinas en respuesta a la estimulación con el HBsAg en células de individuos vacunados o no



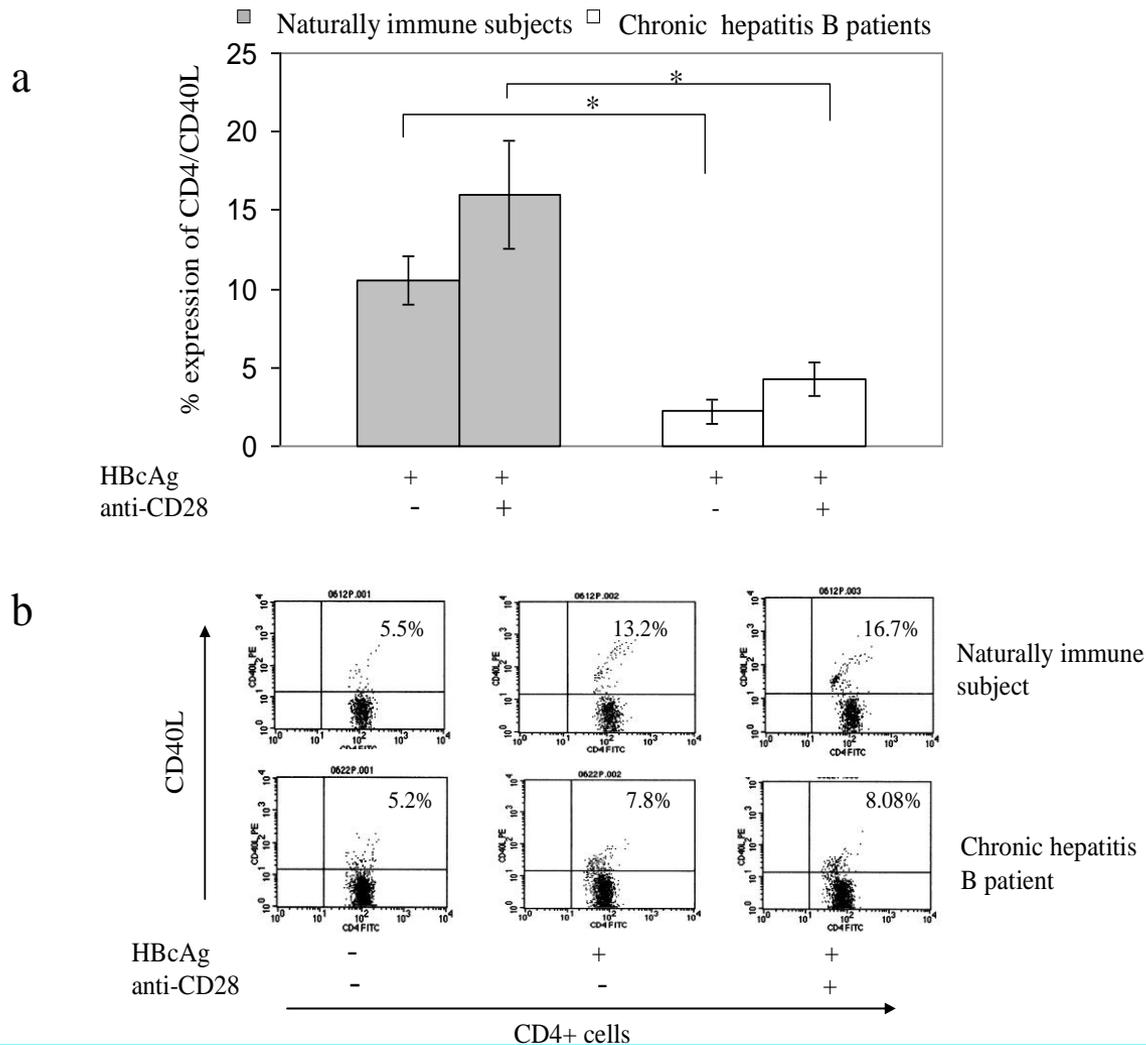
Porcentaje de expresión de la molécula CD56 en respuesta a HBsAg en vacunados (respondedores o no)



Inducción de los marcadores de activación CD69 y CD25 en respuesta a HBsAg en vacunados contra la hepatitis B (respondedores y no respondedores) y en sujetos no vacunados

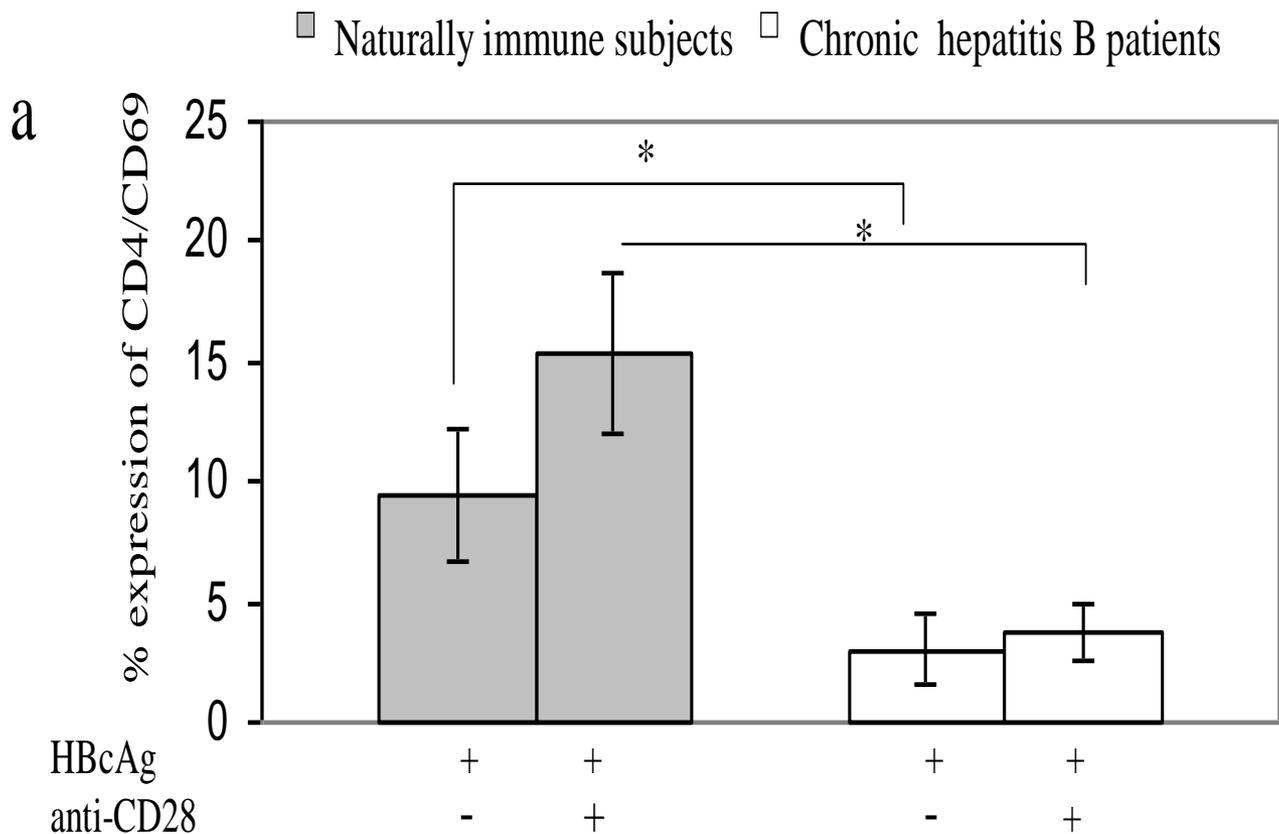
a**b**

Disminución en la expresión de IL-2 e IFN γ en respuesta a estimulación con HBsAg en células NK y NKT de sujetos vacunados no respondedores



Inducción del marcador CD40L en CD4+ en respuesta al HBcAg asociado al estímulo vía CD28, en un grupo de individuos curados e infectados crónicos con VHB

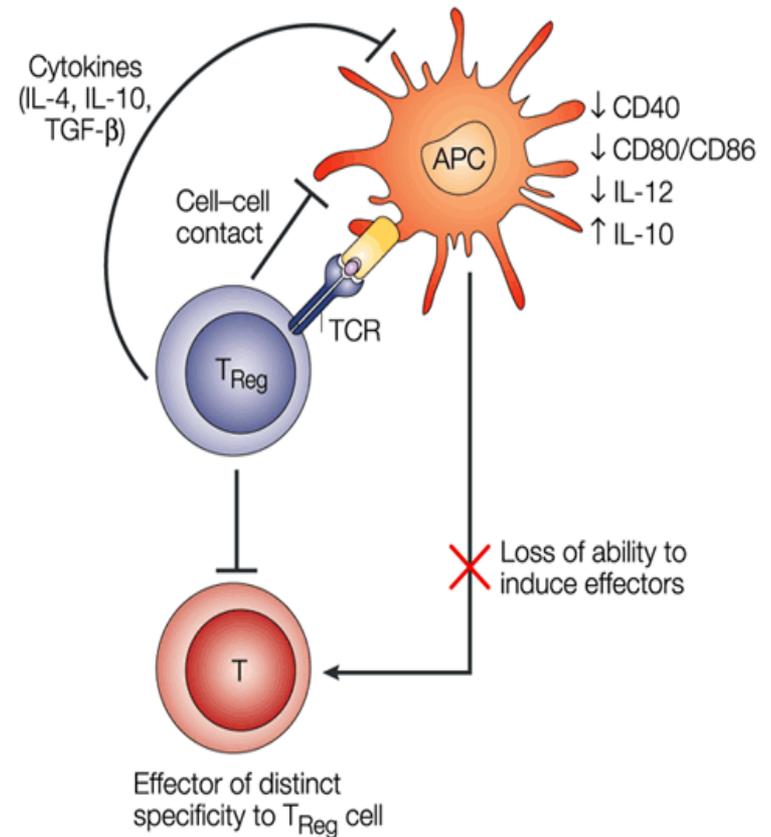
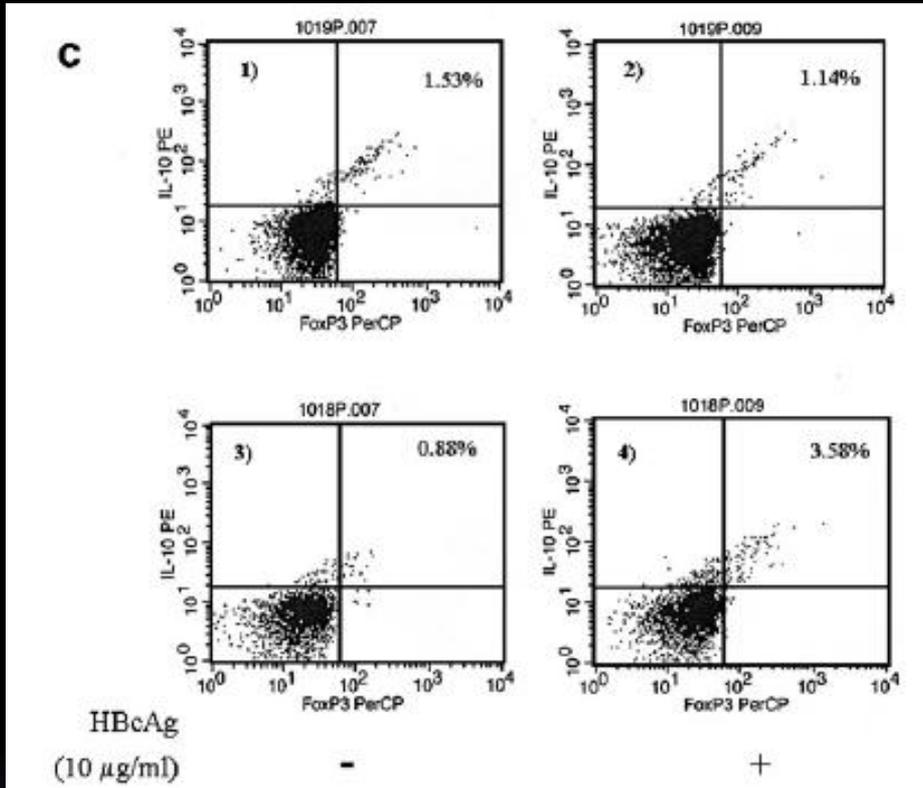
Barboza L, Salmen S, Peterson DL, Montes H, Colmenares M, Hernández M, Berrueta-Carrillo LE, Berrueta L. Cell Immunol. 2009;257(1-2):61-8.



Inducción del marcador CD69 en CD4+ en respuesta al HBcAg asociado al estímulo vía CD28, en un grupo de individuos curados e infectados crónicos con VHB

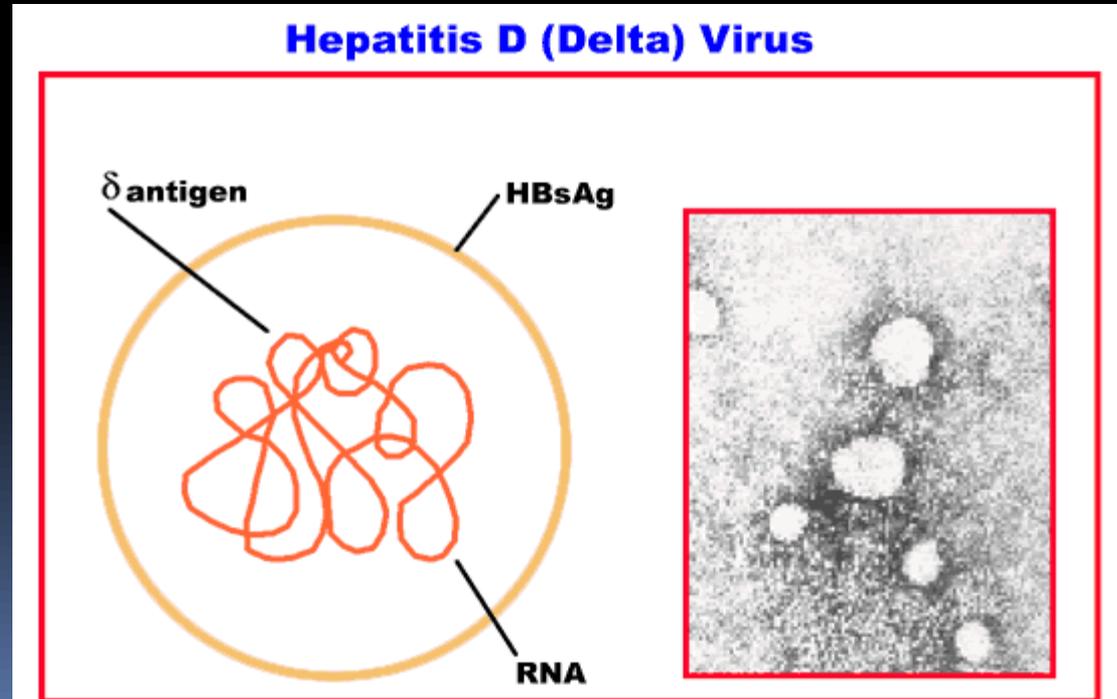
Barboza L, Salmen S, Peterson DL, Montes H, Colmenares M, Hernández M, Berrueta-Carrillo LE, Berrueta L. Cell Immunol. 2009;257(1-2):61-8.

Papel de Treg en infecciones virales

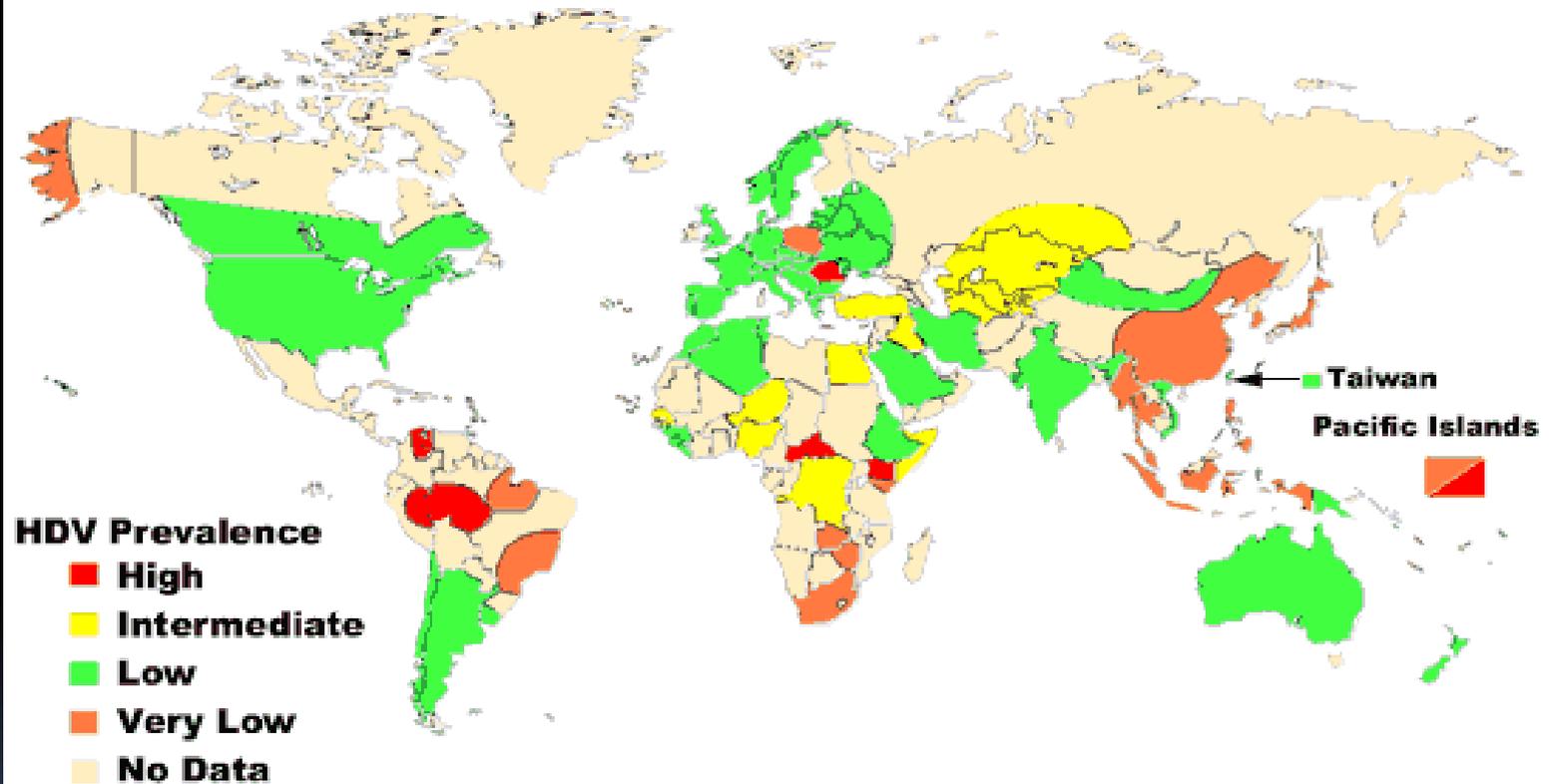


Hepatitis D

- HDV contains a circular RNA genome of 1.7 kilobases, which can't replicate on its own but requires HBV as the helper virus to supply HBV surface antigen for the production of virus particles. The genome sequence is nearly self-complementary such that the viral RNA forms a rodlike double-stranded RNA structure under the native conditions

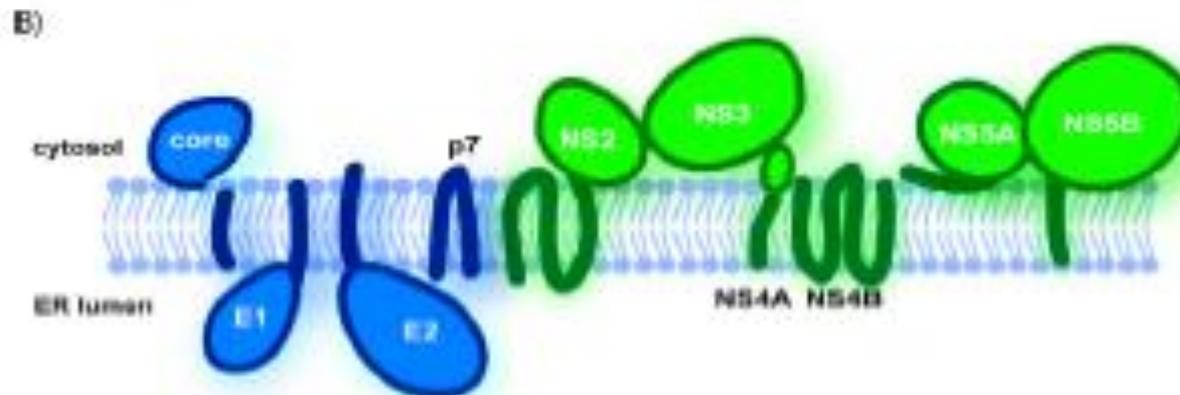
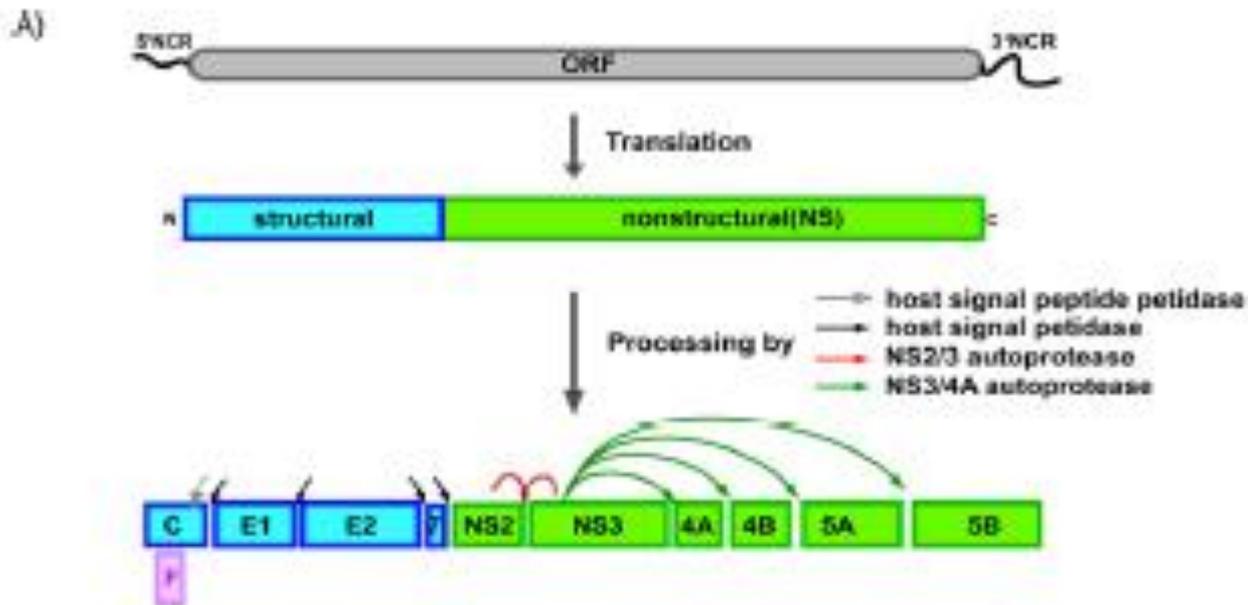


Geographic Distribution of HDV Infection

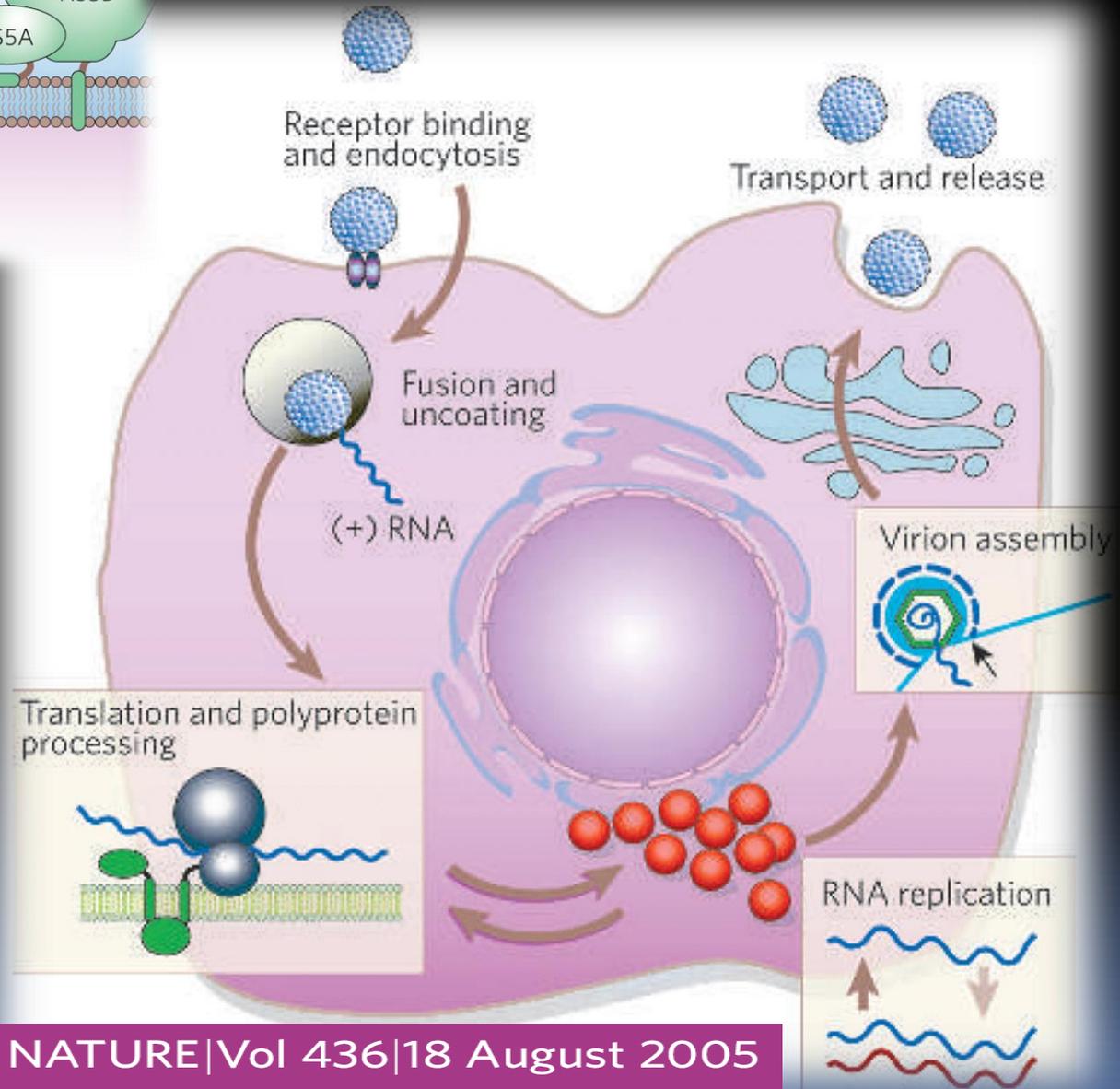
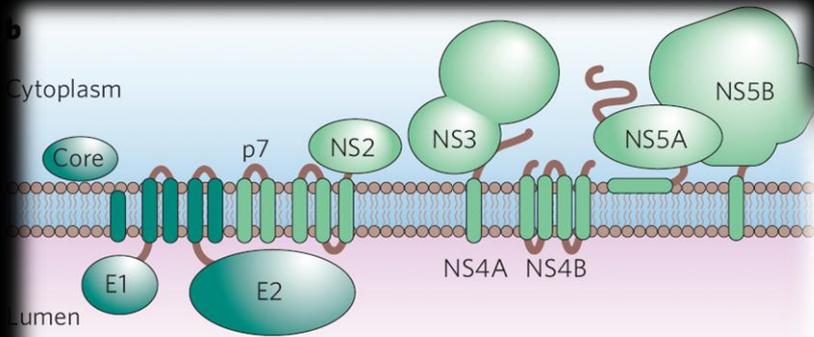


Slide compliments of the Centers for Disease Control's (CDC) presentation entitled: *Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis A to E: An Overview.*

Estructura del VHC

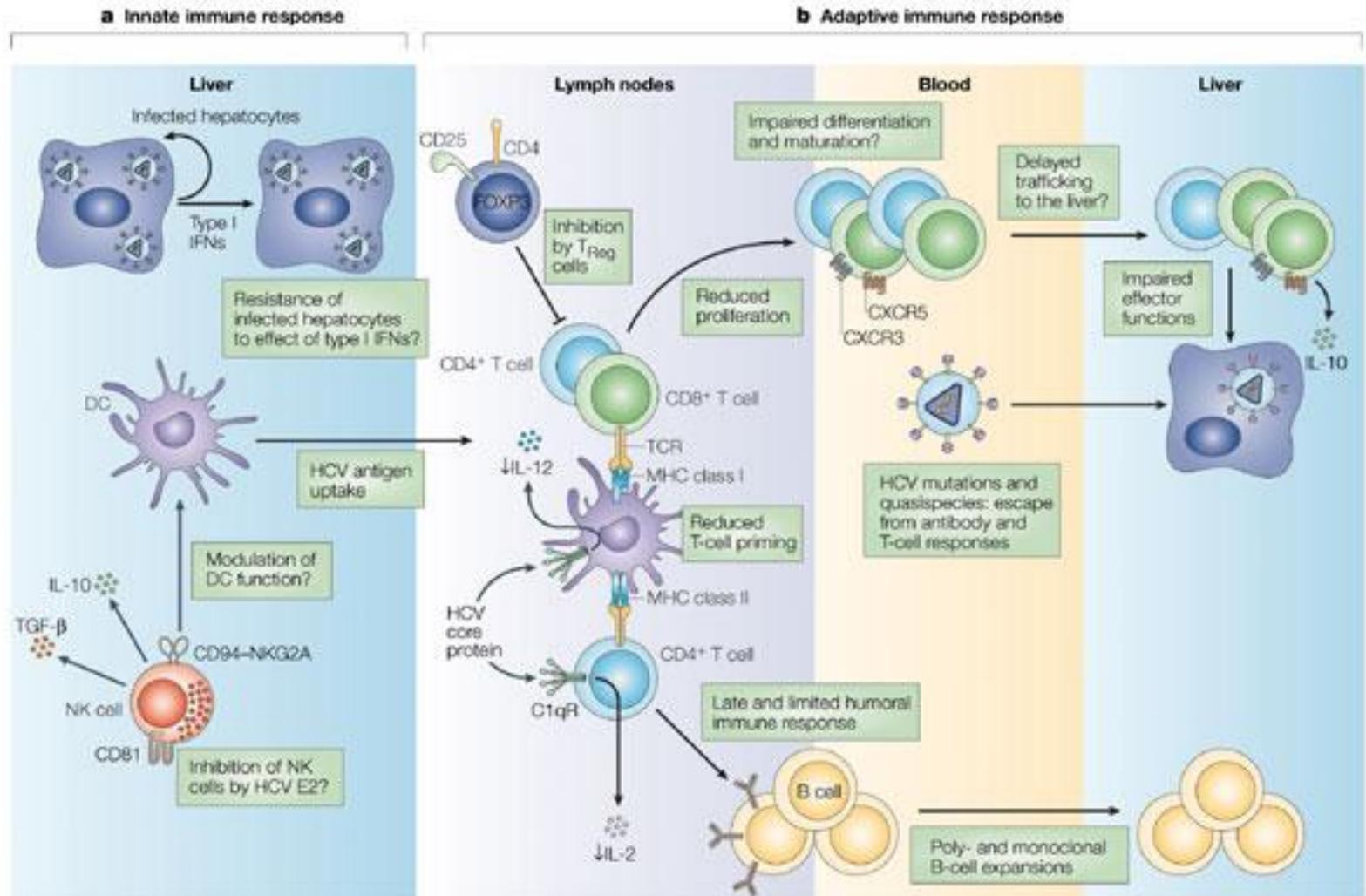


Ciclo de vida



- Lam, N. (1999)
- Roberts, E. (2002)
- Laurent, C. (2001)
- Hamaia, S (2001)
- Favre, D. (2005)
- Petracca, R. (2000)
- Lindenbach (2005)

Inmunopatogenia de la Hepatitis C



Respuesta Inmune anti-HCV

