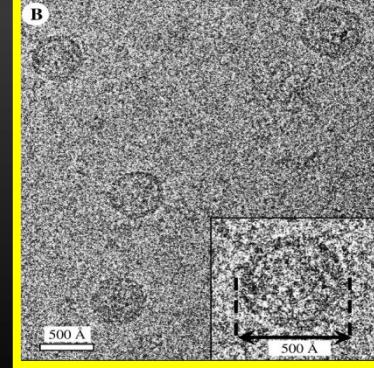


Hipócrates palpando el hígado de un paciente



Virus hepatitis C

# *Una aproximación a la patogénesis de las infecciones virales persistentes crónicas: hepatitis C*

Prof. Dr. José Raúl Oubiña

Cátedra I de Microbiología, Parasitología e Inmunología

Microbiología y Parasitología I



# Objetivos

- ✓ Comprender algunas de las bases por las que una infección viral puede devenir en persistente
- ✓ Analizar algunos factores virales y celulares de la infección por virus hepatitis C (HCV) que promueven su persistencia



# Contenidos

- Introducción a las infecciones virales persistentes crónicas
  - Infección por virus hepatitis C
  - Comparación con la infección por virus hepatitis B

*Se sugiere la observación previa del Seminario inherente al HBV y posteriormente la del video que - como anexo a este Encuentro- se elaboró para compartir el tema “Infección por virus hepatitis B”*



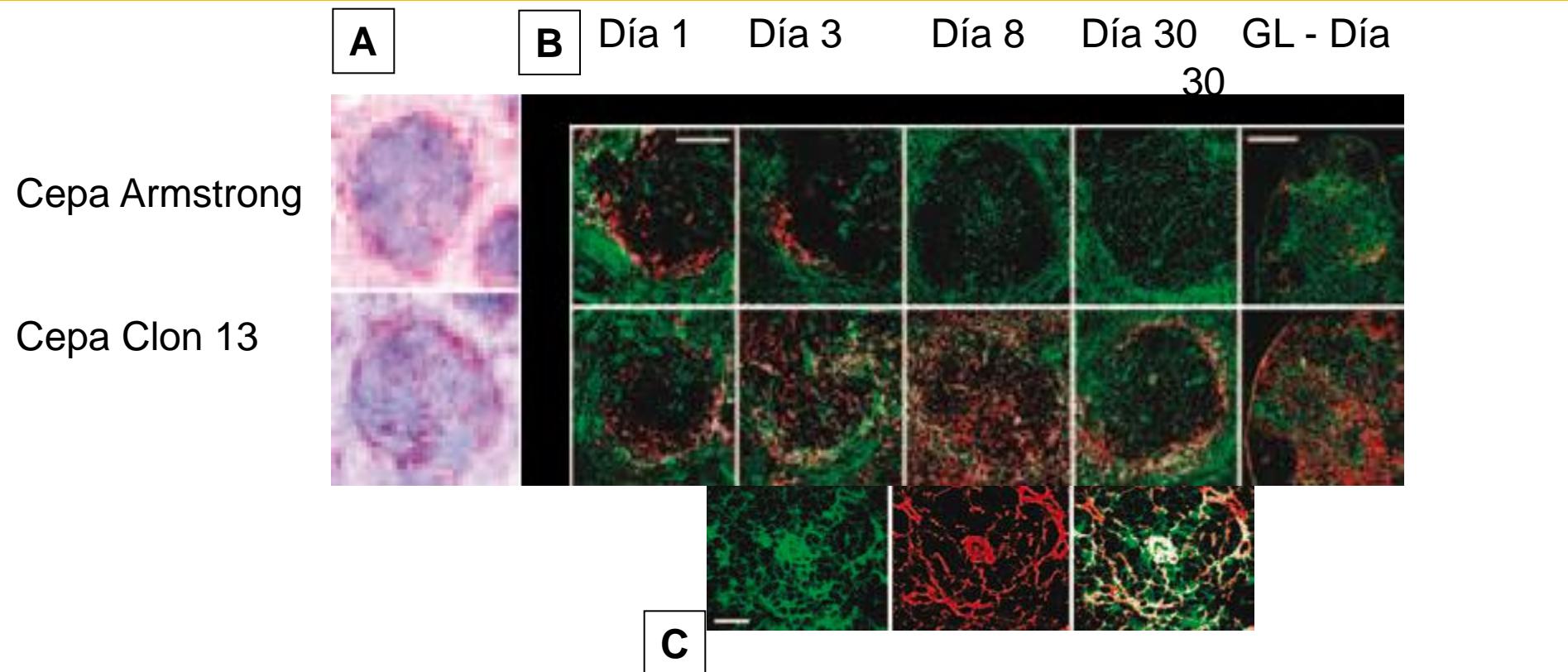
# Infecciones persistentes crónicas: modelo hepatitis C

## ➤ PARTE I

- ¿Por qué algunas infecciones son habitualmente agudas y otras frecuentemente persistentes crónicas?
  - ❖ ¿Cuáles son los elementos de la Rta. Inmune y de los virus que se asocian con frecuencia a infecciones persistentes crónicas?
  - ❖ ¿Cómo actúan?
  - ❖ Algunos ejemplos de importancia médica
- PARTE II: la infección por HCV
  - PARTE III: comparación con la infección producida por HBV.
  - Síntesis.



# Diferencias en el tropismo de un mismo virus (LCM) por CDs y reticulares foliculares se asocian a distintos cursos (agudo vs persistente)



## Patrón reticular de la infección del bazo de ratones infectados con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV).

**A.** Microscopía óptica de cortes histológicos de bazo de ratones infectados 3 días antes con la cepa Armstrong (Arm) o Cl-13 de LCMV marcados para detección de antígenos virales, utilizando hematoxilina como tinción de contraste. **B.** Bazo y ganglio linfático periférico (GL, a la derecha) marcados para detección de antígenos del citoesqueleto de las **células reticulares fibroblásticas (verde)** y para **antígenos de LCMV (rojo)** a los 1, 3, 8 y 30 días post-infección (p.i.). Las regiones de color blanco indican co-localización. Obsérvese que la infección con la cepa Armstrong se limita a los 8 días, mientras que la producida por la cepa LCMV Cl-13 persiste aún a los 30 días p.i. Al día 1 post-infección, ambas cepas se localizan en la zona marginal, exhibiendo un grado similar de infección. A los 3 días p.i. la cepa LCMV Cl-13 pudo detectarse en la pulpa blanca y más intensamente en la pulpa roja, alcanzando el máximo al día 8 p.i. y permaneciendo en altos niveles hasta el día 30 p.i. Contrariamente, la infección con la cepa Armstrong permaneció localizada en la zona marginal, siendo controlada al día 8. Los antígenos de la cepa LCMV Cl-13 (pero no Armstrong) colocalizaron con las células reticulares fibroblásticas. Aumento: 20x (bazo) y 10x (GL). Barra de escala: 100 um (bazo) y 400 um (GL). **C.** Microscopía confocal de cortes histológicos de bazo de ratones infectados con LCMV CL-13 marcados para **PD-L1 (verde)** y **laminina (rojo)**. Las regiones en blanco indican co-localización. La expresión de

LCM  
cepa Armstrong

Diferencias entre dos cepas del arenavirus productor de la coriomeningitis linfocitaria (LCM)



## Infección aguda

Patología por LT CD8+  
Infección de CD: +/-

LCM  
cepa Clon 13  
(2 a.a. ≠ a Arm: 1 en glicoproteína de envoltura  
y en 1 en RNA polimerasa viral)



## Infección persistente

No hay Patología por LT CD8+  
Infección de CD: +++ al interactuar  
mejor con receptor para LCM  
 $\alpha$  distroglicano  
(cambia el tropismo)

↑ Nivel de IL-10  
↑ Expresión de PD-L1 en células infectadas



LCM  
cepa Clon 13  
(2 a.a. ≠ a Arm)



Diferencias entre dos cepas del arenavirus productor de la coriomeningitis linfocitaria (LCM)



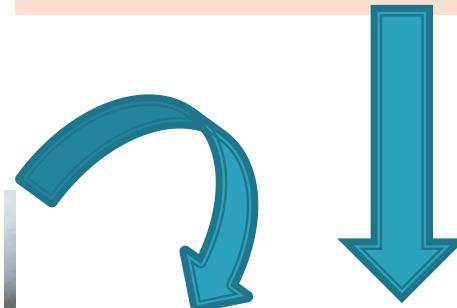
LCM  
cepa Clon 13  
(2 a.a. ≠ a Arm)



## Infección persistente

No hay Patología por LT CD8+  
Infección de CD: +++ al interactuar  
mejor con receptor  
para LCM  
α distroglicano  
(cambia el tropismo)

↑ Nivel de IL-10  
↑ Expresión de PD-L1 en células  
infectadas



¡Transforman la  
infección persistente  
en aguda!



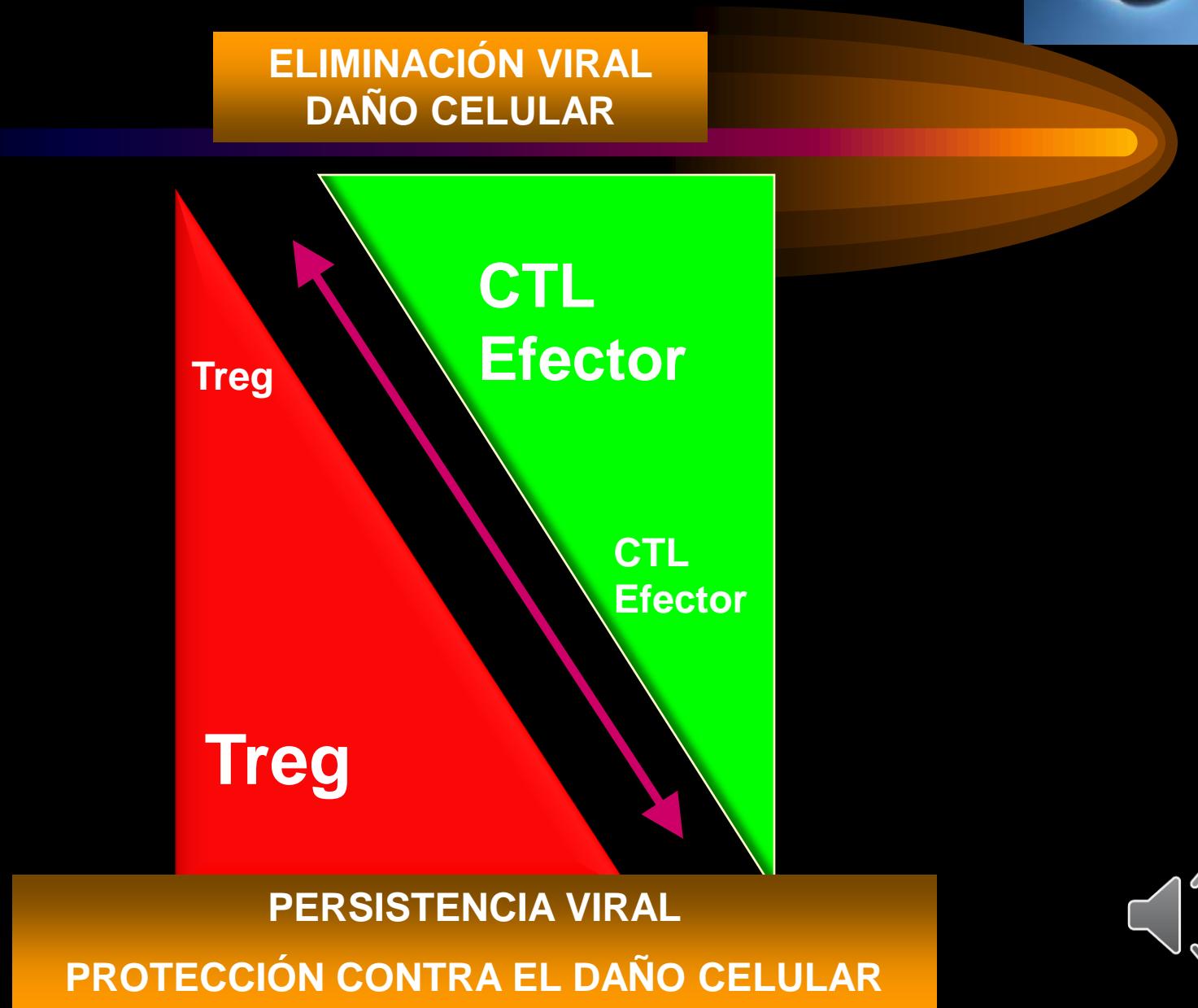
# Infecciones persistentes crónicas: modelo hepatitis C

## ➤ PARTE I

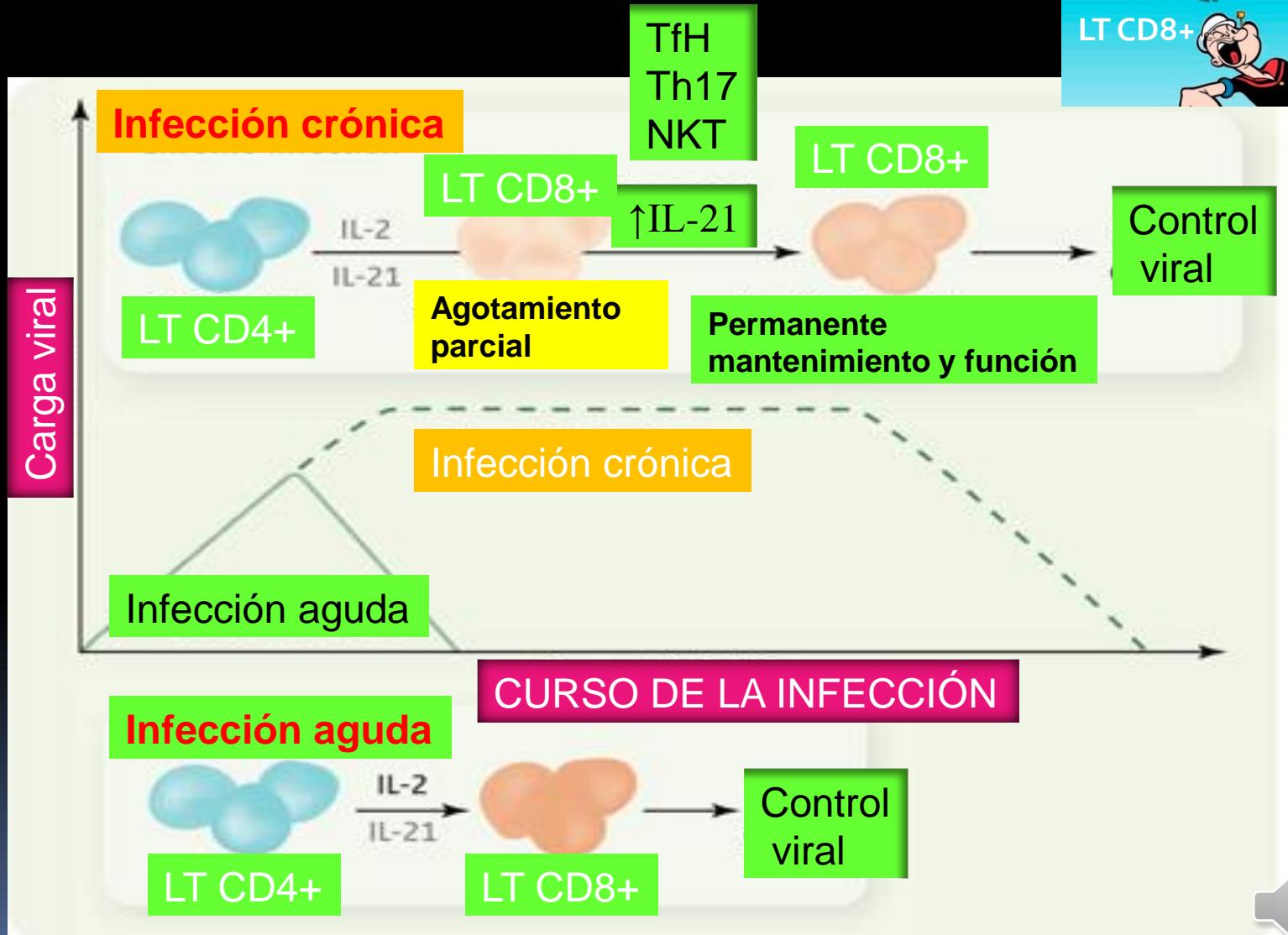
- ✓ ¿Por qué algunas infecciones son habitualmente agudas y otras frecuentemente persistentes crónicas?
- ¿Cuáles son los elementos de la Rta. Inmune y de los virus que se asocian con frecuencia a infecciones persistentes crónicas?
  - ❖ ¿Cómo actúan?
  - ❖ Algunos ejemplos de importancia médica
- PARTE II: la infección por HCV
- PARTE III: comparación con la infección producida por HBV.
- Síntesis.



# *Un balance muy delicado ...*



# Importancia de la IL-21 en el control de las infecciones crónicas



# RESPUESTA INMUNE ANTIVIRAL

DEÉBIL  
OLIGOCLONAL

VIGOROSA  
POLICLONAL  
MULTIESPECÍFICA

AGUDA



Francis V. Chisari

PERSISTENCIA

DÉBIL  
OLIGOCLONAL

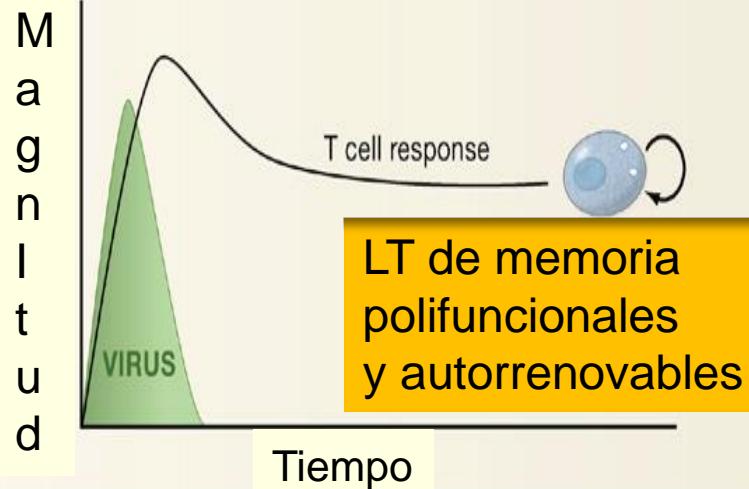
VIGOROSA  
POLICLONAL  
MULTIESPECÍFICA



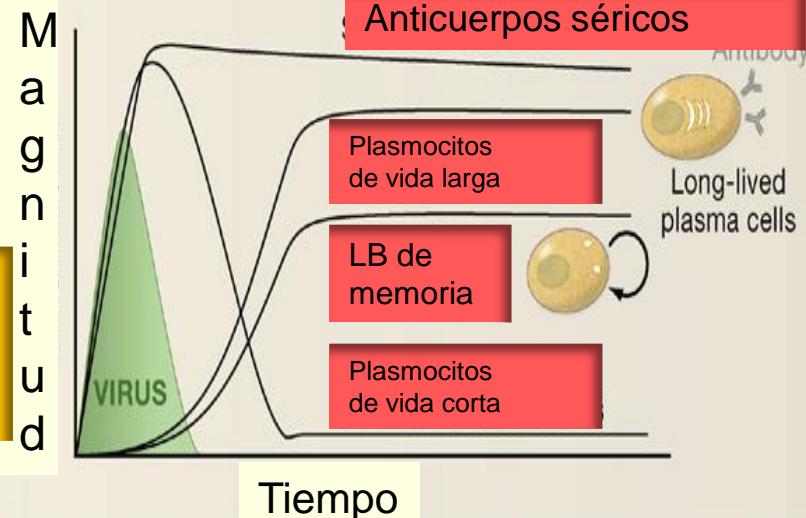
DEÉBIL  
OLIGOCLONAL

## Respuesta T

Inf. aguda

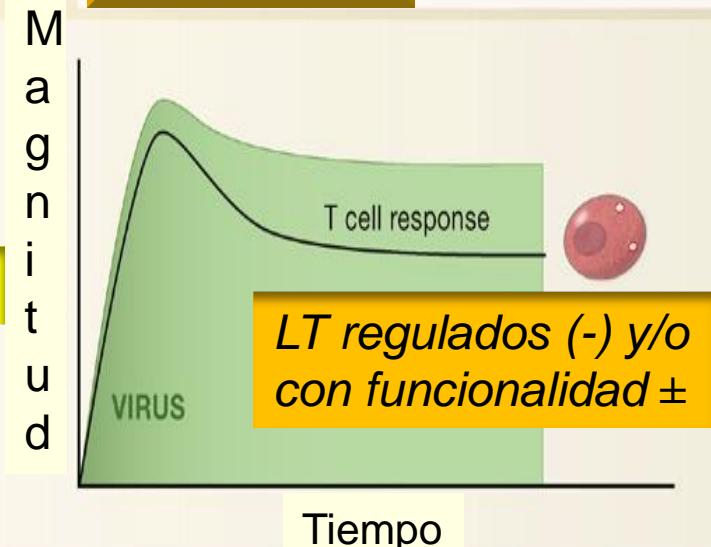


## Respuesta B

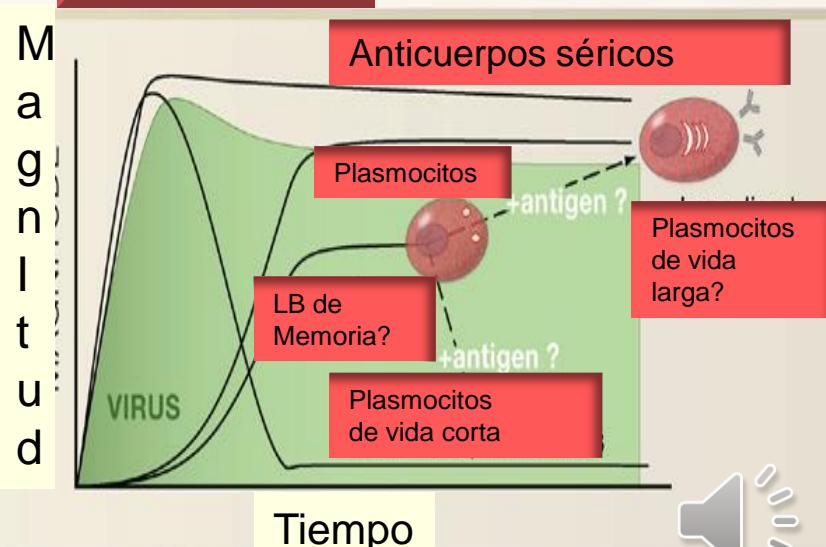


## Respuesta T

Inf. crónica



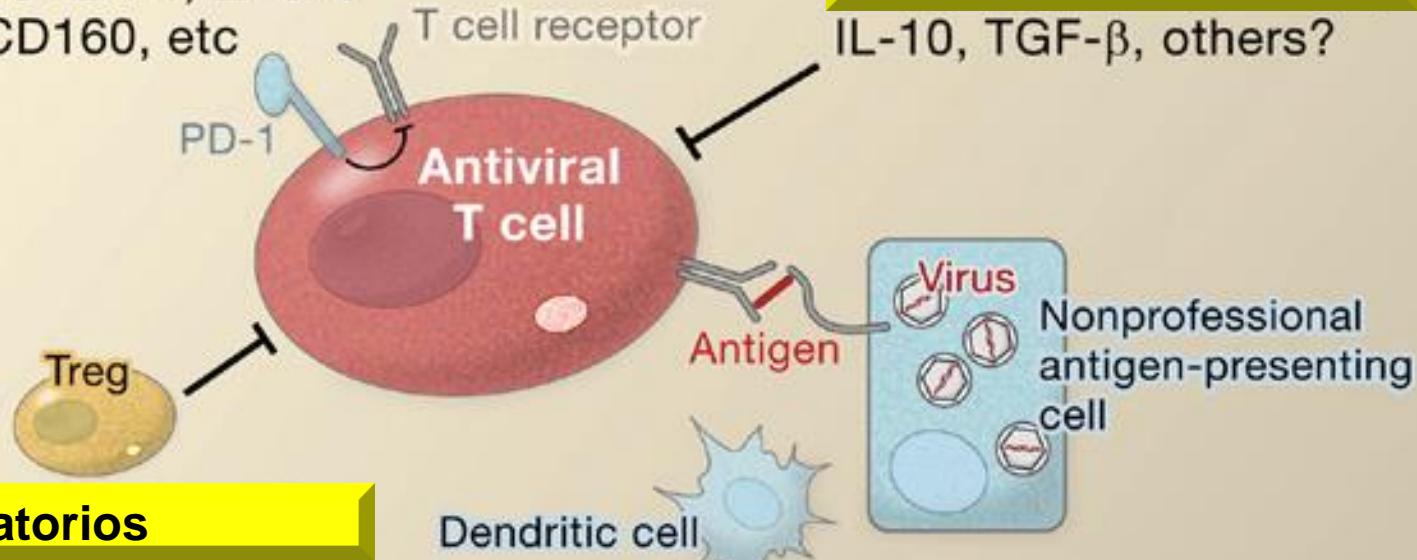
## Respuesta B



# Vías inmunorregulatorias de inhibición de la respuesta T durante la infección crónica

## Receptores inhibitorios

PD-1, CTLA-4, LAG-3  
2B4, CD160, etc



## Citoquinas inmunorregulatorias

IL-10, TGF- $\beta$ , others?

## LT regulatorios

Natural Treg  
Adaptive Treg  
CD8 Treg?  
Myeloid suppressors?

## Células presentadoras de antígenos alteradas

Dendritic cell loss or dysfunction  
Nonprofessional antigen-presenting cell

¡LBregs regulan Tregs!

Virgin & Ahmed, Cell, 2009



# Infecciones persistentes crónicas: modelo hepatitis C

## ➤ PARTE I

- ✓ ¿Por qué algunas infecciones son habitualmente agudas y otras frecuentemente persistentes crónicas?
  - ✓ ¿Cuáles son los elementos de la Rta. Inmune y de los virus que se asocian con frecuencia a infecciones persistentes crónicas?
  - ¿Cómo actúan?
  - Algunos ejemplos de importancia médica
- PARTE II: la infección por HCV
  - PARTE III: comparación con la infección producida por HBV.
  - Síntesis.



# Patogénesis de las infecciones virales: síntesis (I)

## Algunos ejemplos de factores asociados a la persistencia viral crónica



### Factores virales

Cambios en el tropismo por CD

Variación Ag (evasión al sistema inmune)

Ataque al sistema inmune

Regulación de la apoptosis



### Factores del hospedador

Bases genéticas de la Rta. Inmune

Inmunodeficiencia humoral y/o celular

Agotamiento T



# Infecciones persistentes crónicas: modelo hepatitis C

## ✓ PARTE I

- ✓ ¿Por qué algunas infecciones son habitualmente agudas y otras frecuentemente persistentes crónicas?
- ✓ ¿Cuáles son los elementos de la Rta. Inmune y de los virus que se asocian con frecuencia a infecciones persistentes crónicas?
- ✓ ¿Cómo actúan?
- ✓ Algunos ejemplos de importancia médica

## ➤ PARTE II: la infección por HCV

- PARTE III: comparación con la infección producida por HBV.
- Síntesis.



# HEPATITIS C: SOY CLONADO, LUEGO EXISTO

---

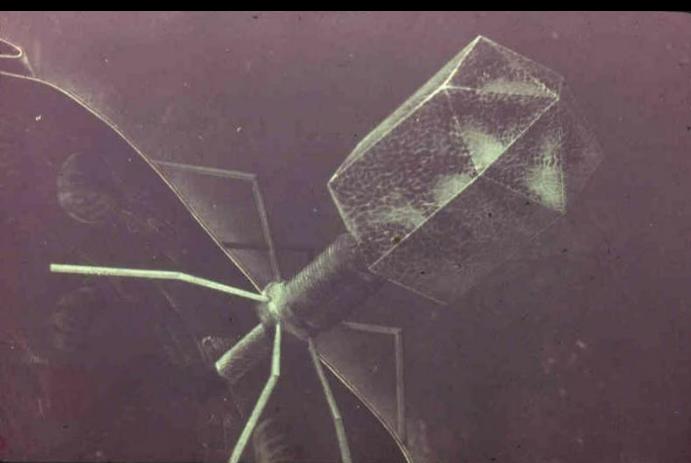
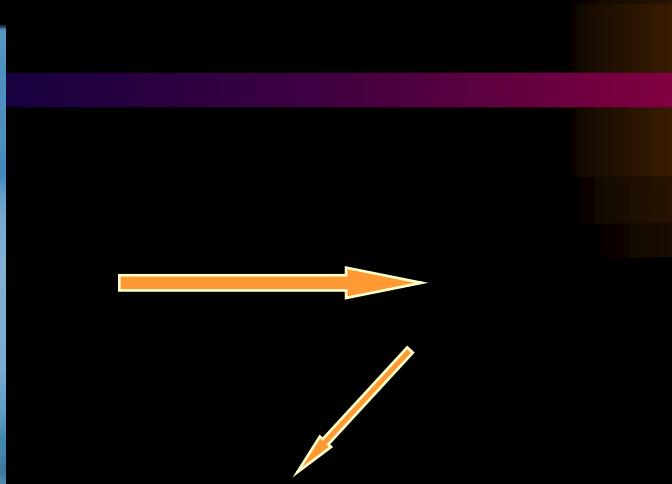
Por medio de la biología molecular se pudo detectar la existencia de este virus, que ya había sido muy bien identificado por la investigación clínica.



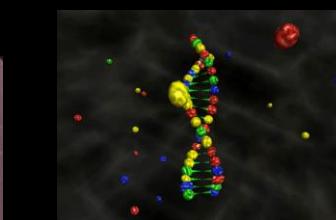
# Hepatitis C

- Estructura y función
- Replicación viral y sus implicancias en la epidemiología molecular, la patogénesis, el diagnóstico, la profilaxis y el tratamiento
- Inmunopatogénesis molecular de la hepatitis C a nivel hepático y su relación con el diagnóstico
- Inmunopatogénesis molecular de las manifestaciones extra-hepáticas

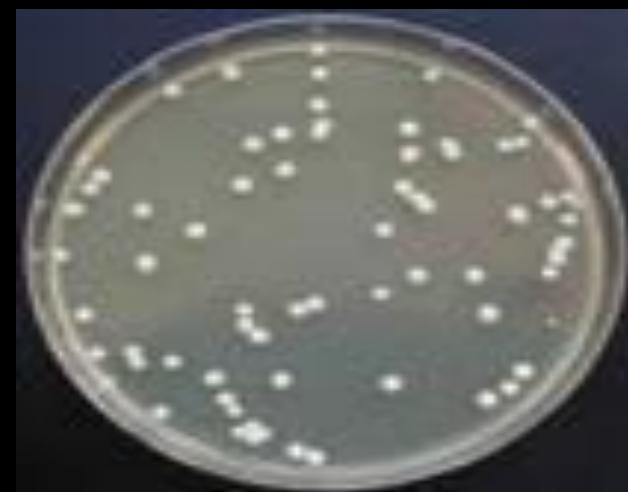
# *¿Cómo se descubrió el HCV?*



Clonado en vector  $\lambda$  gt11



DNAc  
(de RNA y DNA)



850.000 clones analizados con... Acs de un paciente con Hepatitis NoA NoB





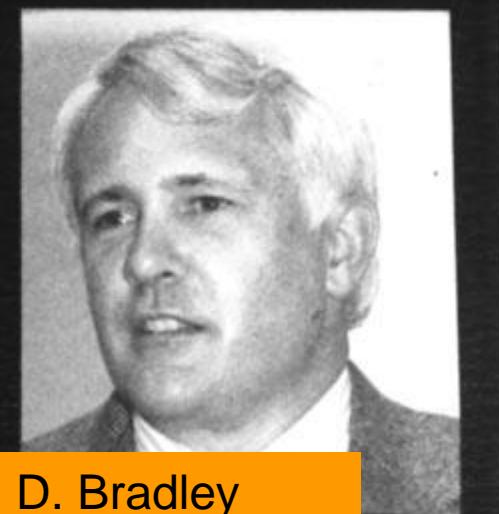
M. Houghton



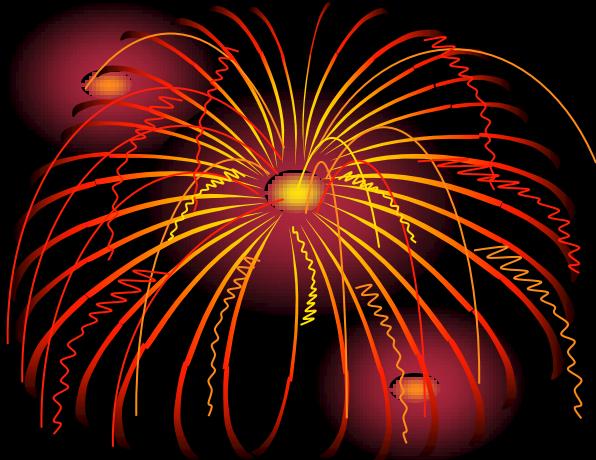
Q-L Choo



G. Kuo



D. Bradley

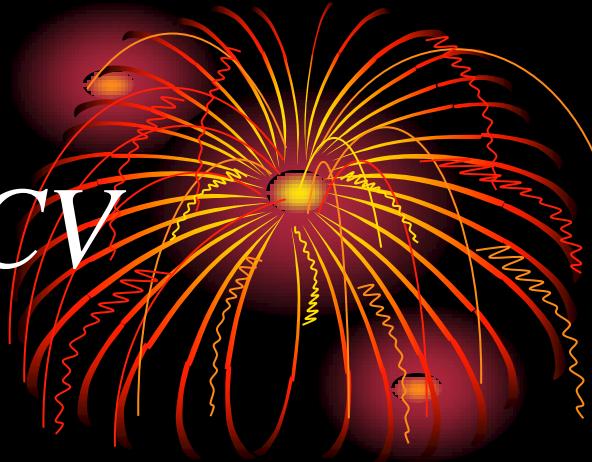


**¡Por primera vez en la historia se descubre un virus al margen de su morfología y constitución antigénica!**

**¡Es el virus  
de la Hepatitis C!**



# *Morfología del HCV*



*Partícula de 55 –  
65 nm con finas  
proyecciones  
espiculadas.*

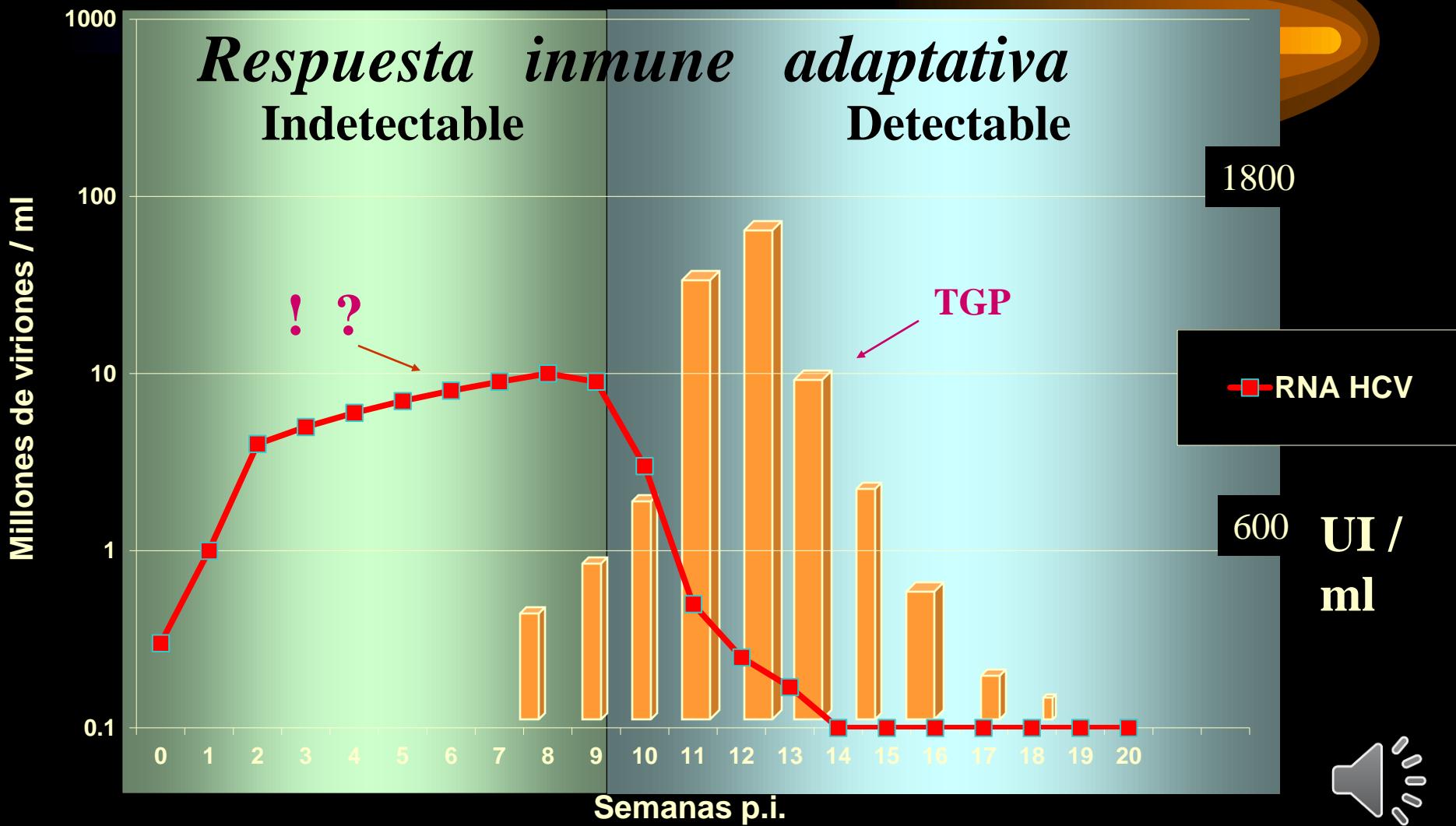
*Kaito M. y col.. J Gen  
Virol 75: 1755- 1760,  
1994.*



50 nm



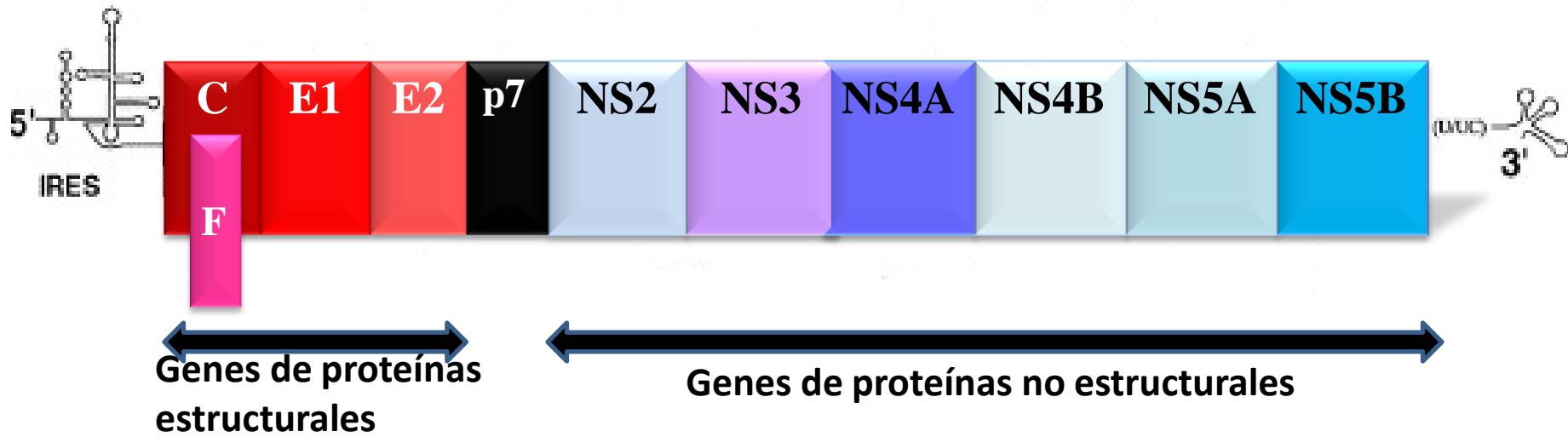
# *RNA sérico del HCV y lesión hepática en la infección autolimitada*



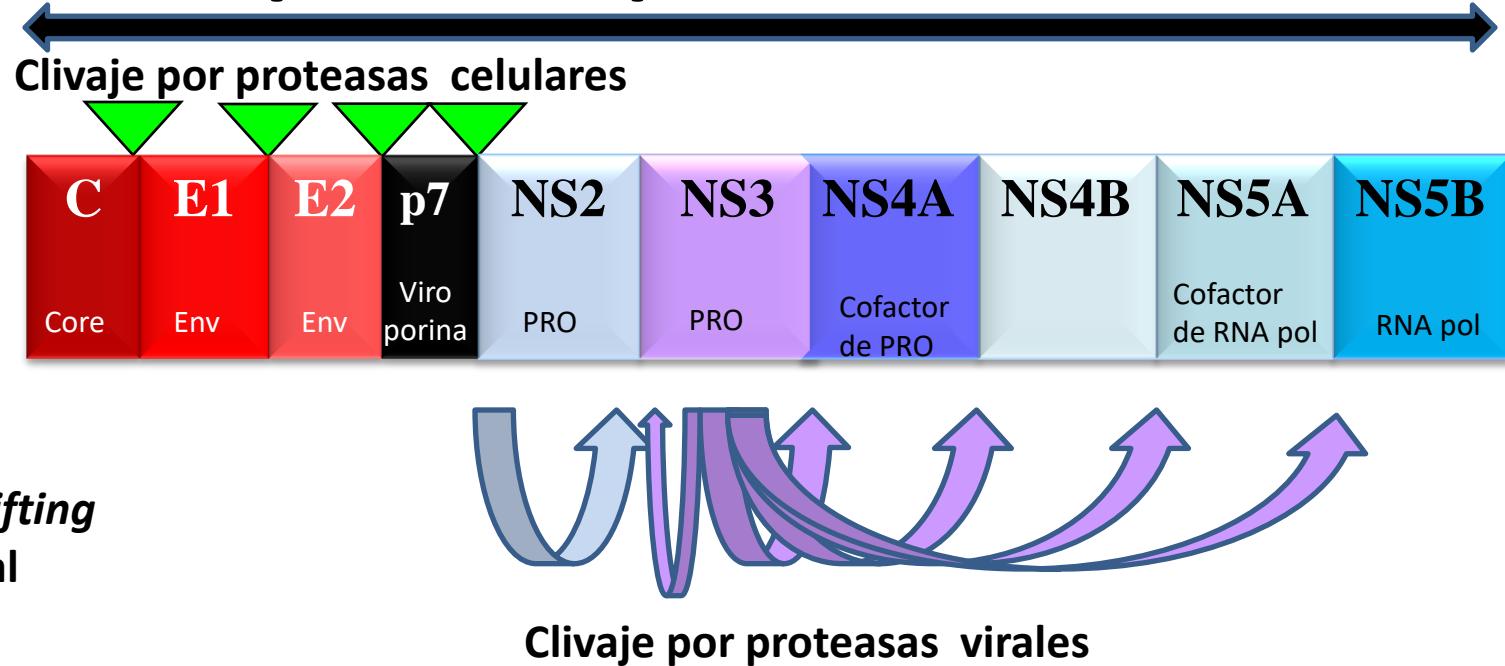
# Dinámica viral

	<i>HBV Adefovir</i>	<i>HBV Lamivudine</i>	<i>HIV Ritonavir</i>	<i>HCV Ifn alfa</i>
<i>Virus en plasma Vida 1/2</i>	26,4 h	14 h	5,8 h	2,7 - 7,2 h
<i>Producción viral / día</i>	$2,1 \times 10^{12}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$1,1 - 12,7 \times 10^{11}$
<i>Células infectadas Vida 1/2</i>	11 - 30 días	10 - 100 días	1,6 días	2,4 - 4,9 días

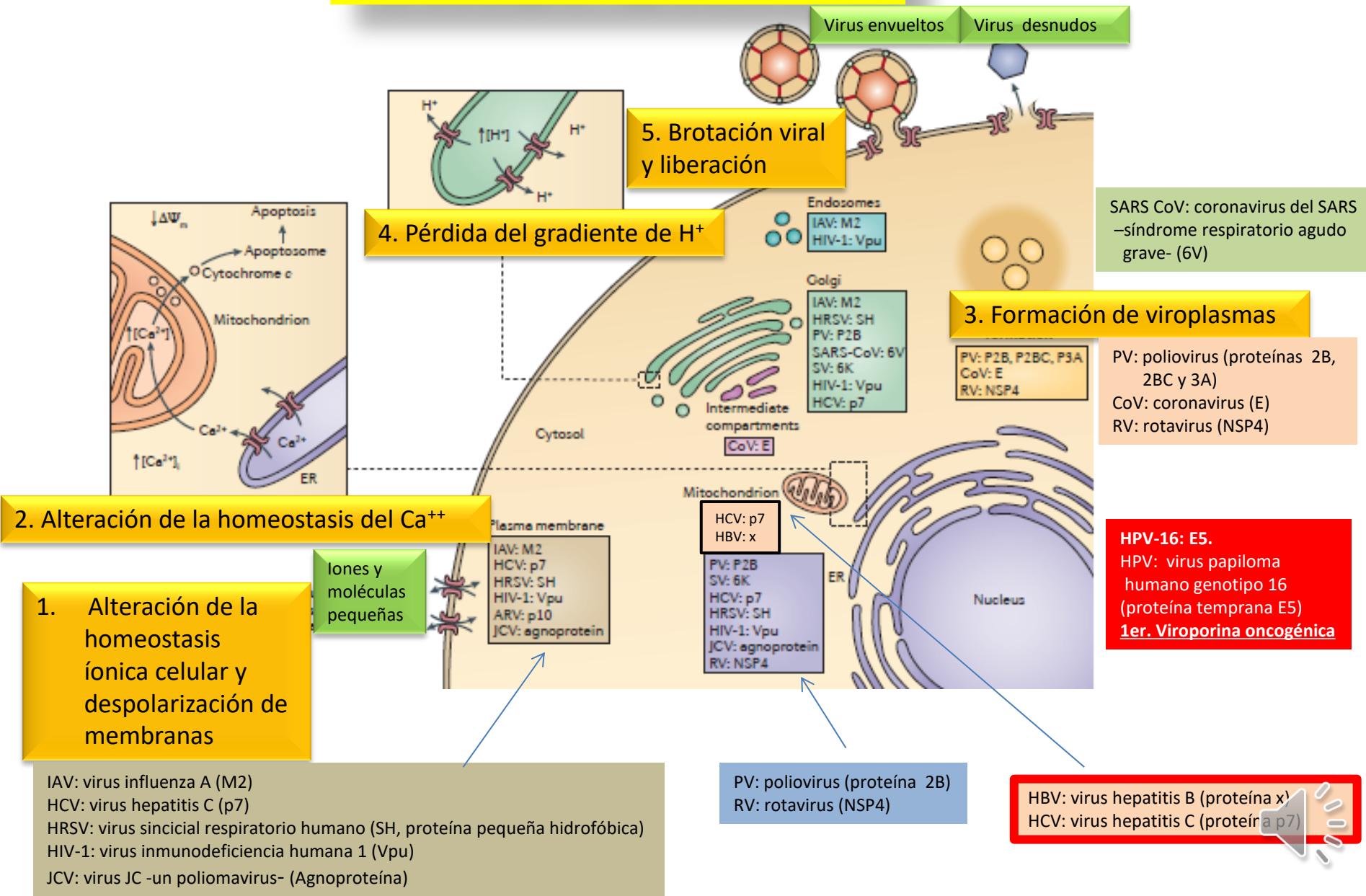




## Poliproteína precursora del HCV



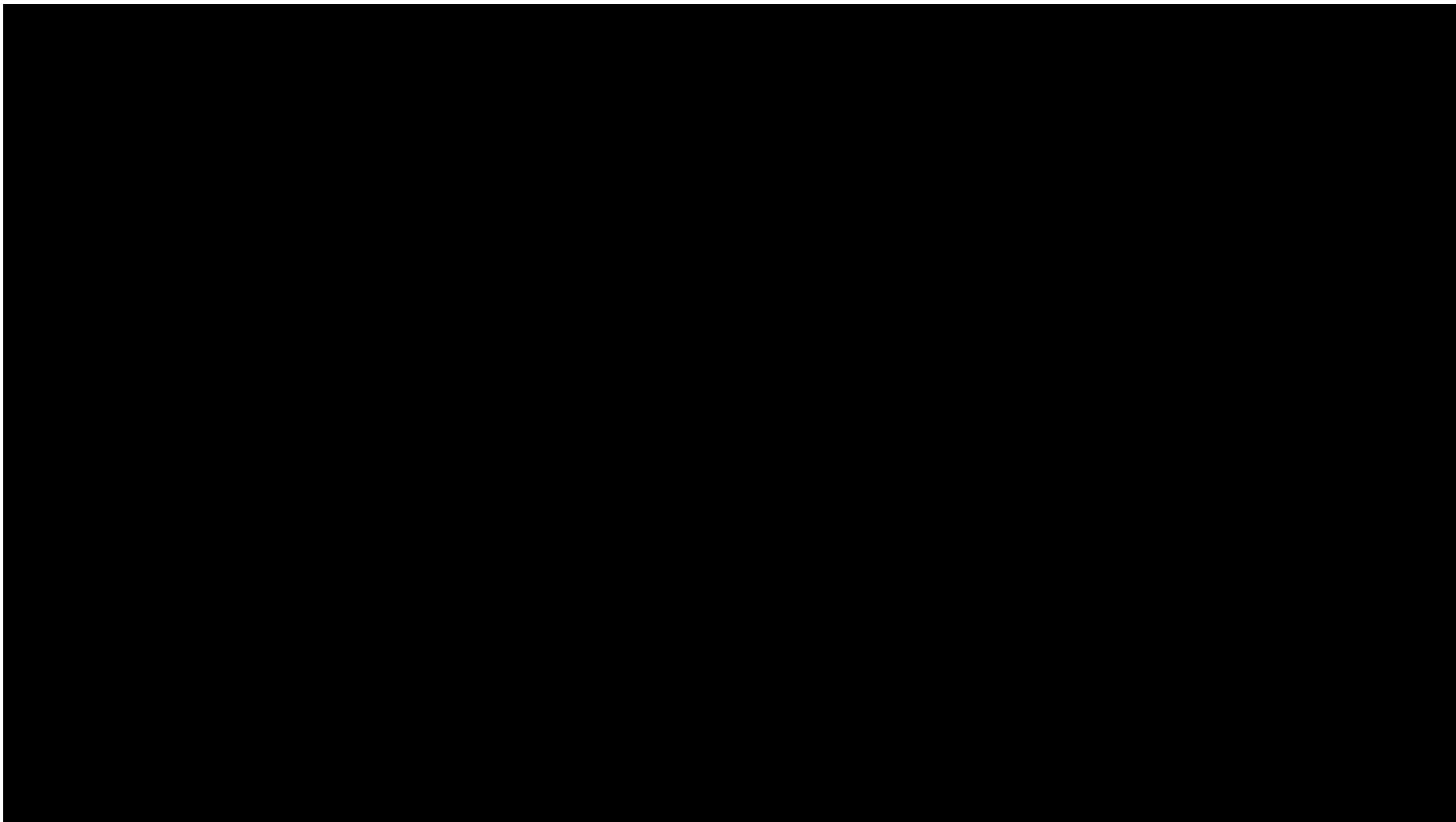
# VIROPORINAS

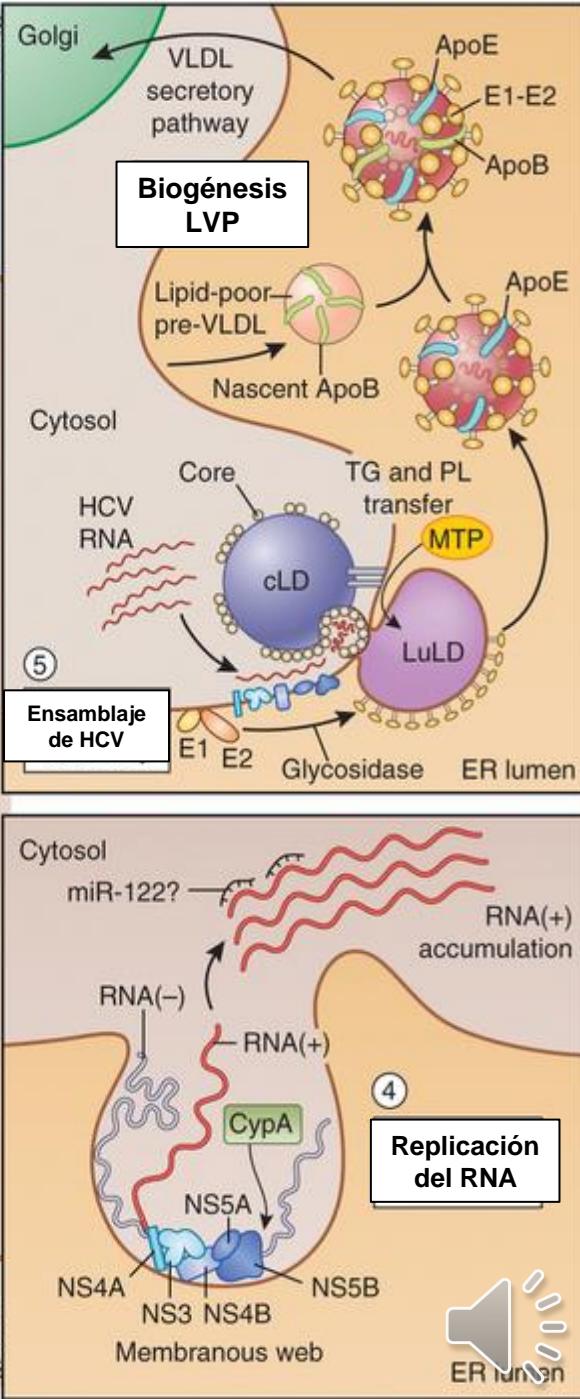
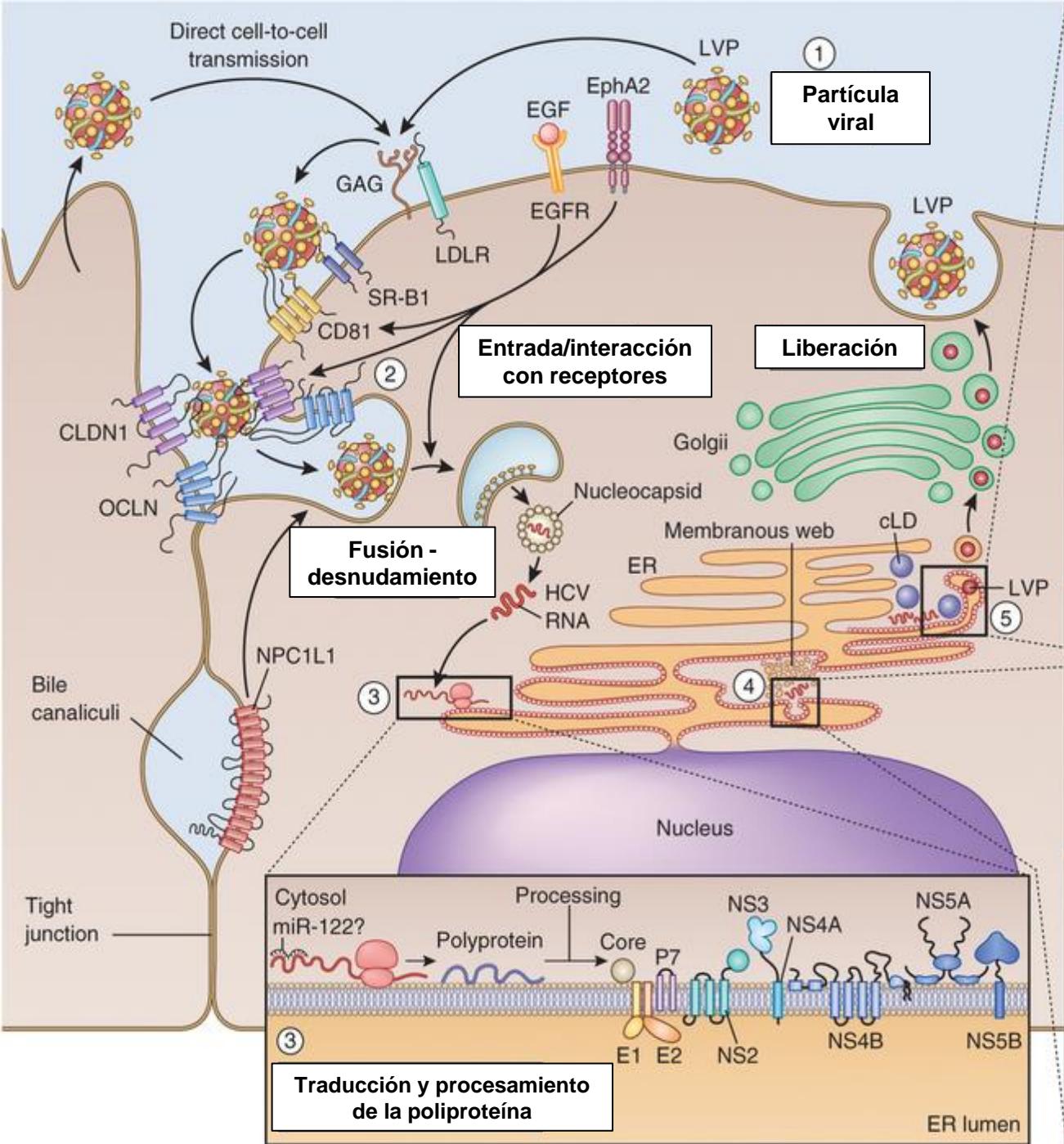


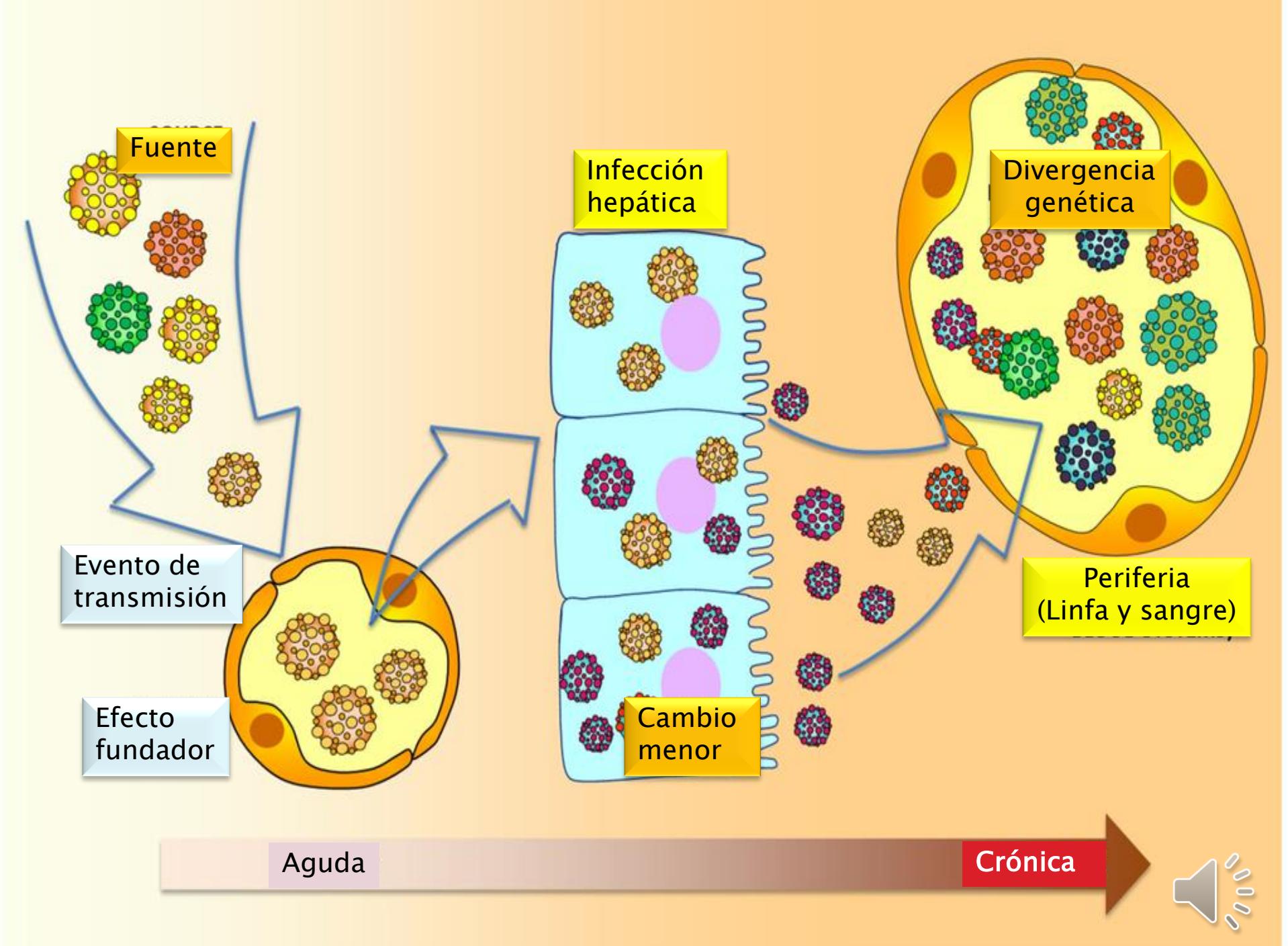
# Hepatitis C

- ✓ Estructura y función
- Replicación viral y sus implicancias en la epidemiología molecular, la patogénesis, el diagnóstico, la profilaxis y el tratamiento
- Inmunopatogénesis molecular de la hepatitis C a nivel hepático y su relación con el diagnóstico
- Inmunopatogénesis molecular de las manifestaciones extra-hepáticas

# Replicación del HCV: video







HCV  
en el  
hepatocito



¡No pasa desapercibido!



# Ciclo de replicación del HCV

HCV  
más  
Lipoproteínas

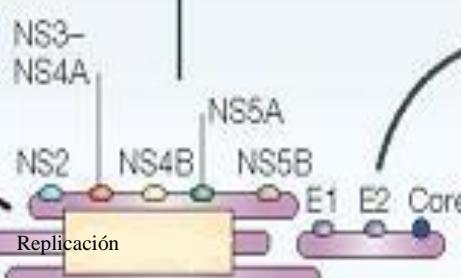


Receptores  
y correceptores

Entrada  
Endosoma

Genomas de la  
Progenie

Desnudamiento  
Traducción



Complejo de  
Ensamblaje Golgi

Exocitosis

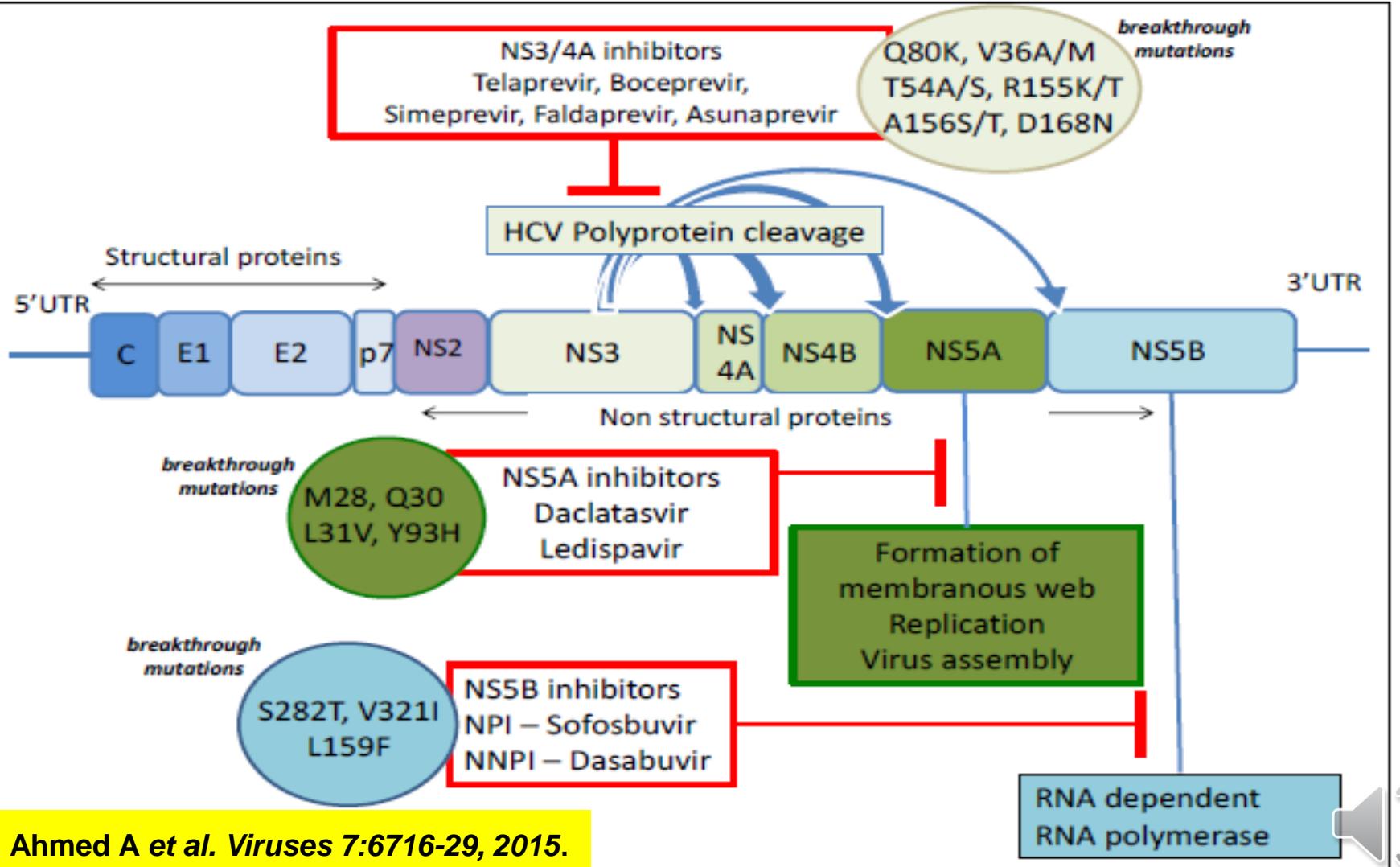
HCV en el  
hepatocito



¡No pasa desapercibido!

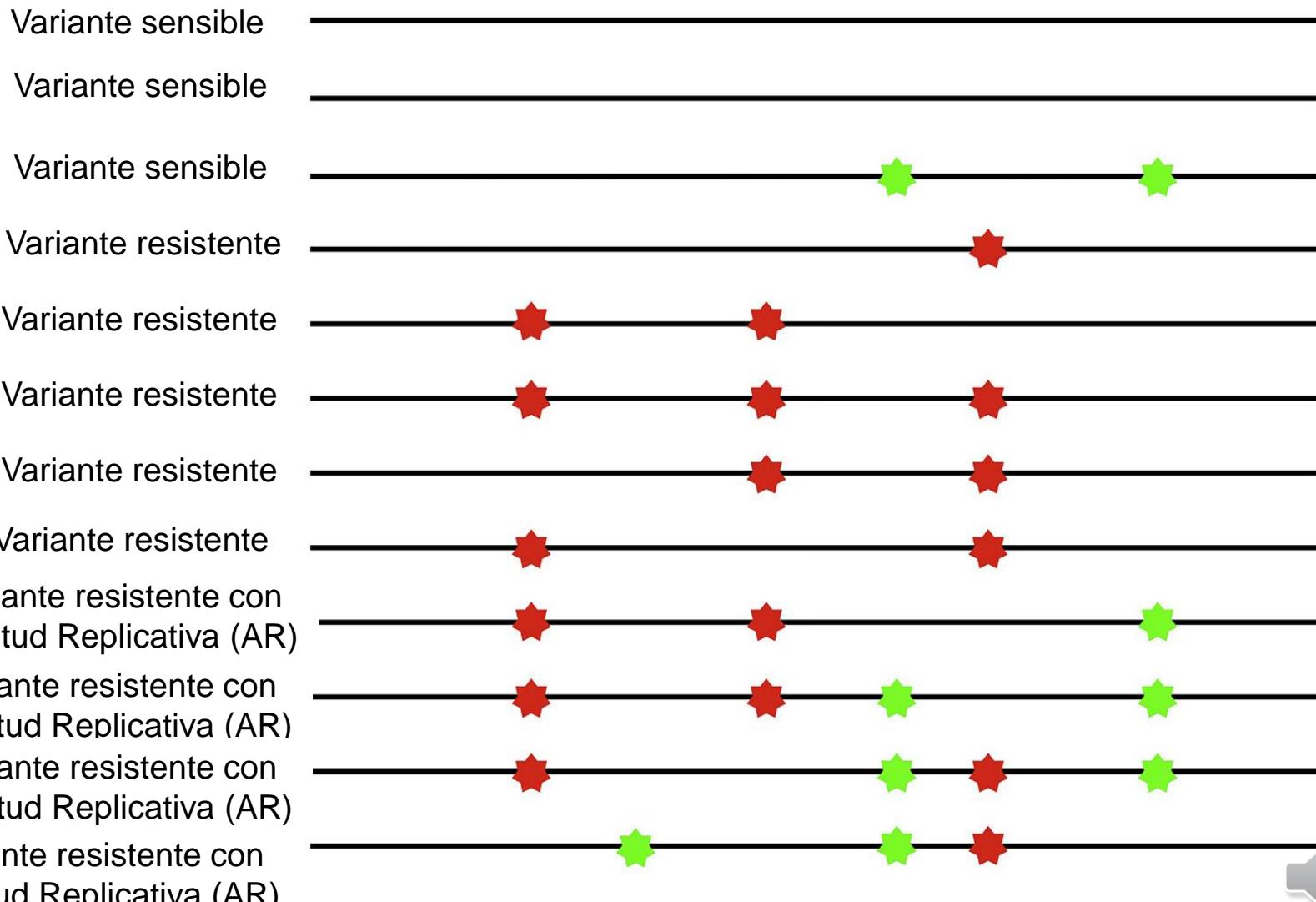


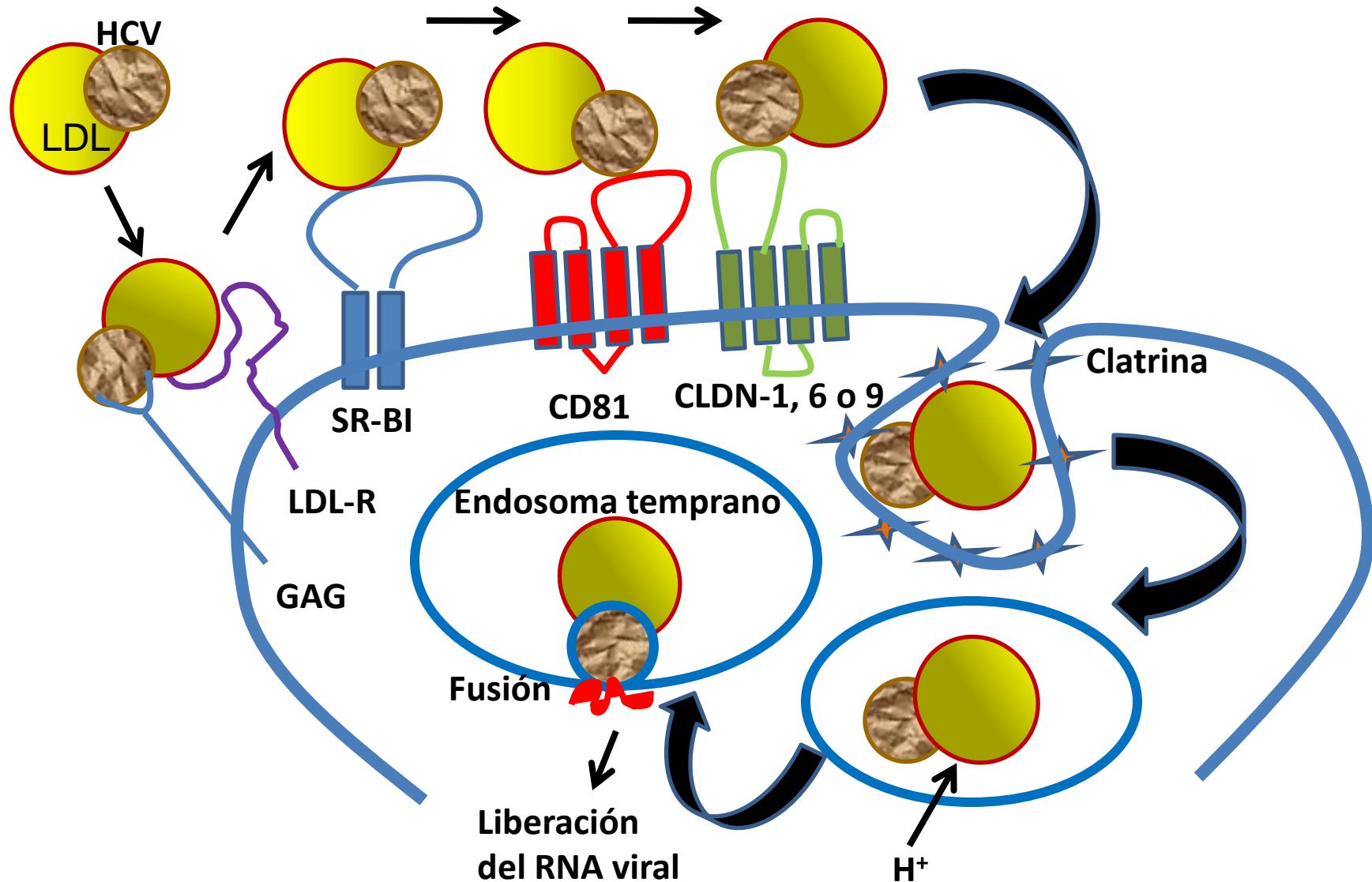
# La replicación viral ofrece blancos para la terapéutica (DAADs)

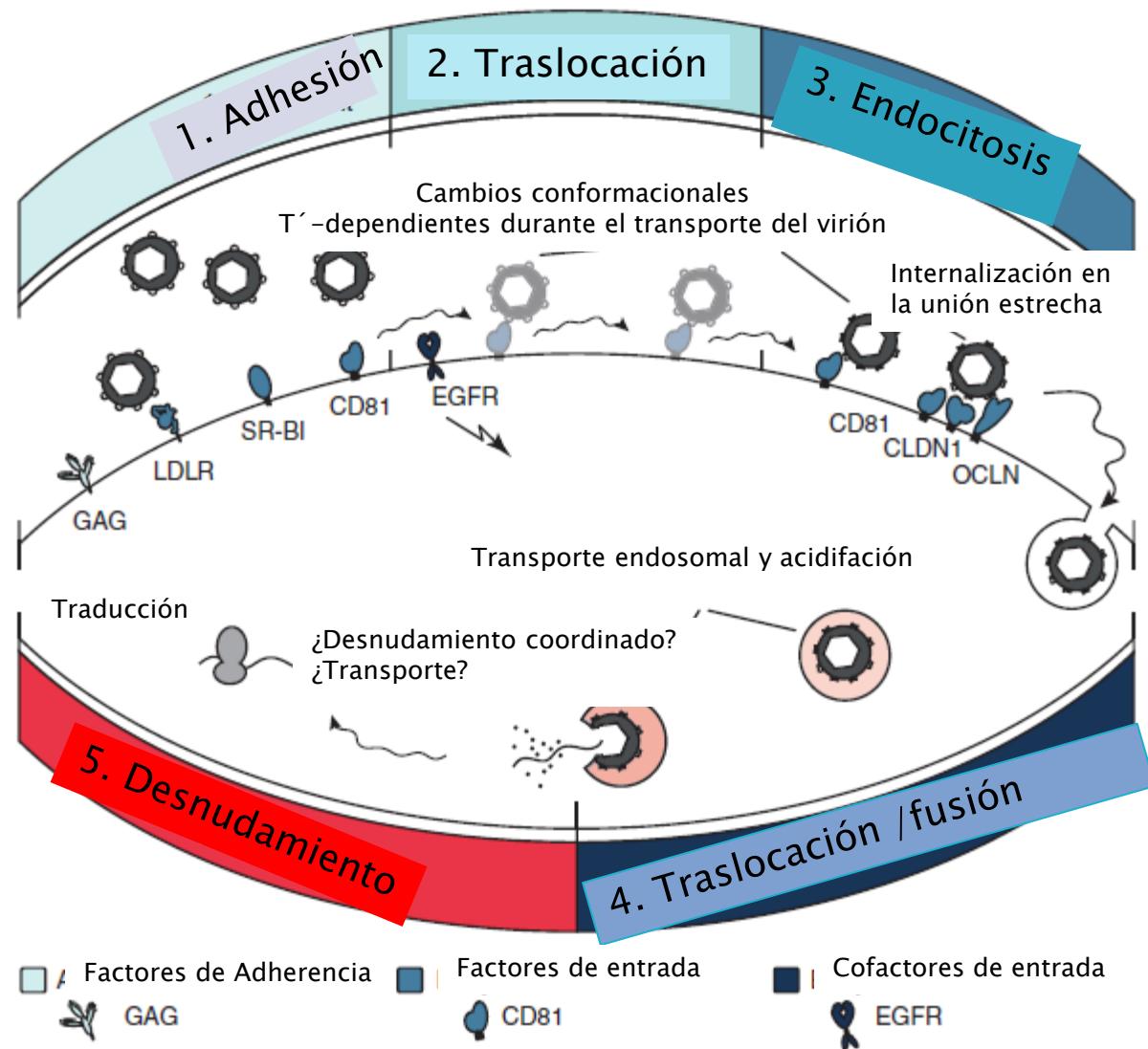


## Cuasiespecies del HCV

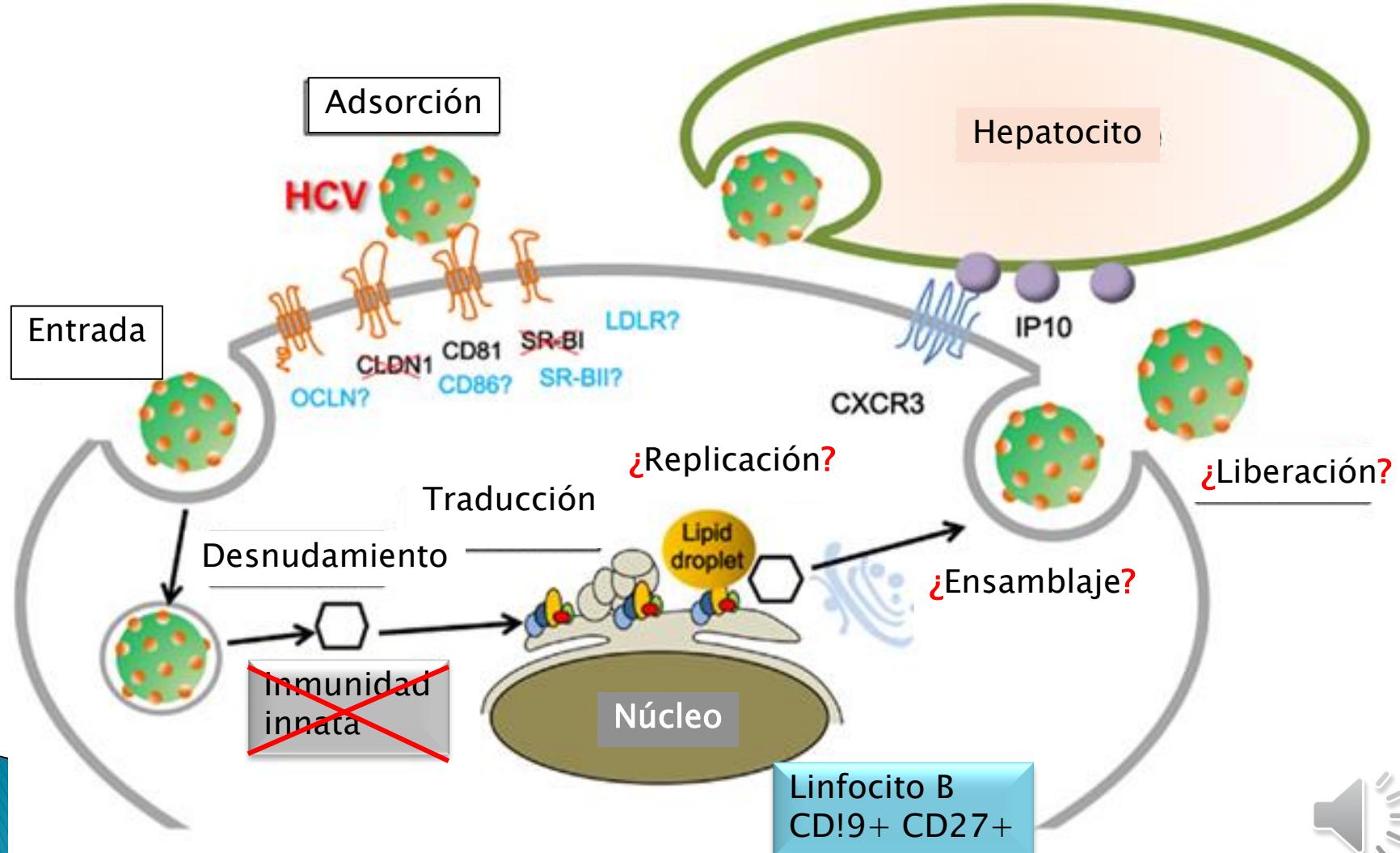
- ★ Sustituciones asociadas a Resistencia (RAS)
- ★ Sustituciones asociadas a la aptitud replicativa (*fitness*)



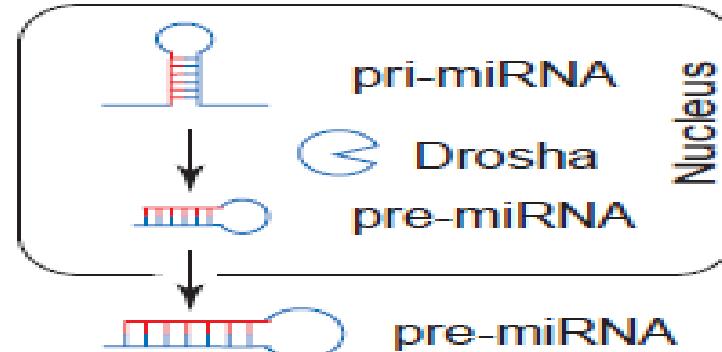
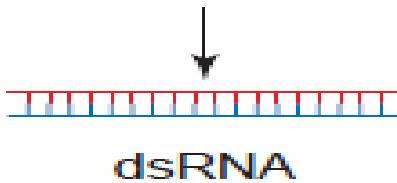




**Tropismo celular:** hepatocitos, linfocitos B, linfocitos T, macrófagos  
 Utilización de diferentes receptores celulares y adecuación de E1/E2 viral  
**CD5 es un receptor para HCV en los LT**



# Virus

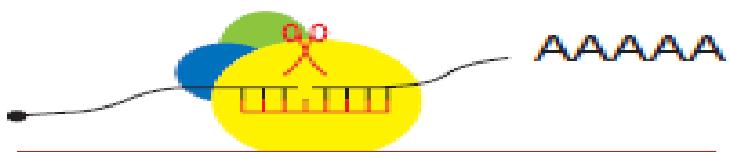


**miR122 (celular)  
promueve la  
replicación del  
HCV: ¡BLANCO  
TERAPÉUTICO!**



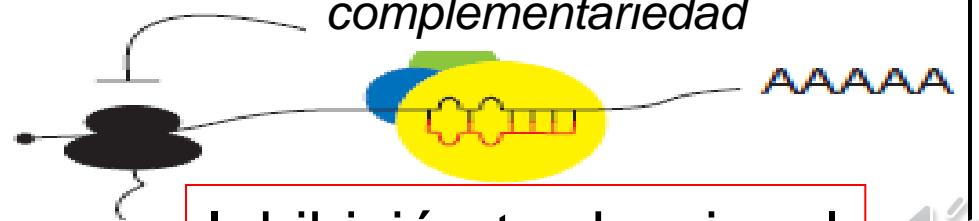
## Reconocimiento de la secuencia blanco

*Perfecta  
complementariedad*



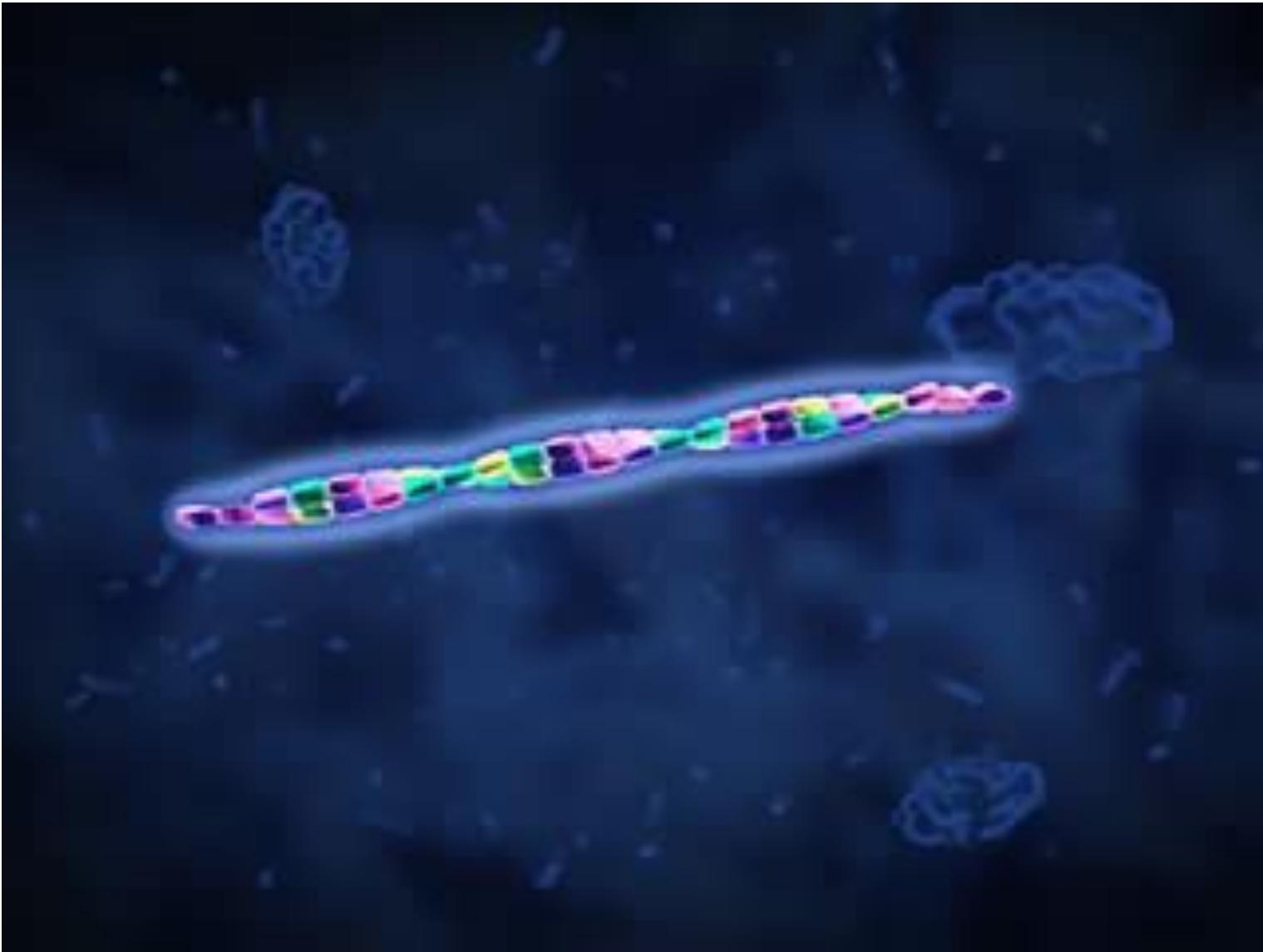
**Clivaje del RNA blanco**

*Imperfecta  
complementariedad*



**Inhibición traduccional**

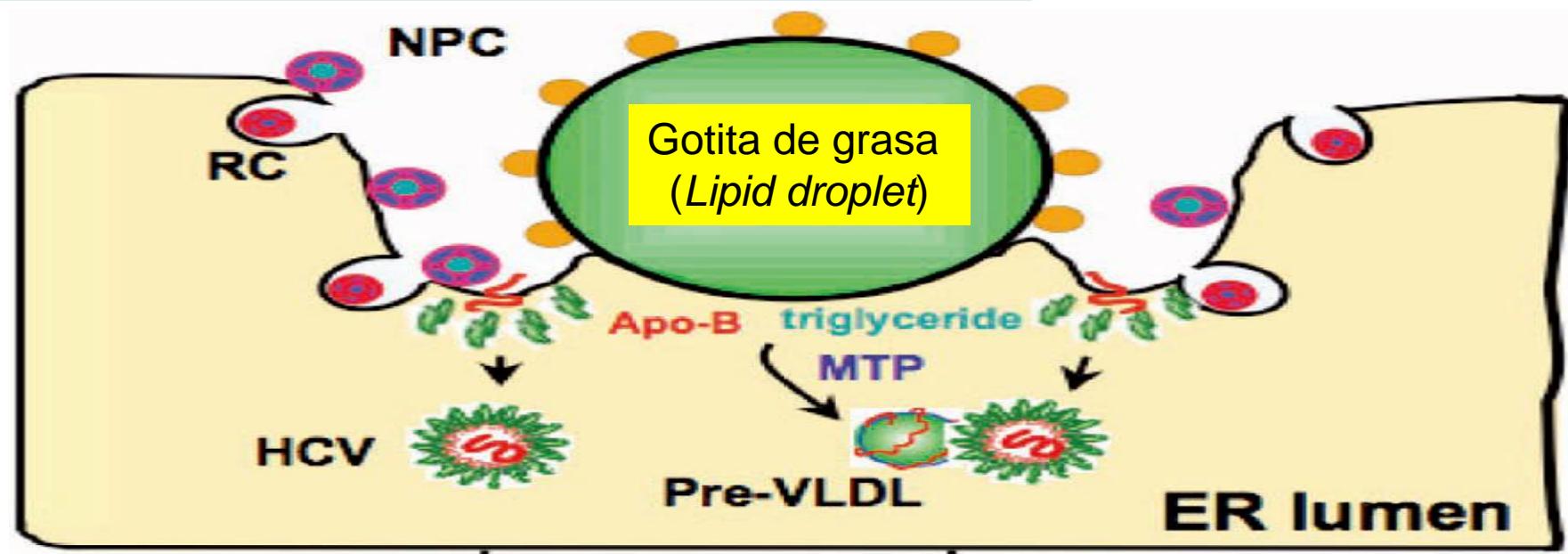
# ¿Cómo actúan los miRNAs?



# El HCV aumenta las gotitas de grasa:

Fuente: Ogawa et al, Proc Jpn Acad Sci 85,: 217, 2009

1. Aumentando la lipidogénesis ( $\uparrow$  factor transcripcional SREBP por core)
2.  $\downarrow$  actividad de MTP (por Core y NS5A)



**NPC:** non structural protein complex

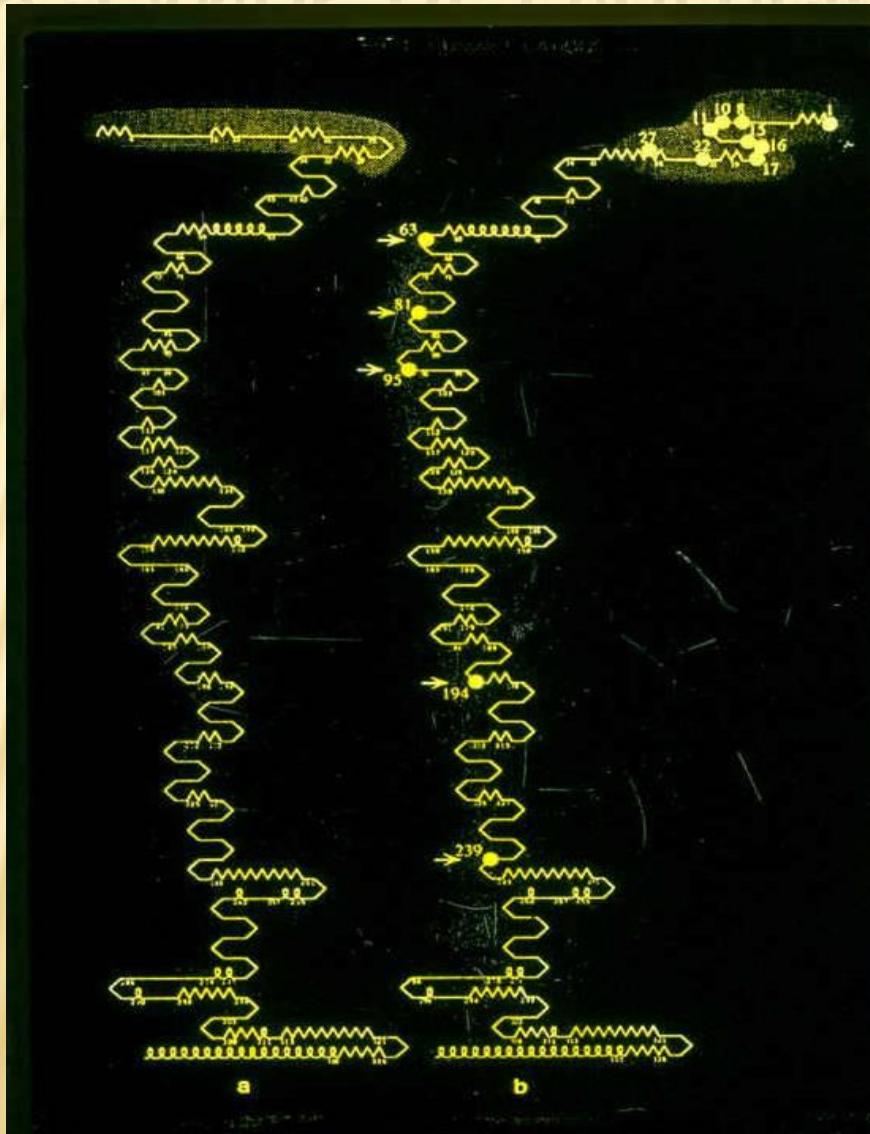
**RC:** replication complex

**MTP:** microsomal triglyceride transfer protein

**VLDL:** very low density lipoprotein



# VARIABILIDAD DE LA ENVOLTURA DE HCV AL CABO DE 8,2 AÑOS DE EVOLUCIÓN



La mayoría de las mutaciones nucleotídicas afectan aminoácidos de la porción más hidrofílica de la envoltura viral (círculos amarillos), afectando su antigenicidad según la predicción de la nueva estructura secundaria por lo cual los anticuerpos específicos generados, no reconocen al virión.



# ¿Cómo escapar de la Respuesta inmune?

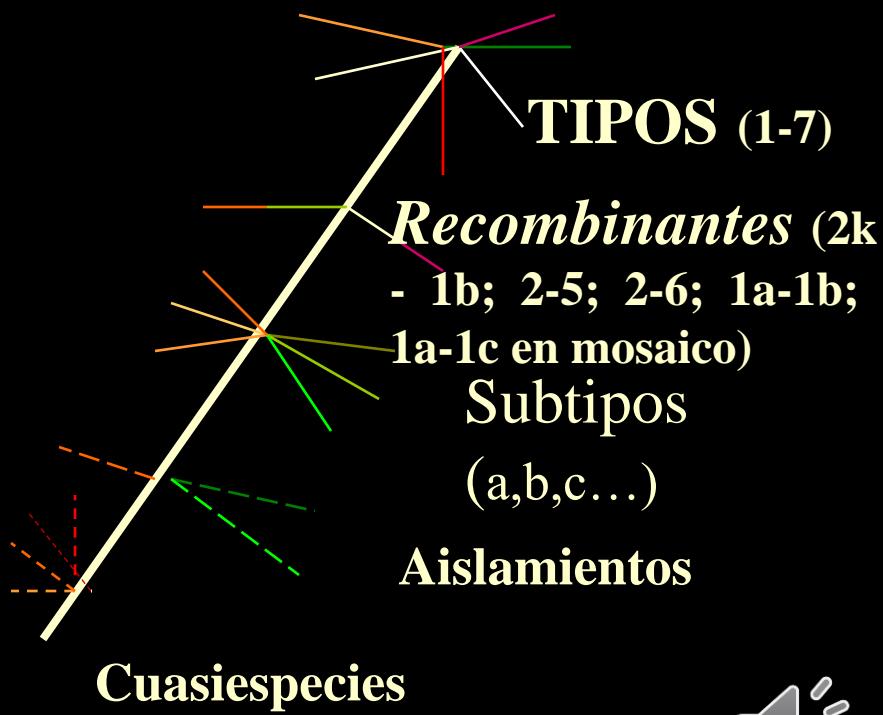


- *Modificación de epítopes T y/o B: Mutantes de Escape para evitar CTLs y anticuerpos neutralizantes*

¿Causa o consecuencia de la persistencia viral?



# *Diversidad del HCV*

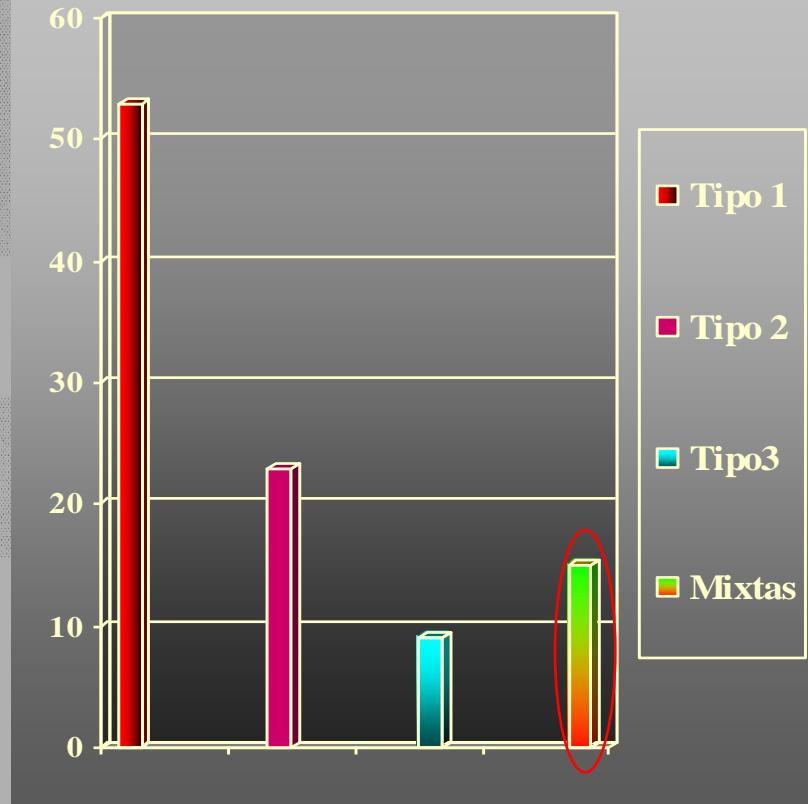
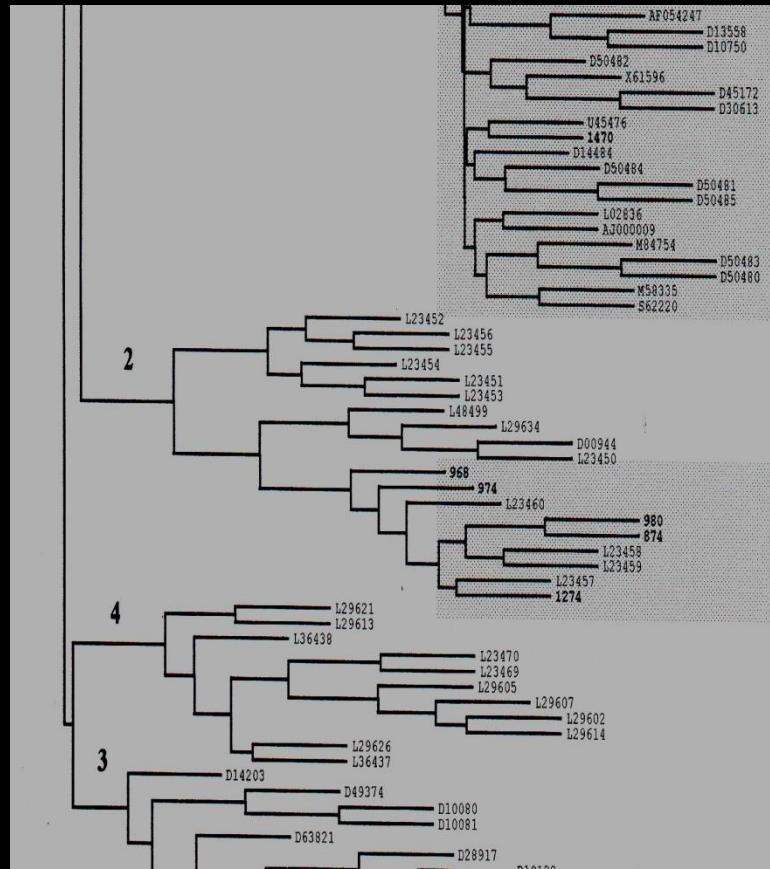


# *Variabilidad y diversidad*



Mathet et al. 2007

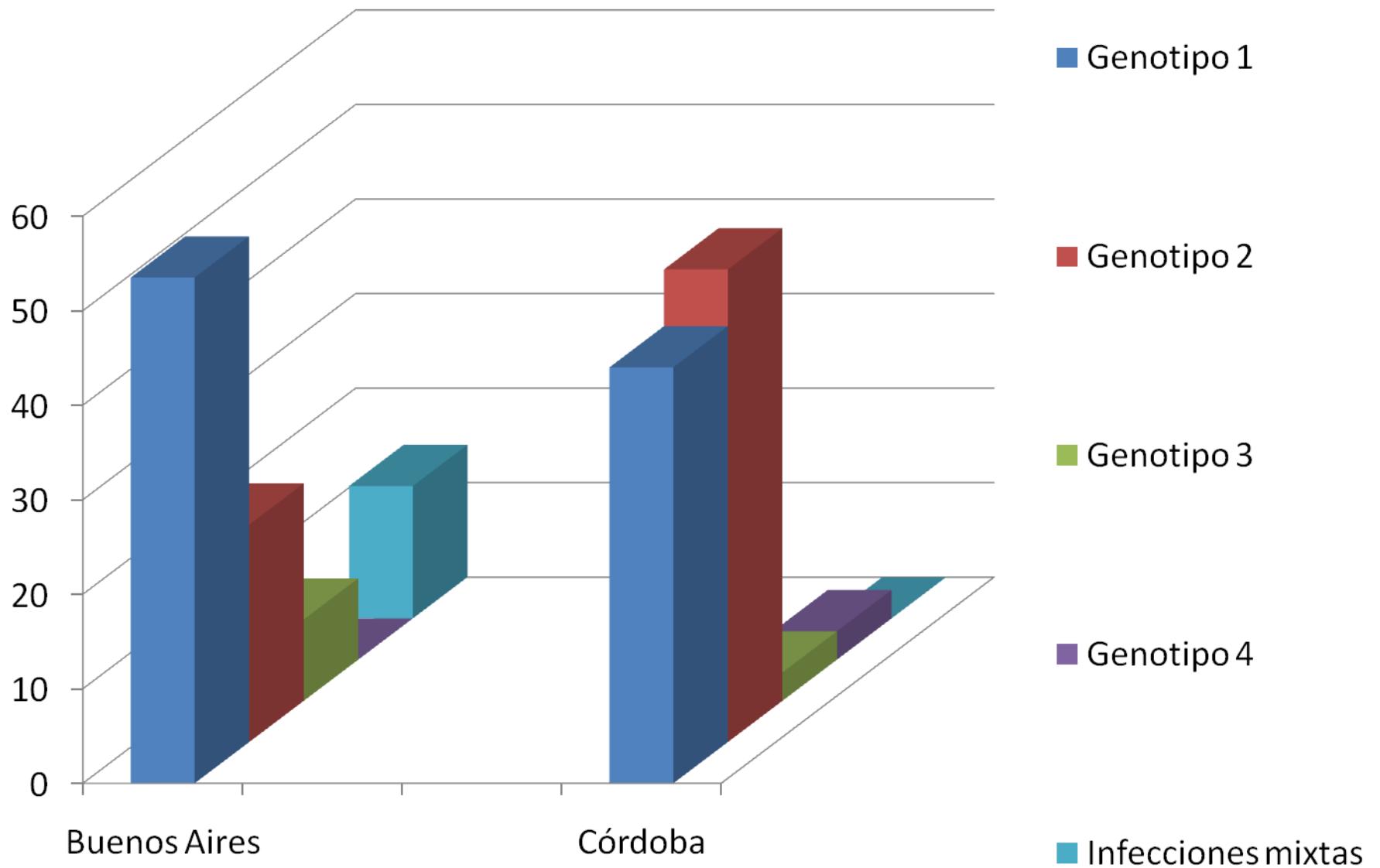
# Prevalencia genotípica de HCV en Buenos Aires, Argentina



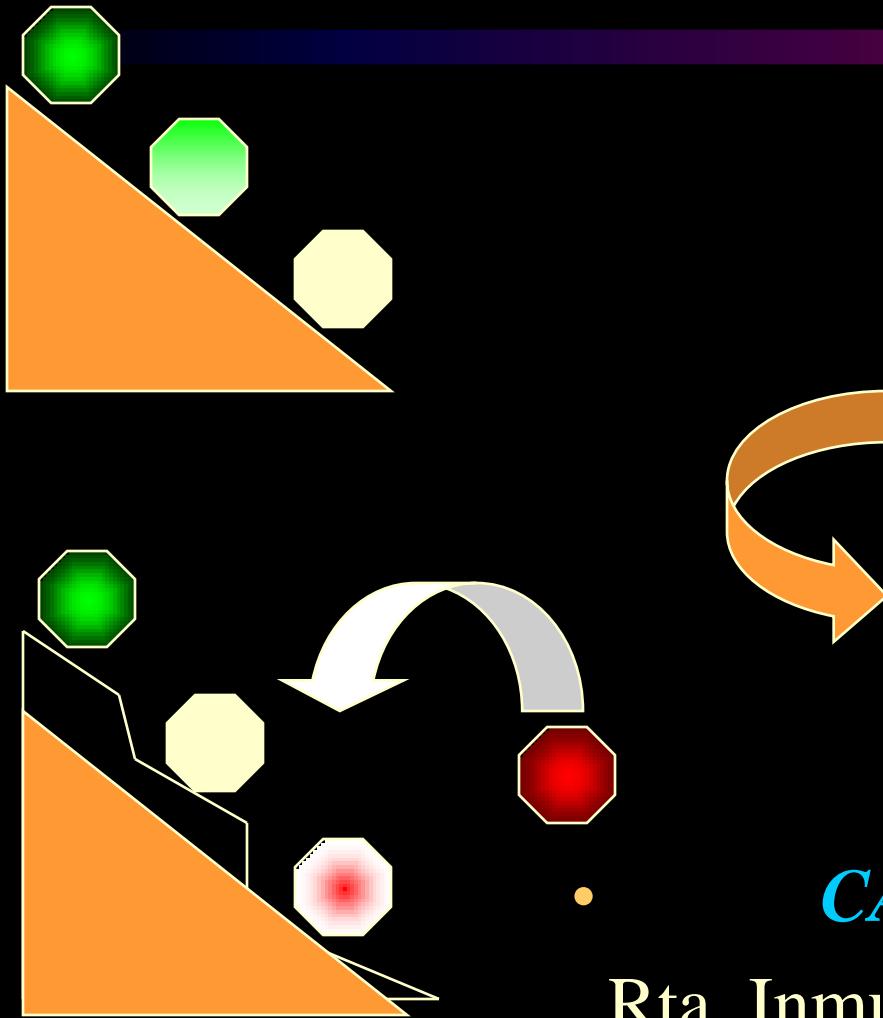
Oubiña y col, J Med Virol 1995; Quarleri y col, J Clin Microbiol 2000; Quarleri y col, J Clin Microbiol 2003).

Genotipos 4 y 5: excepcionalmente





# *Variabilidad del HCV*



- *Cambios menores:* y ARN polimerasa (VHC):  $1\text{ c}/10^3 - 10^4$  nt/sitio/año (genómico)

Presión de selección  
de la Rta. Inmune (Ag)

**CUASIESPECIES**

**CAMBIOS MAYORES**

Rta. Inmune

Recombinación

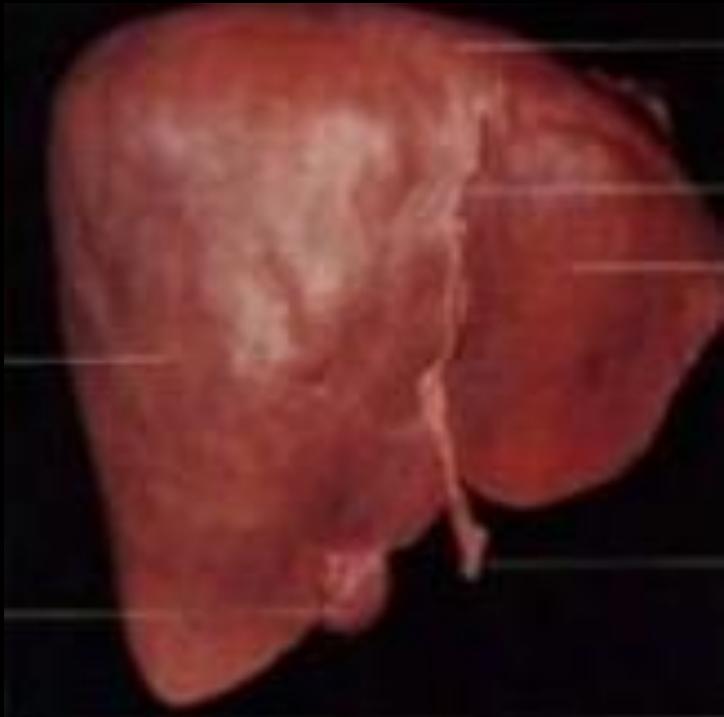
# *Variabilidad y diversidad*



Mathet et al. 2007

# Hepatitis C

- ✓ Estructura y función
- ✓ Replicación viral y sus implicancias en la epidemiología molecular, la patogénesis, el diagnóstico, la profilaxis y el tratamiento
- Inmunopatogénesis molecular de la hepatitis C a nivel hepático y su relación con el diagnóstico
- Inmunopatogénesis molecular de las manifestaciones extra-hepáticas



Hígado normal



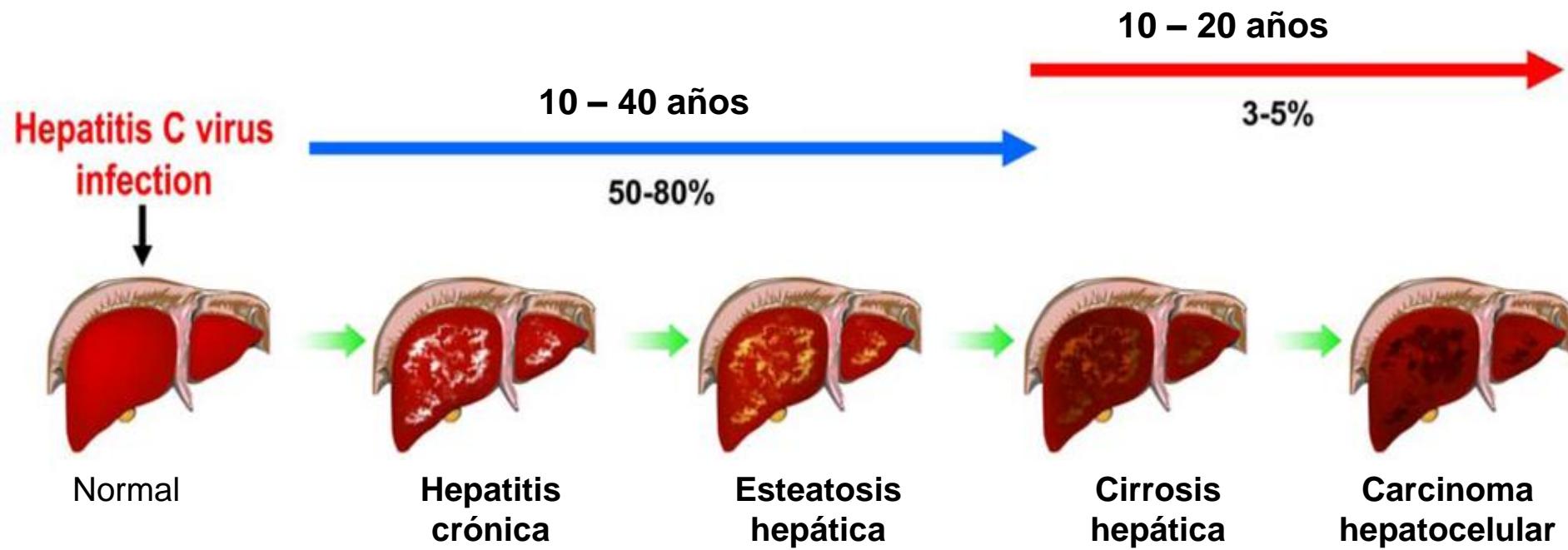
50 nm

# Infección por HCV

*¿Por qué puede evolucionar  
a la cronicidad?*



# Historia natural de la infección por HCV



¿Por qué?



# Patogénesis de la infección por HCV

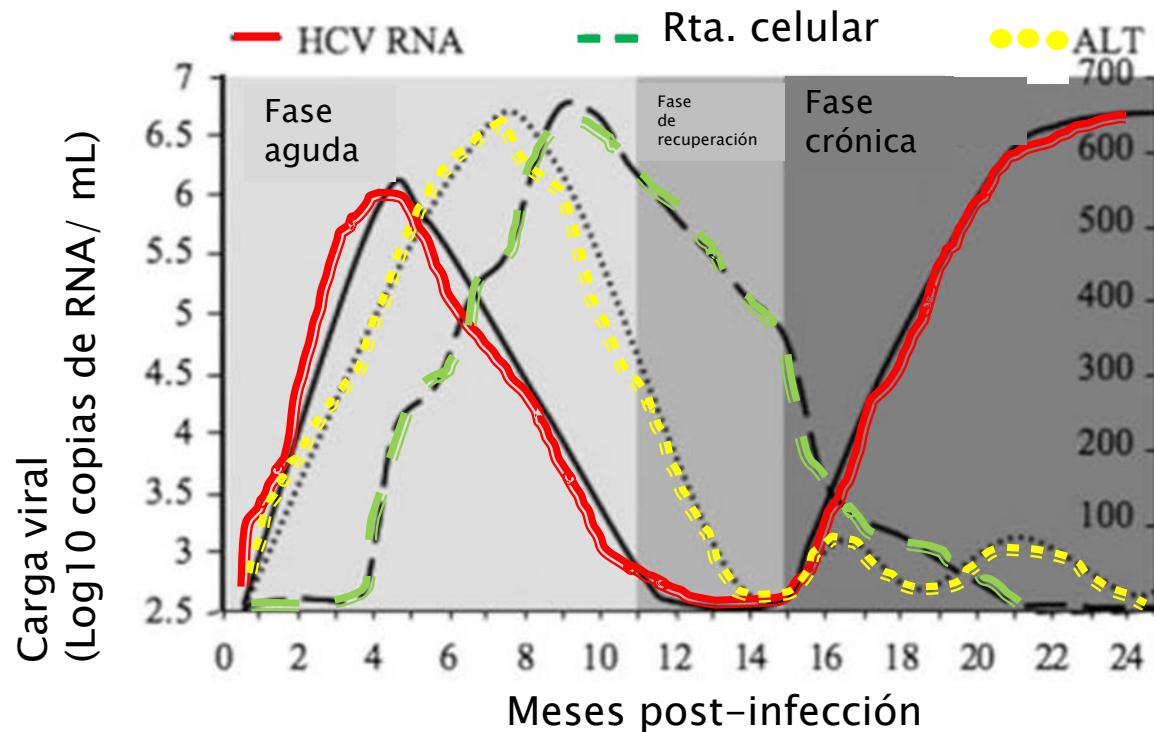
## Hepática:

- ✓ Hepatitis aguda
- ✓ Hepatitis crónica
- ✓ Esteatosis
- ✓ Insulino-resistencia
- ✓ Diabetes *mellitus* tipo II
- ✓ Cirrosis
- ✓ Hepatocarcinoma celular (HCC)

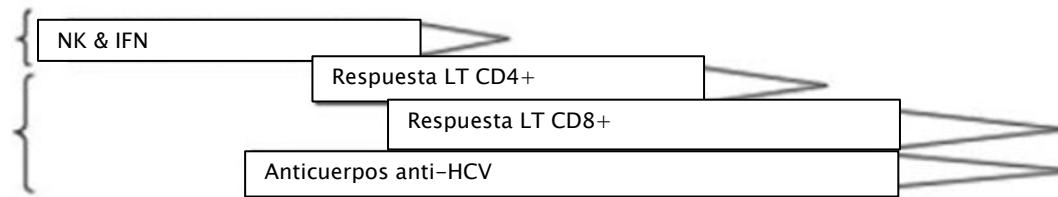
## Extra-hepática

- Crioglobulinemia mixta
- Vasculitis
- Poliarteritis nodosa
- Glomerulonefritis
- Artritis
- Linfomas
- Compromiso del SNC: depresión, ansiedad, fatiga crónica
- Líquen plano
- Otras dermopatías





Inmunidad innata  
Inmunidad adaptativa



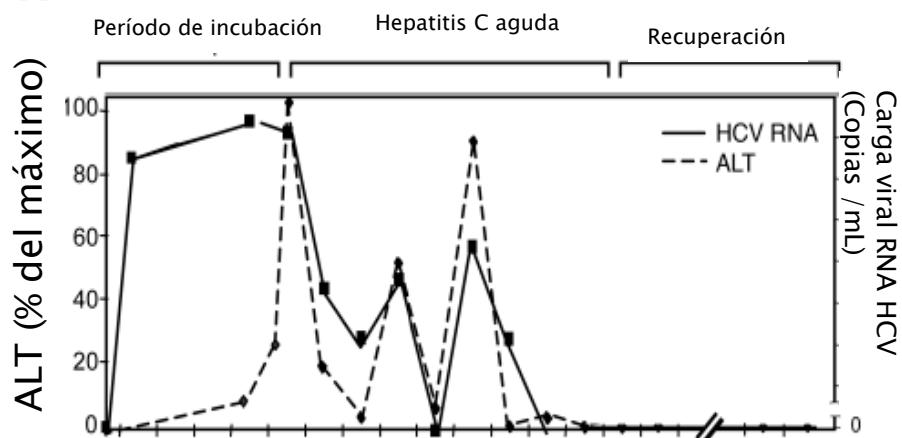
Supresión por proteínas virales  
Inducción de Treg  
Expresión de PD-1  
Mutaciones virales  
Exceso de Ag virales

Inmunidad

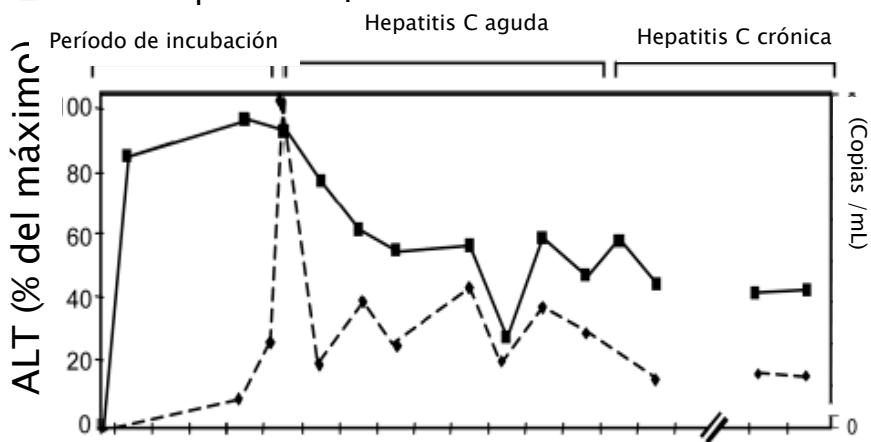
Tolerancia a  
Ag virales

**A**

## Hepatitis C aguda autolimitada

**B**

## Hepatitis C que evoluciona a la cronicidad

Acs. anti-HCV  
ELISA

--- +++++++ +++++++ + -

Neutralizantes

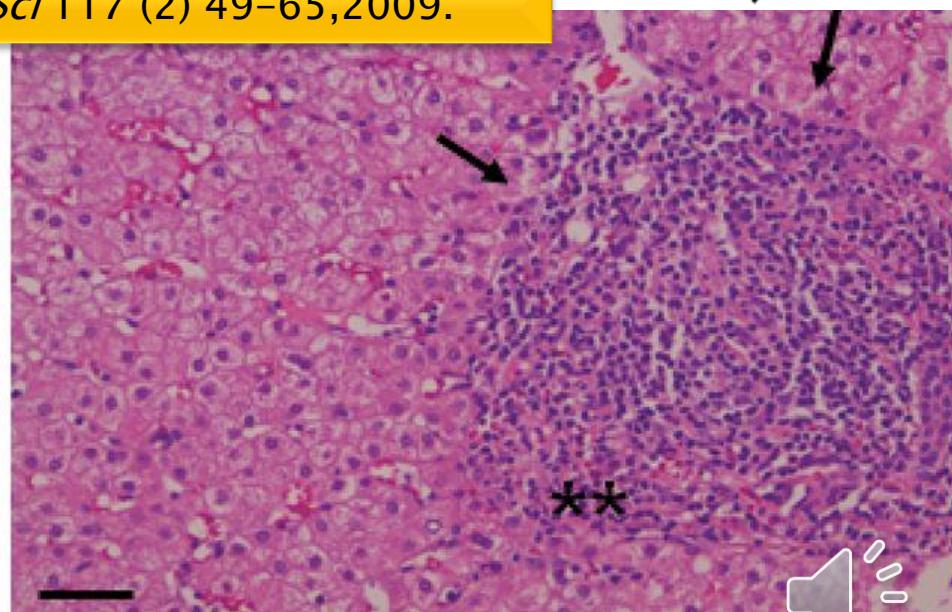
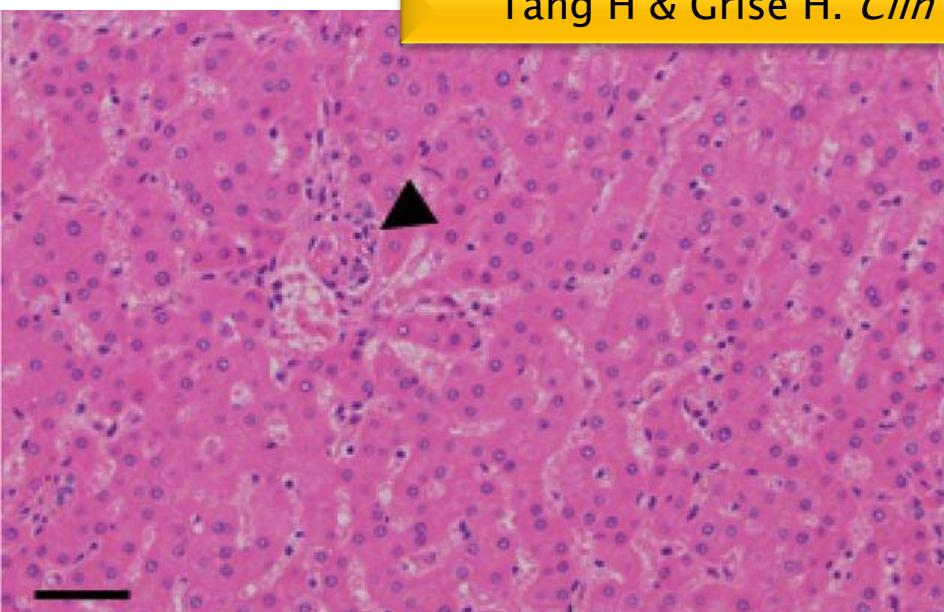
++? --- - -

Acs. anti-HCV  
ELISA

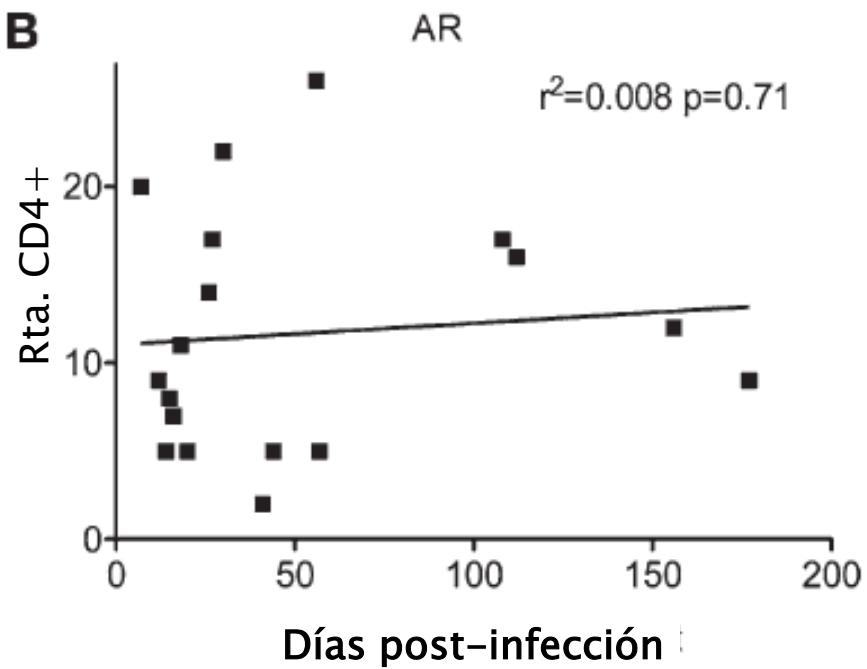
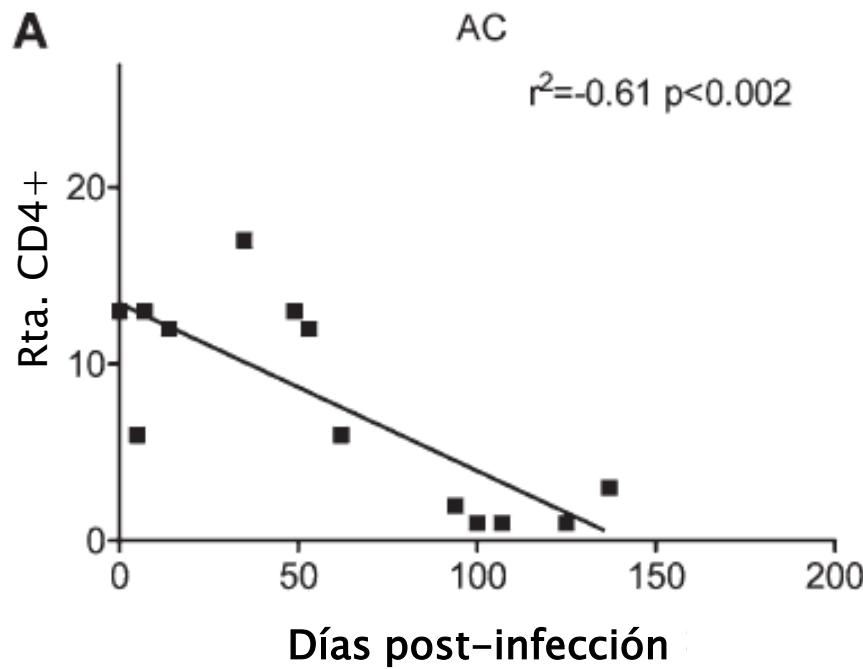
--- +++++++ +++++++ + +

Neutralizantes

-++ + +

Tang H & Grisé H. *Clin Sci* 117 (2) 49–65, 2009.

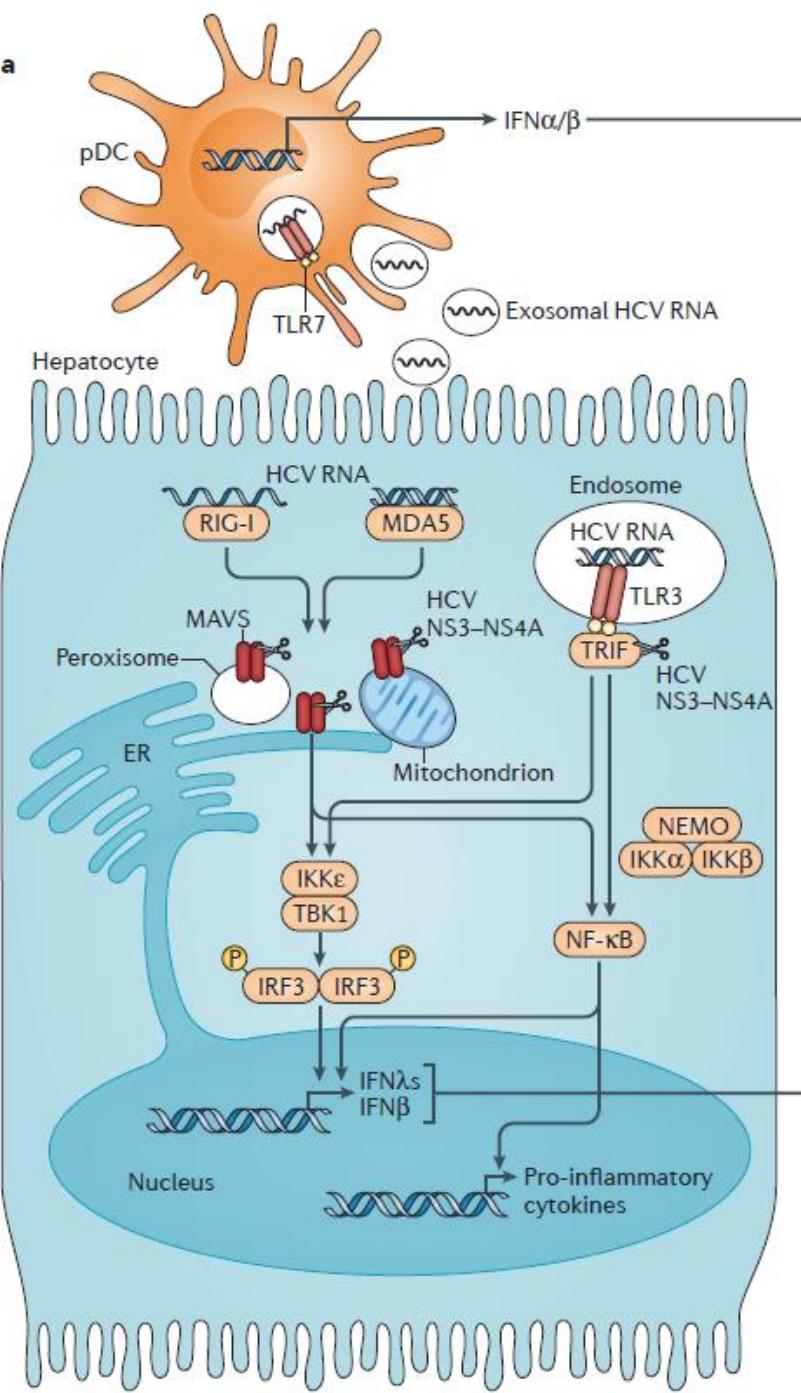
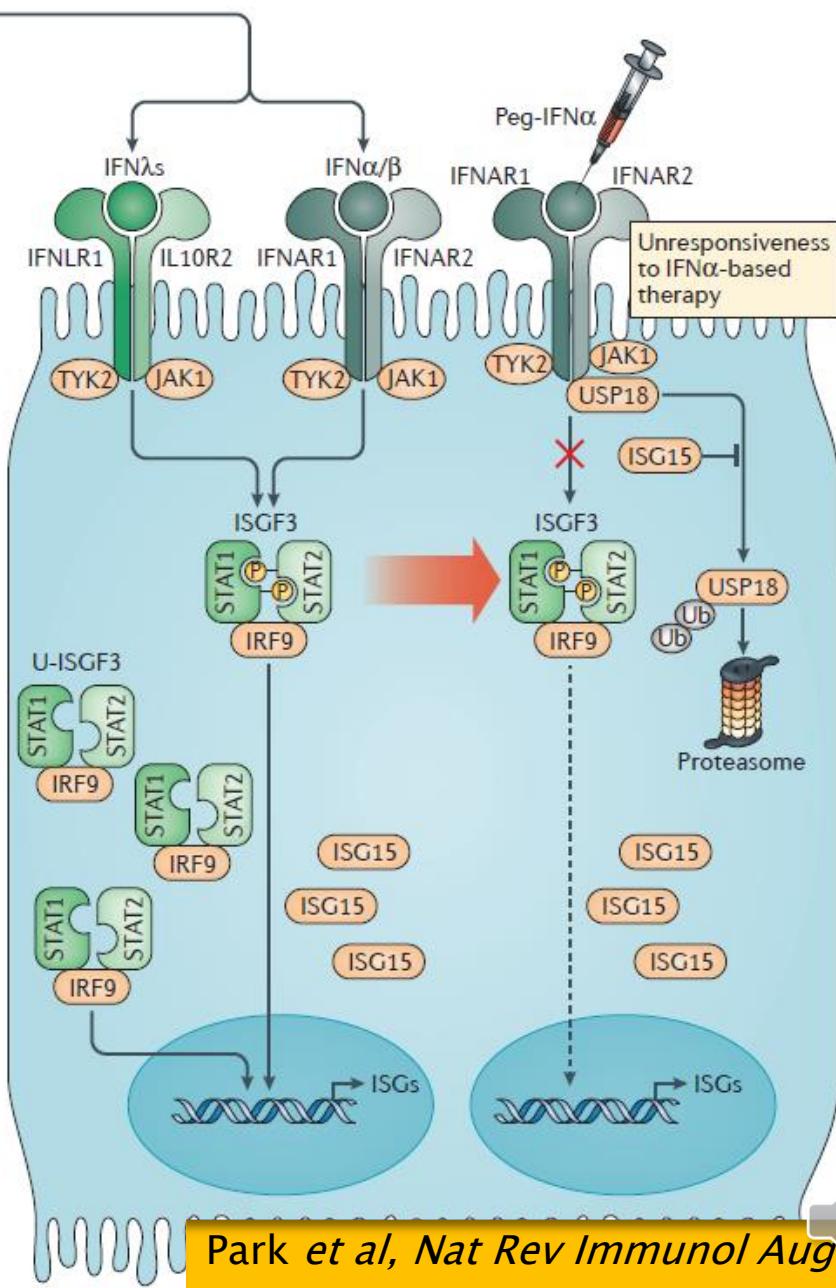
# La importancia de la respuesta de LT CD4+ en la infección por HCV



**AC:** infección aguda que evoluciona a la cronicidad

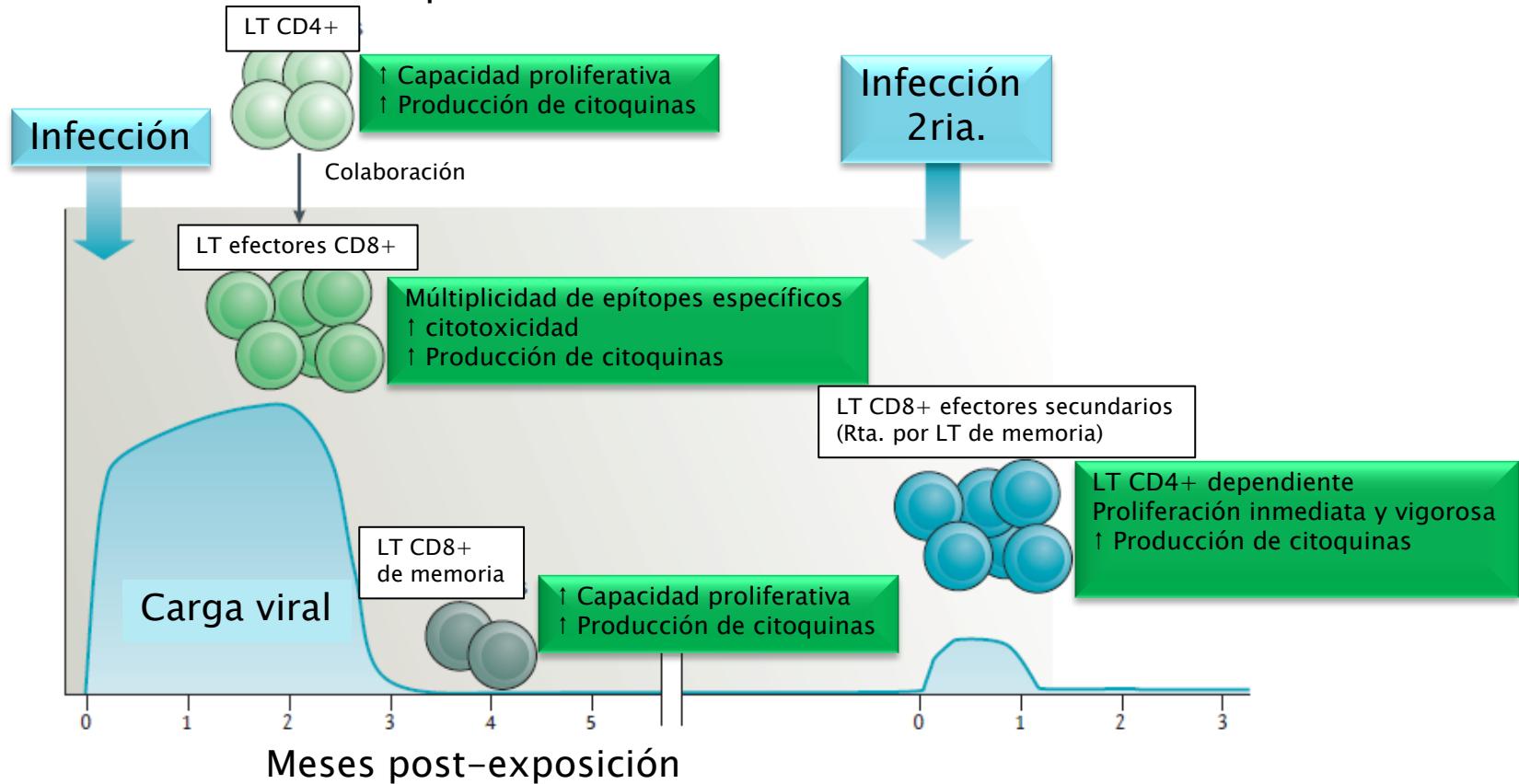
**AR:** infección aguda que se autolimita



**a****b****c**

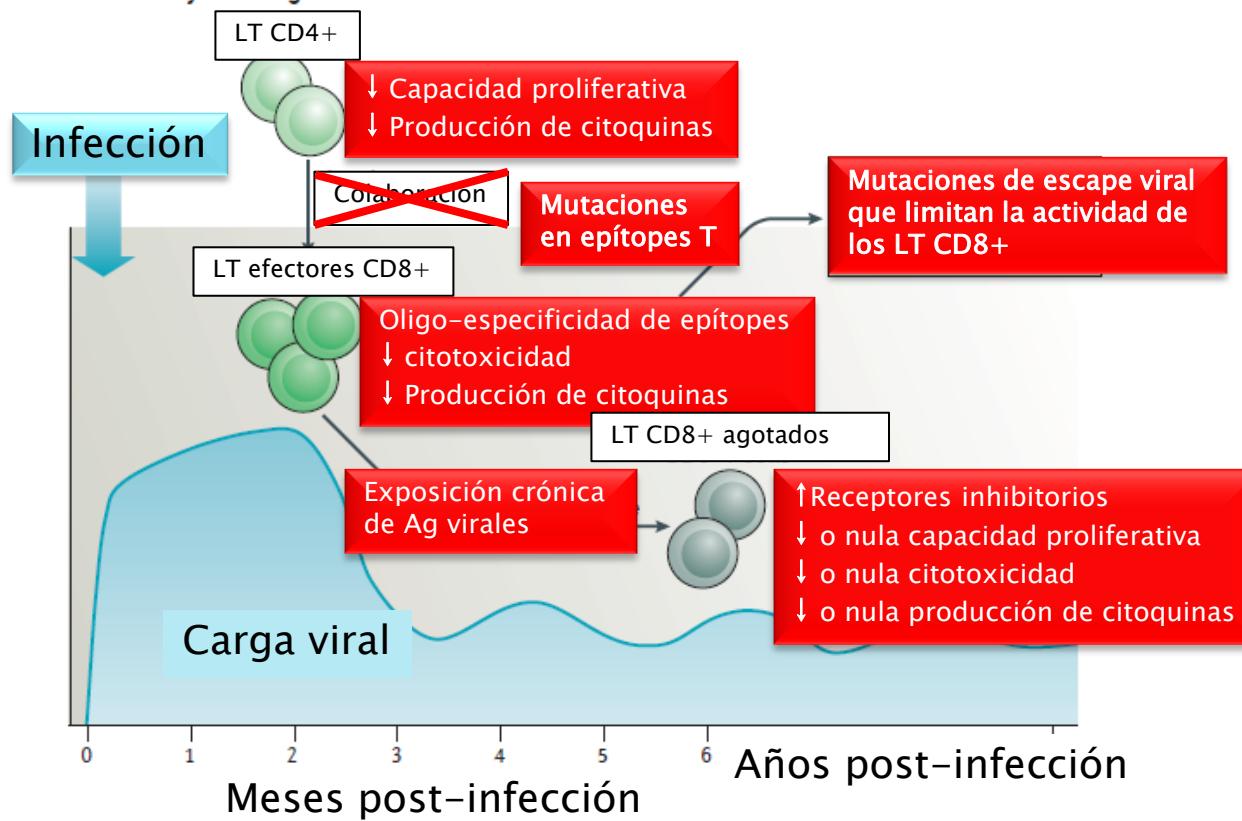
# Hepatitis C aguda autolimitada

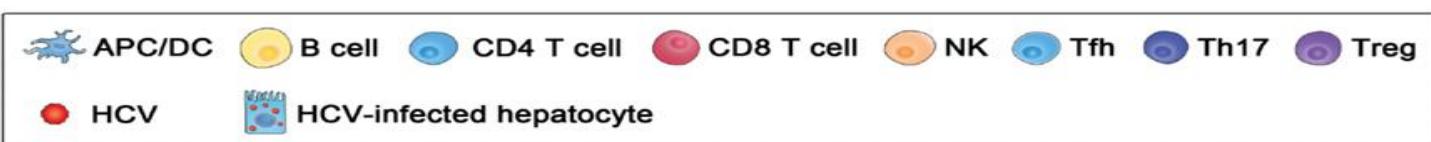
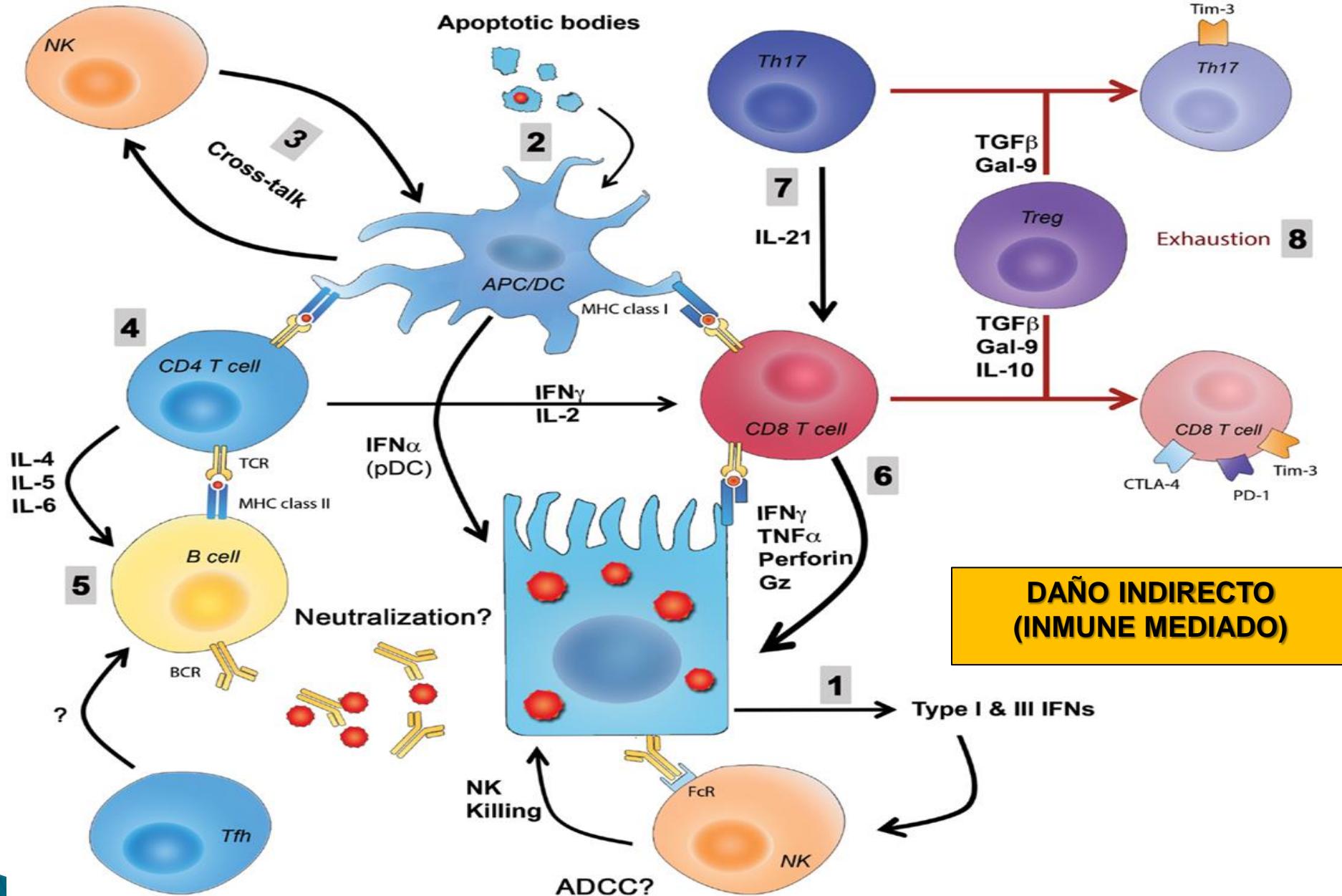
## Infección autolimitada por HCV



# Hepatitis C crónica

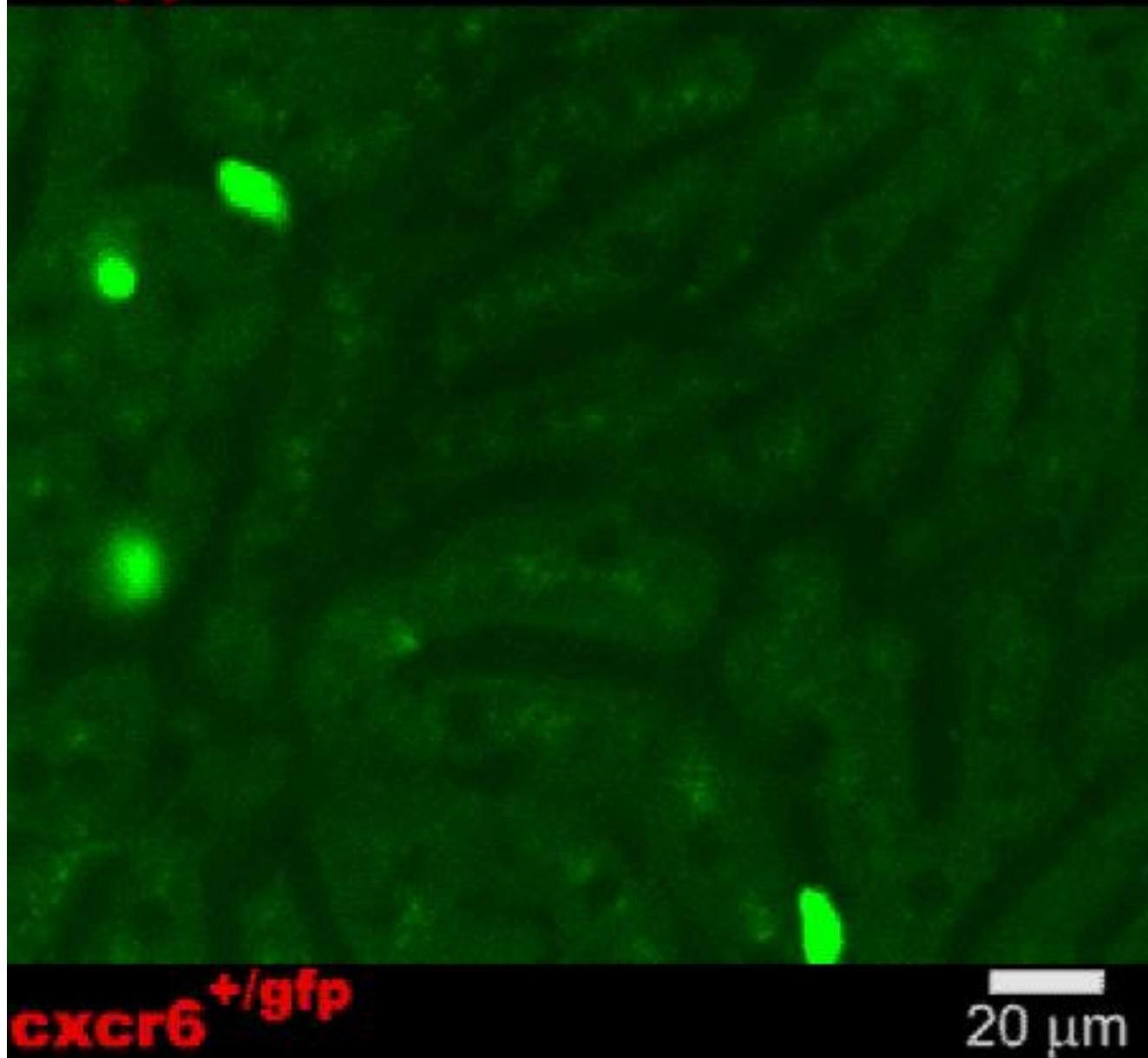
Infección por HCV que evoluciona a la cronicidad





# Supplemental Movie 1 0 min

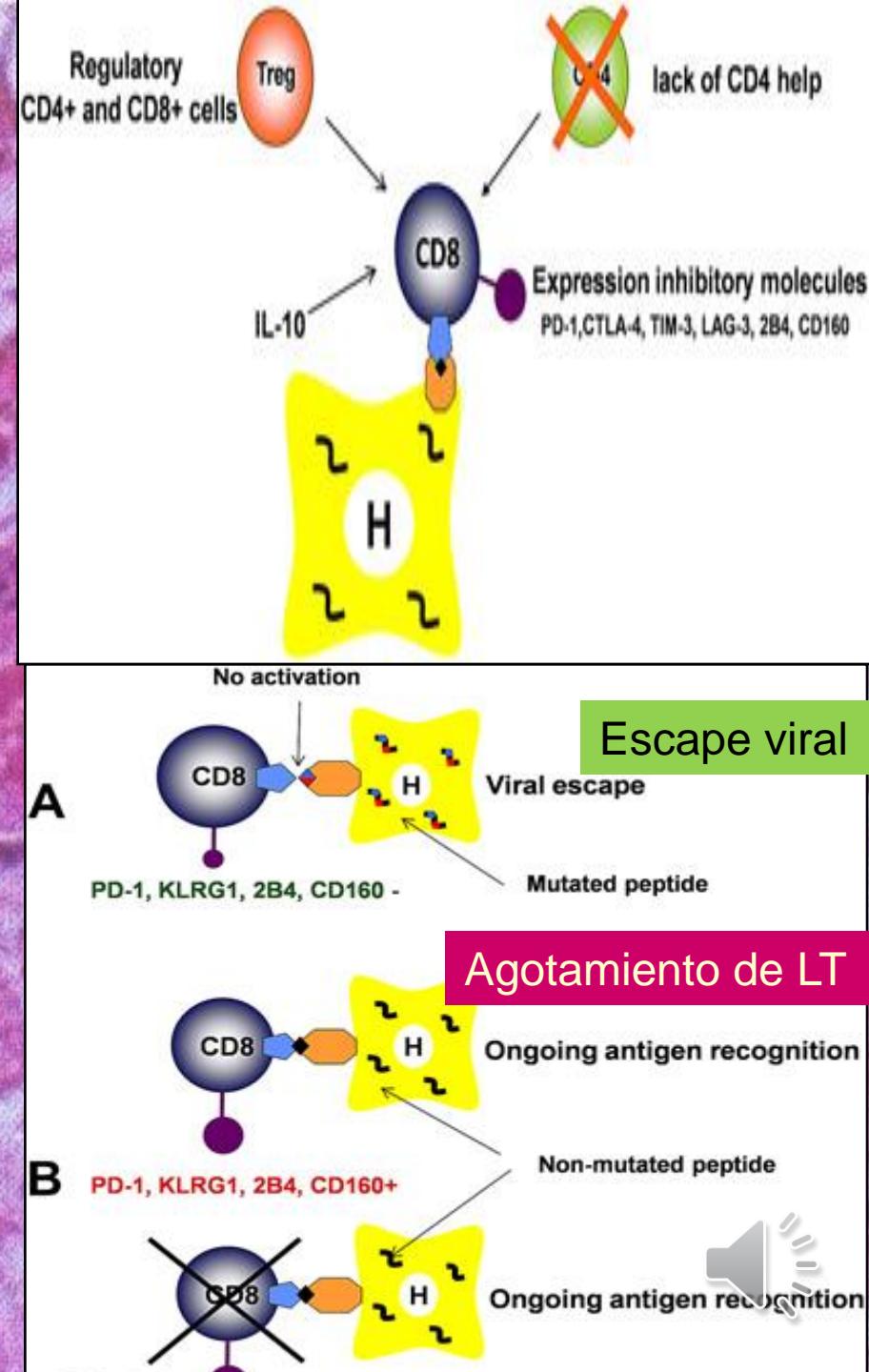
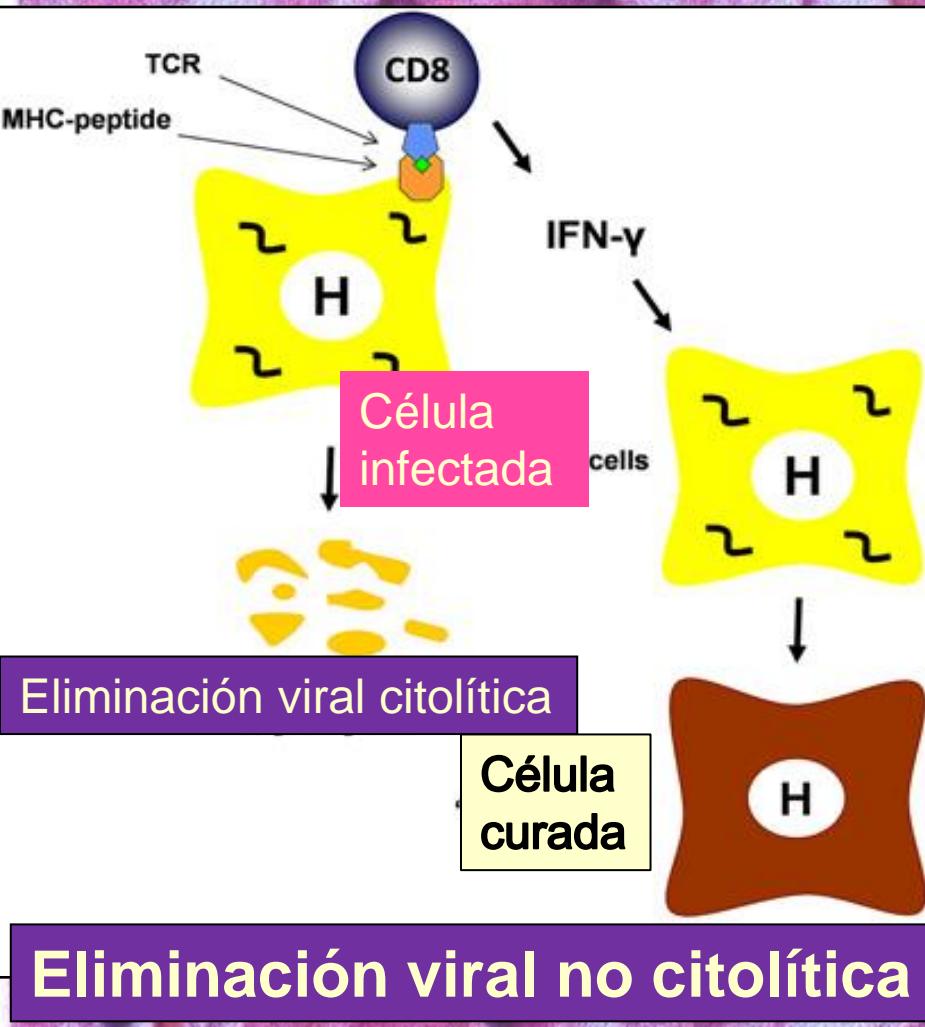
**Video:**  
Vigilancia  
de las  
células  
NKT

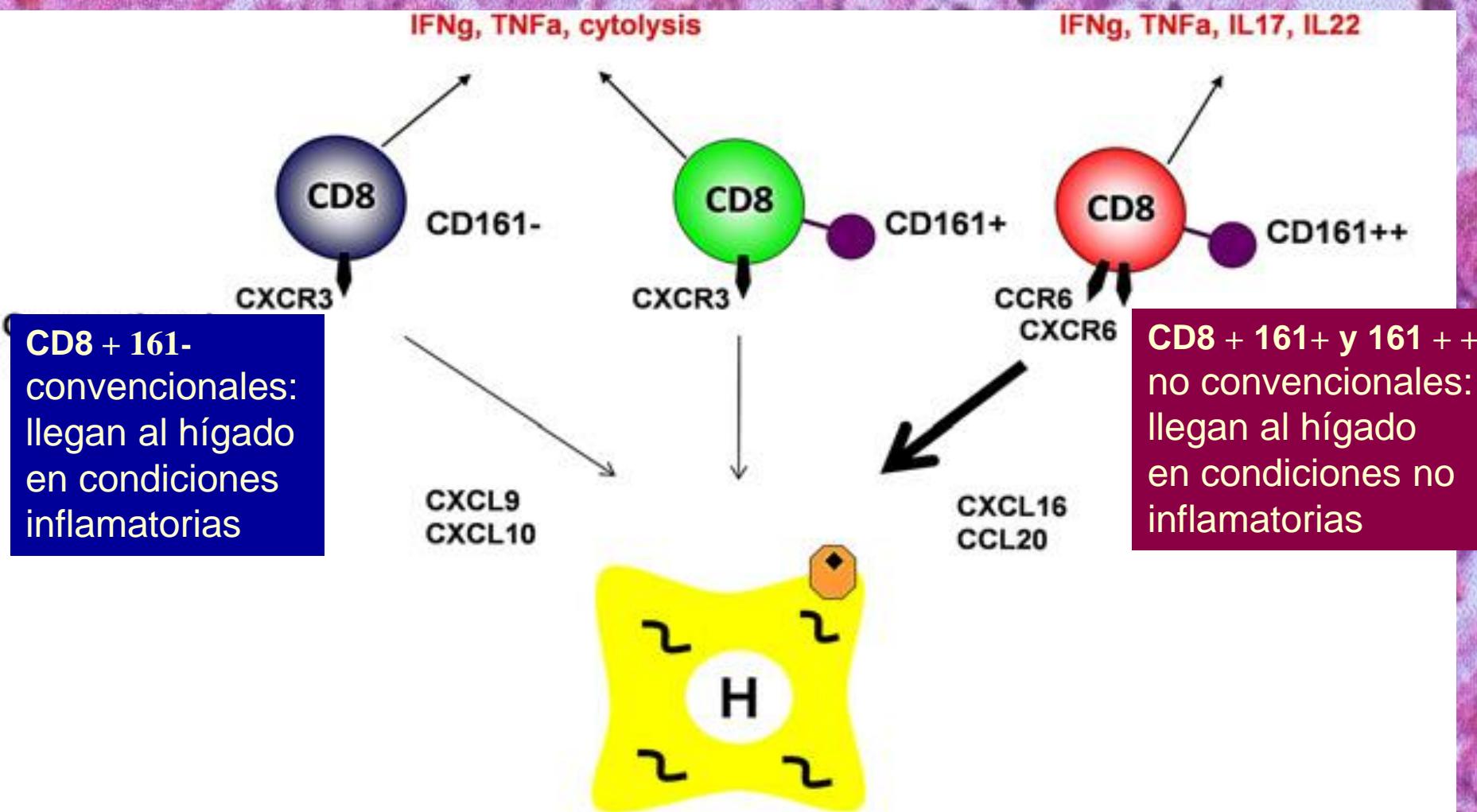


20  $\mu$ m

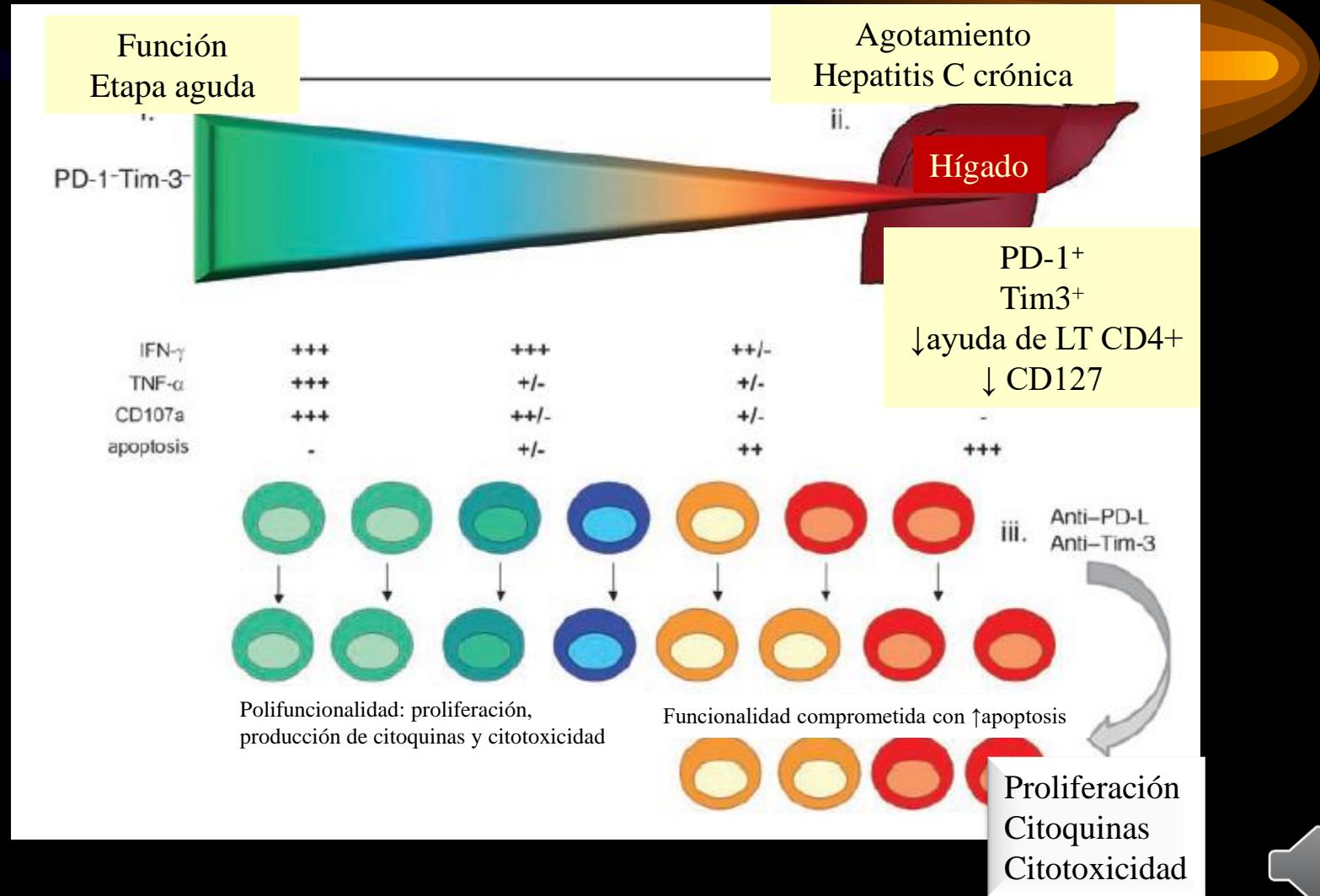


# Hepatitis C crónica





# Funcionalidad de los CTL con el devenir de la infección crónica por HCV



# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Hepatitis C Virus Infection of Cultured Human Hepatoma Cells Causes Apoptosis and Pyroptosis in Both Infected and Bystander Cells

Received: 22 July 2016

Accepted: 24 October 2016

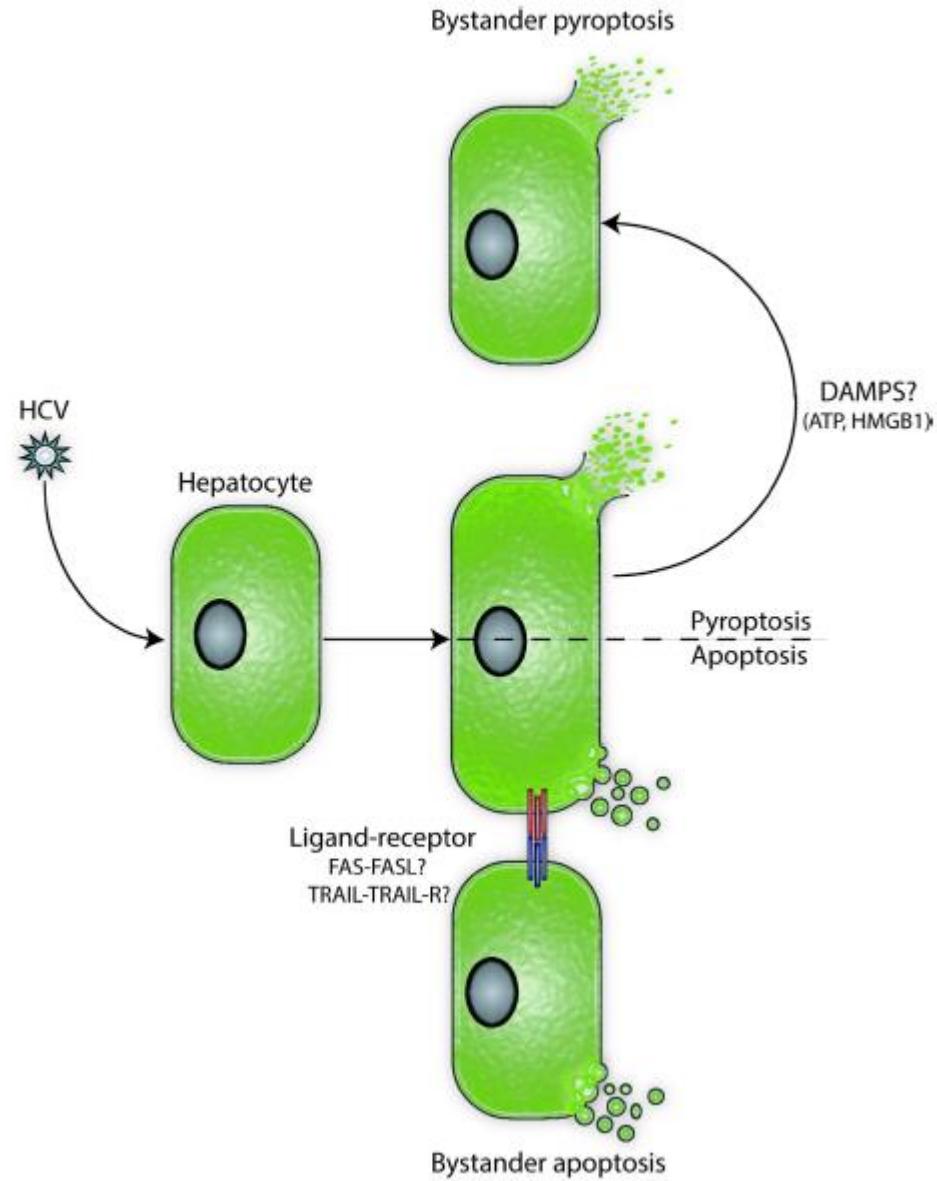
Published: 15 December 2016

H. M. Kofahi, N. G. A. Taylor, K. Hirasawa, M. D. Grant & R. S. Russell

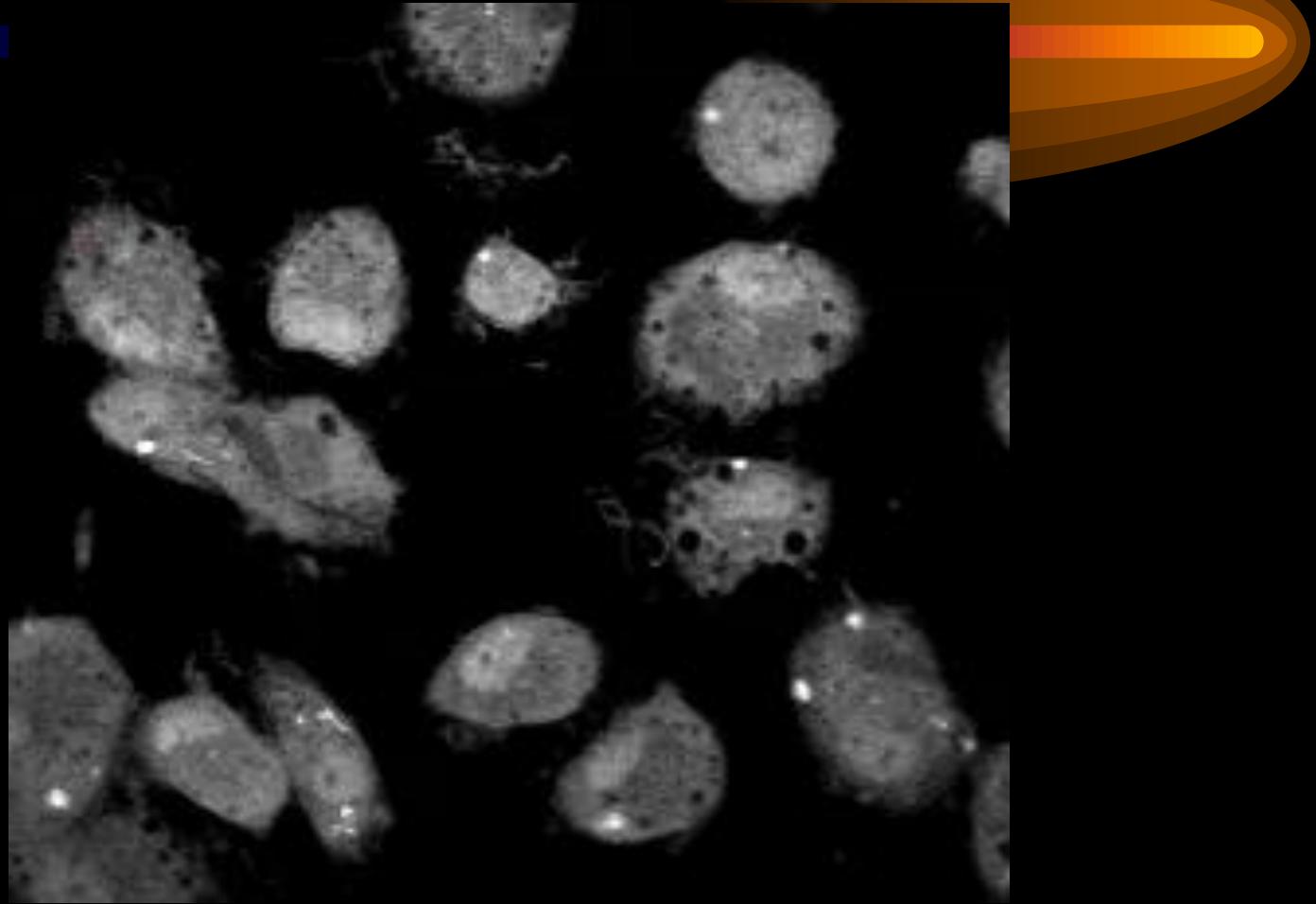
Individuals infected with hepatitis C virus (HCV) are at high risk of developing progressive liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). How HCV infection causes liver destruction has been of significant interest for many years, and apoptosis has been proposed as one operative mechanism. In this study, we employed a tissue culture-adapted strain of HCV (JFH1<sub>T</sub>) to test effects of HCV infection on induction of programmed cell death (PCD) in Huh-7.5 cells. We found that HCV infection reduced the proliferation rate and induced caspase-3-mediated apoptosis in the infected cell population. However, in addition to apoptosis, we also observed infected cells undergoing caspase-1-mediated pyroptosis, which was induced by NLRP3 inflammasome activation. By co-culturing HCV-infected Huh-7.5 cells with an HCV-non-permissive cell line, we also demonstrated induction of both apoptosis and pyroptosis in uninfected cells. Bystander apoptosis, but not bystander pyroptosis, required cell-cell contact between infected and bystander cells. In summary, these findings provide new information on mechanisms of cell death in response to HCV infection. The observation that both apoptosis and pyroptosis can be induced in bystander cells extends our understanding of HCV-induced pathogenesis in the liver.



# Hepatitis C crónica



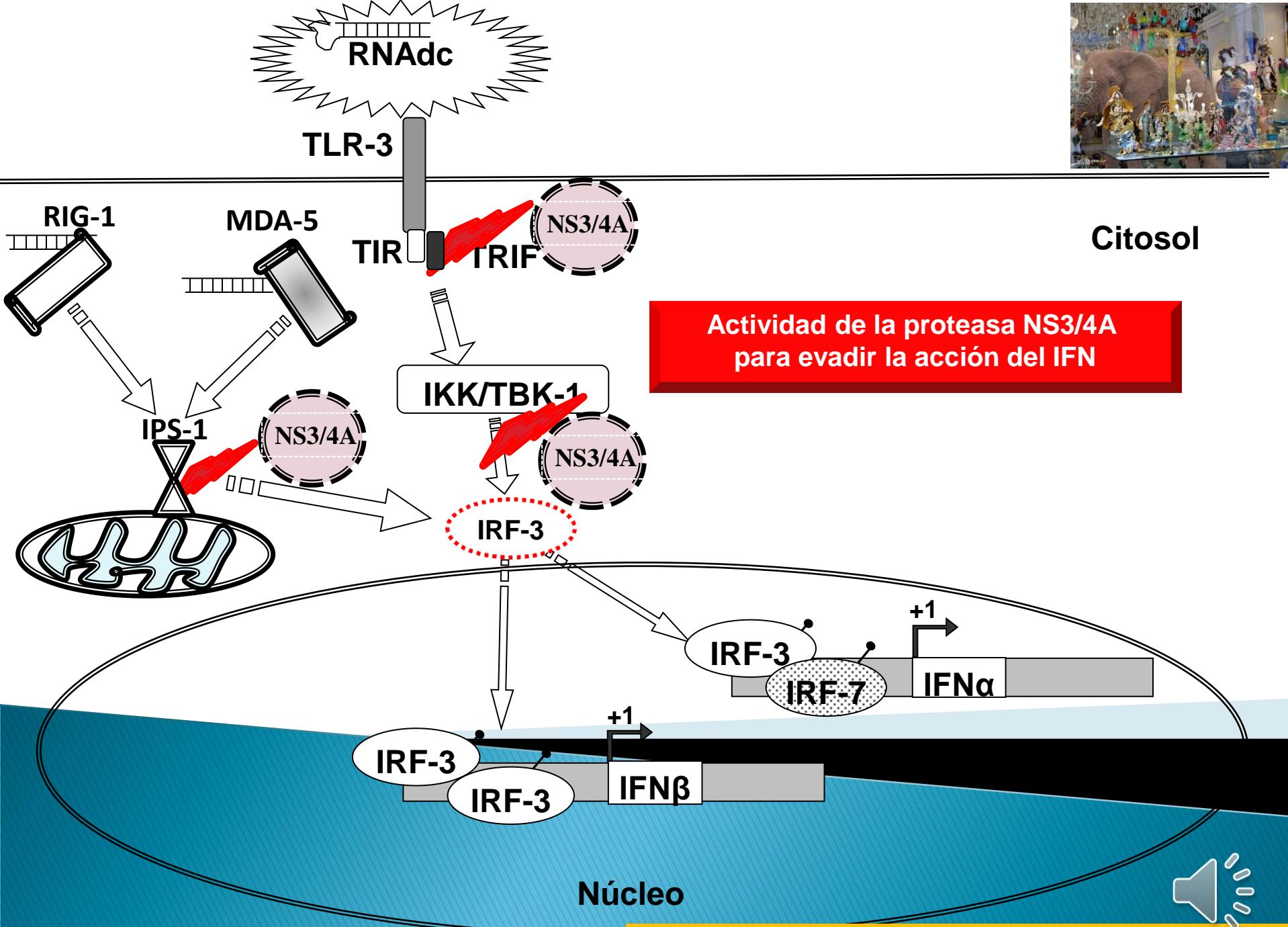
# *Piroptosis in vivo*



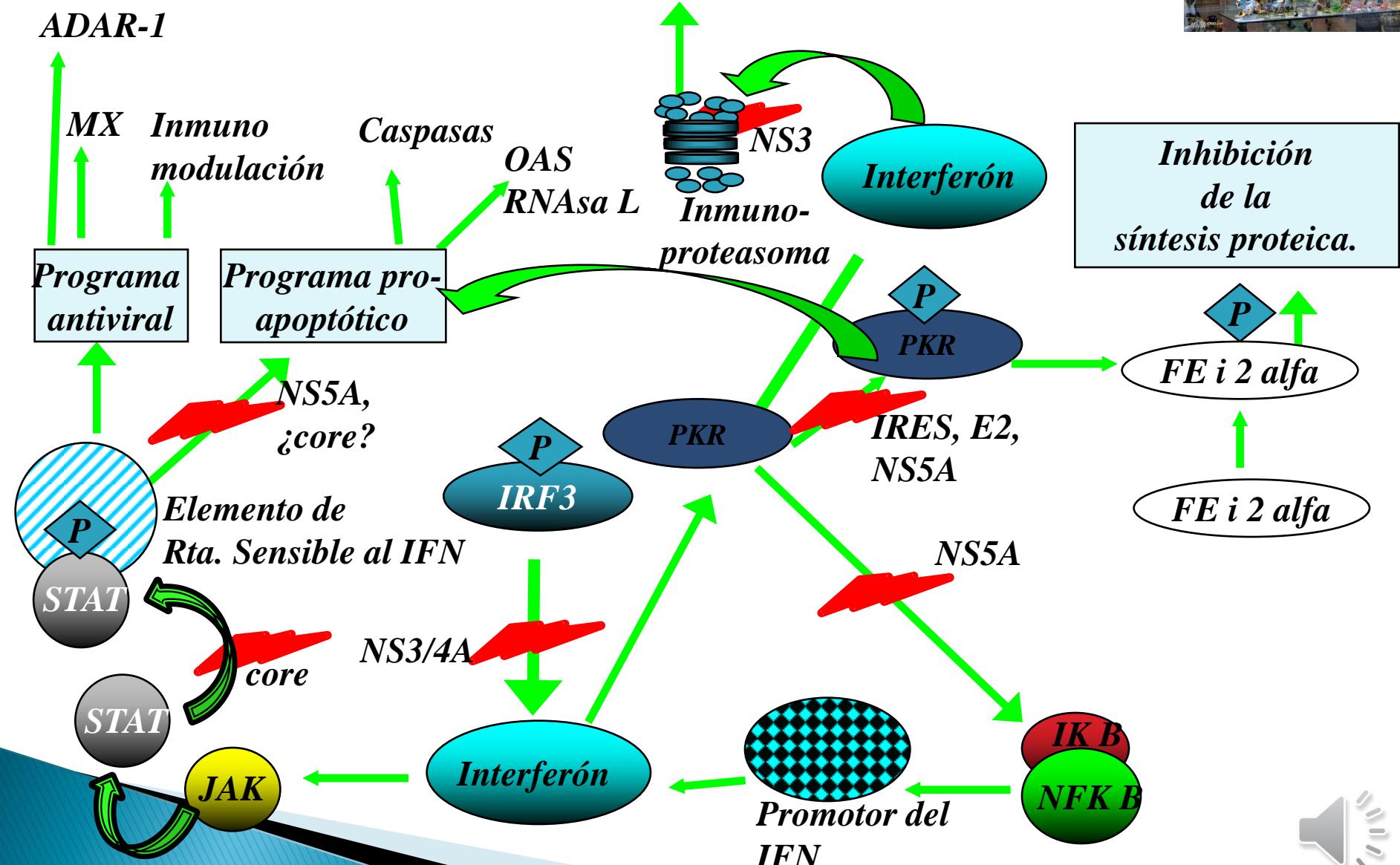
# Patogénesis de la Hepatitis C crónica: síntesis

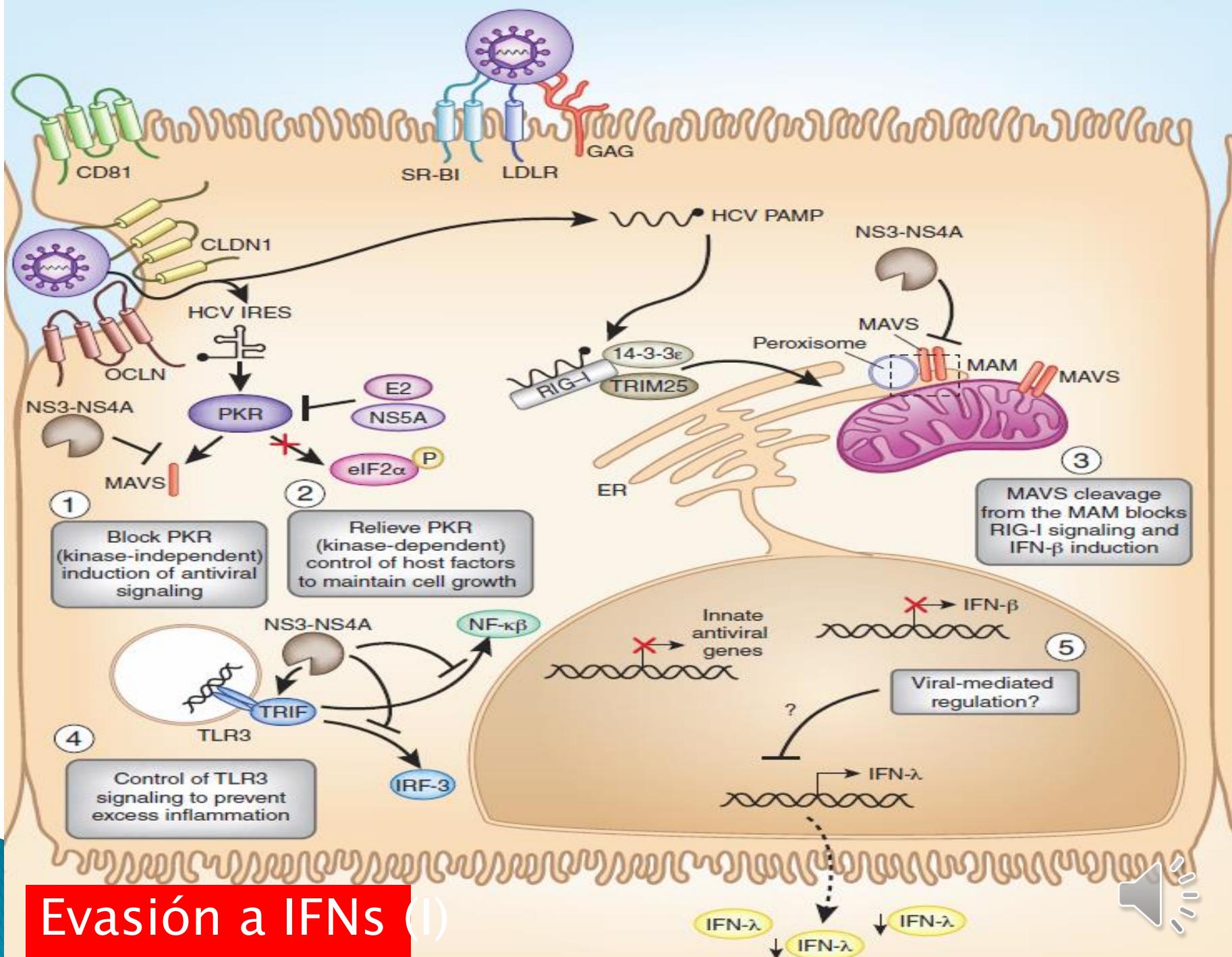
- LT CD8<sup>+</sup> (pocos son específicos)
- LT CD8<sup>+</sup> (testigos; dañinos)
- Anergia funcional y agotamiento de LT CD8<sup>+</sup>
- **IL-10** (Cél. de Kupffer, CD y LT CD4<sup>+</sup> (<sup>Th1 y Th2</sup>) , CD8<sup>+</sup>, Tr1, )
- **Tregs** (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> ) (también en HBV)  
vía: contacto
- **PD-1 / PDL-1**



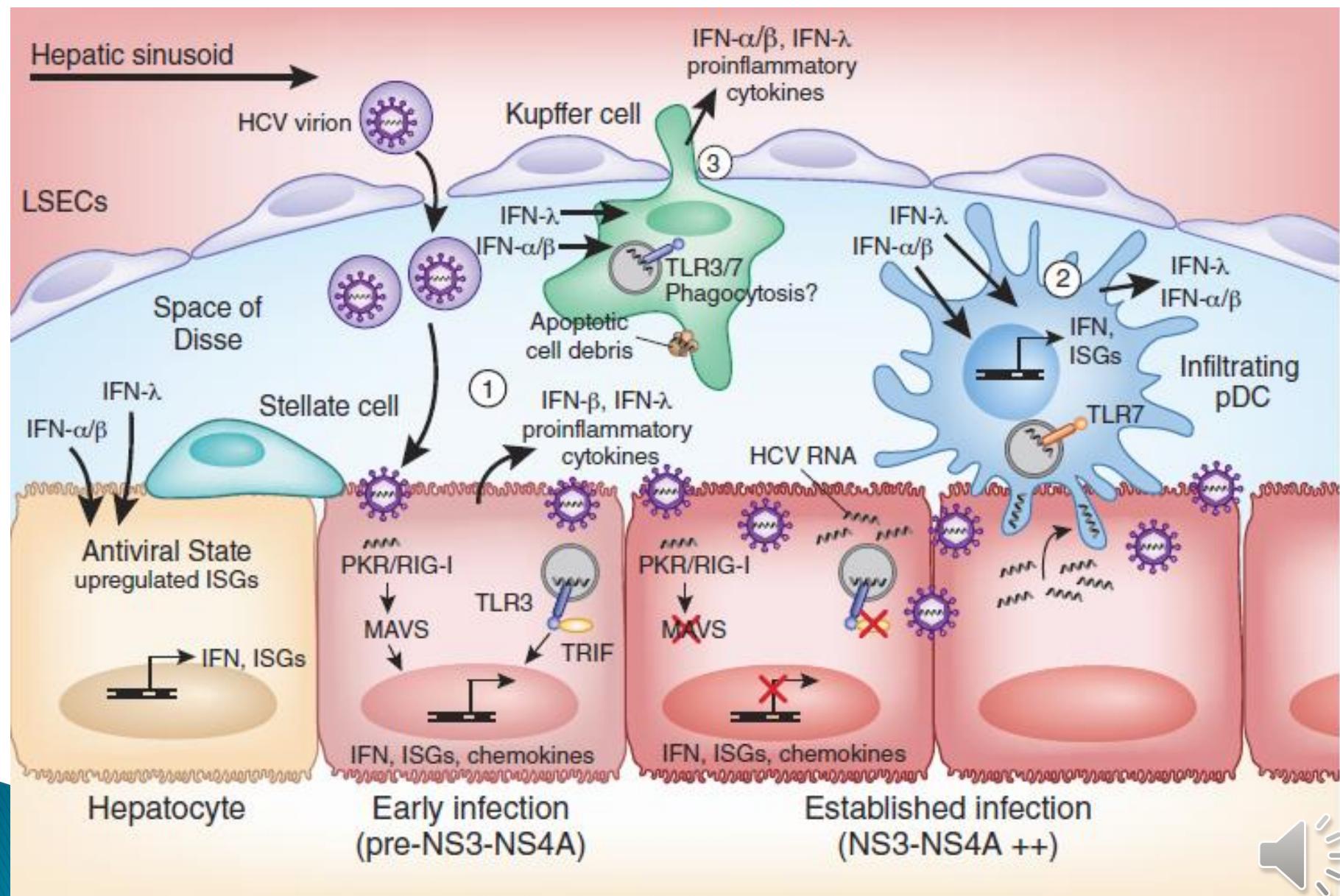


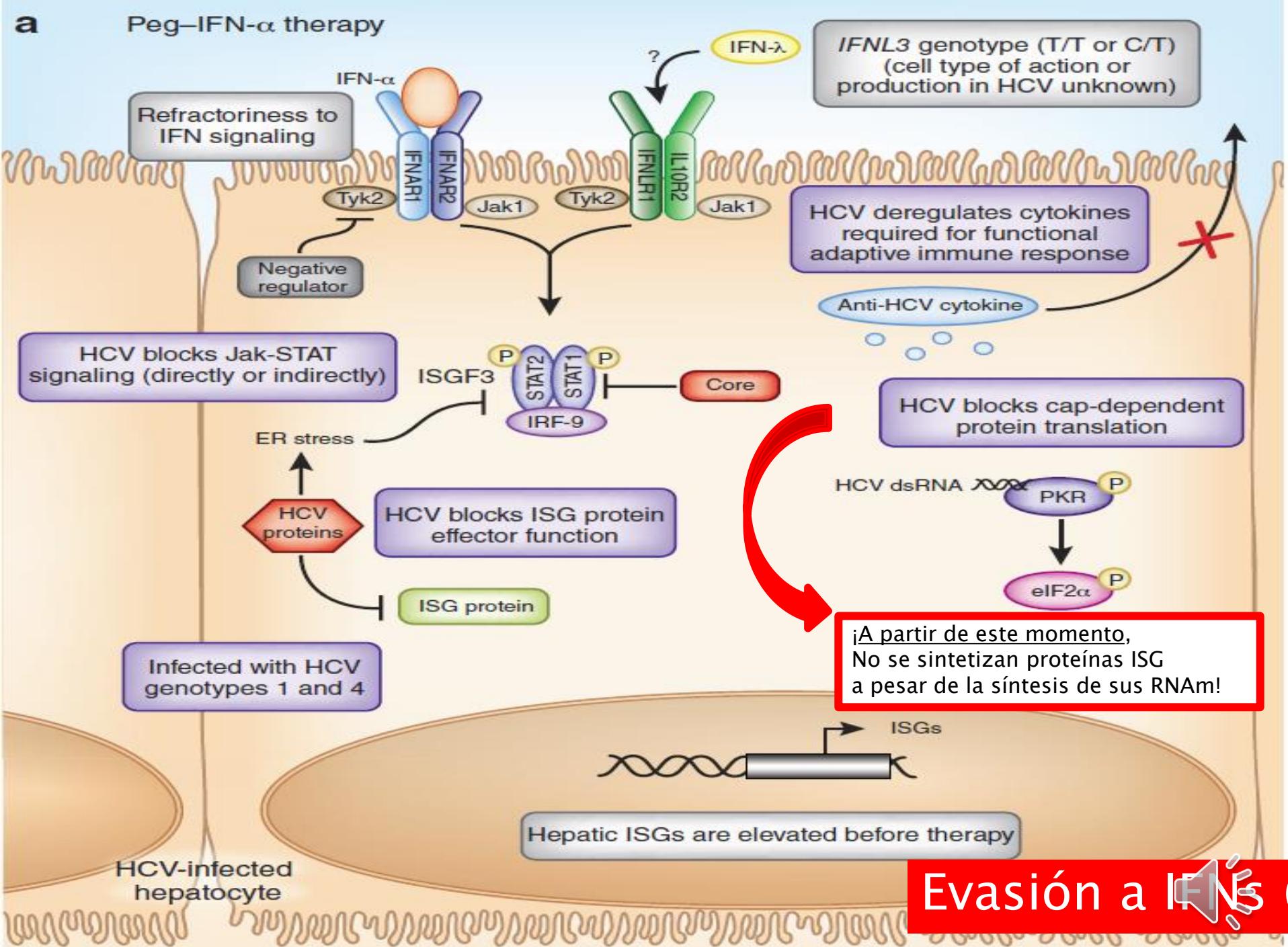
## Presentación peptídica por MHC-I



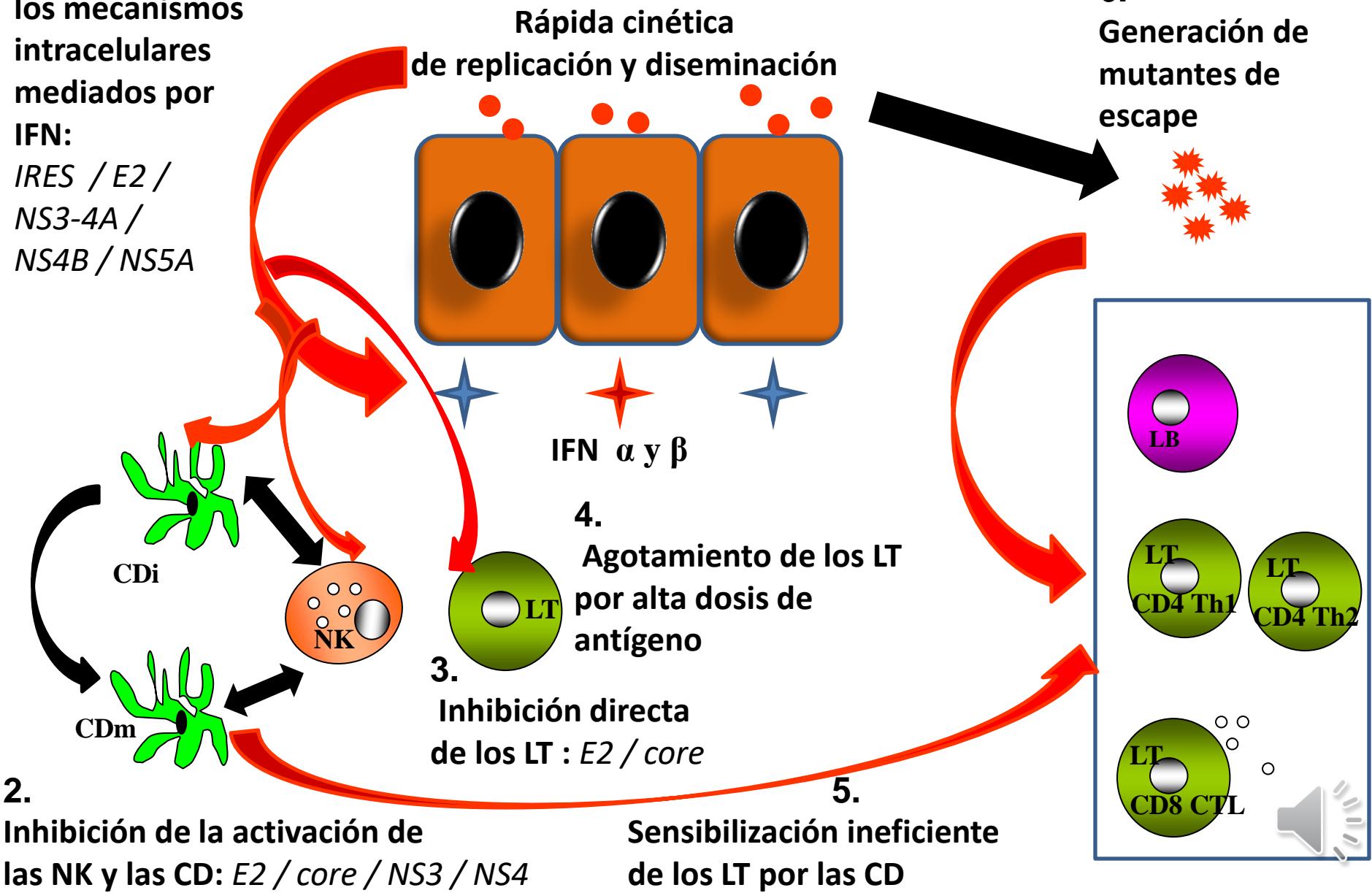


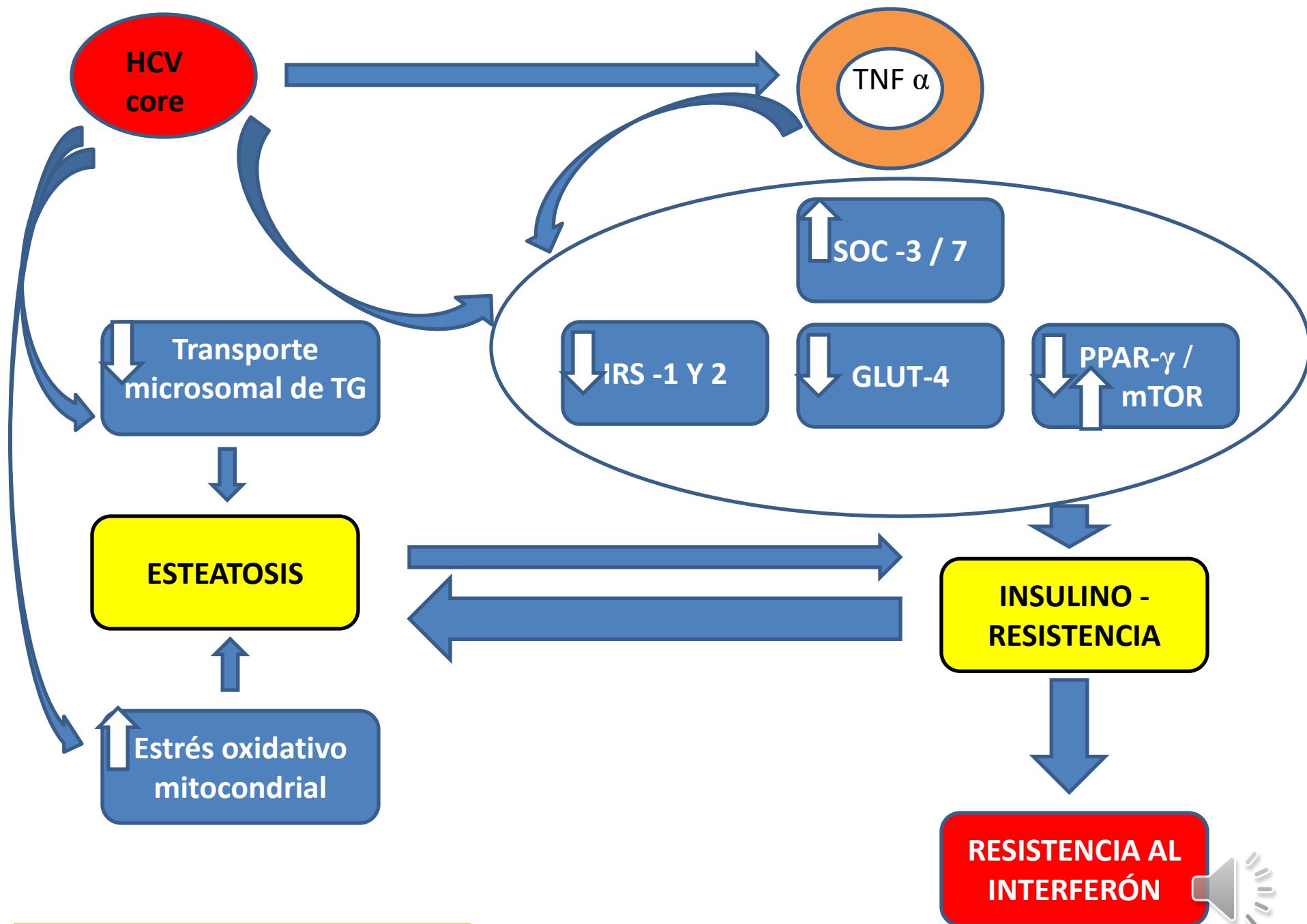
# Evasión a IFNs (

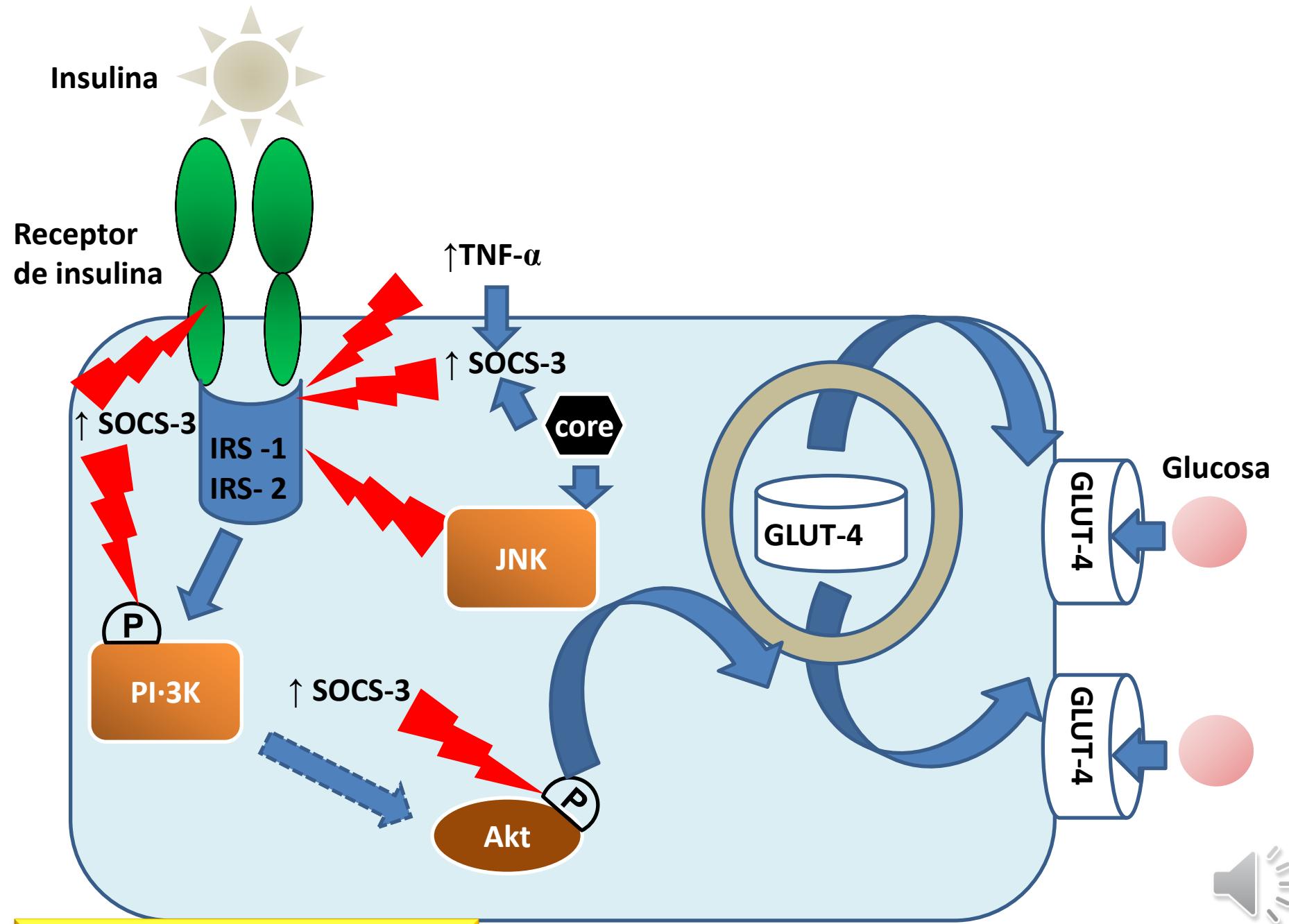




1.  
Inhibición de los mecanismos intracelulares mediados por IFN:  
*IRES / E2 / NS3-4A / NS4B / NS5A*







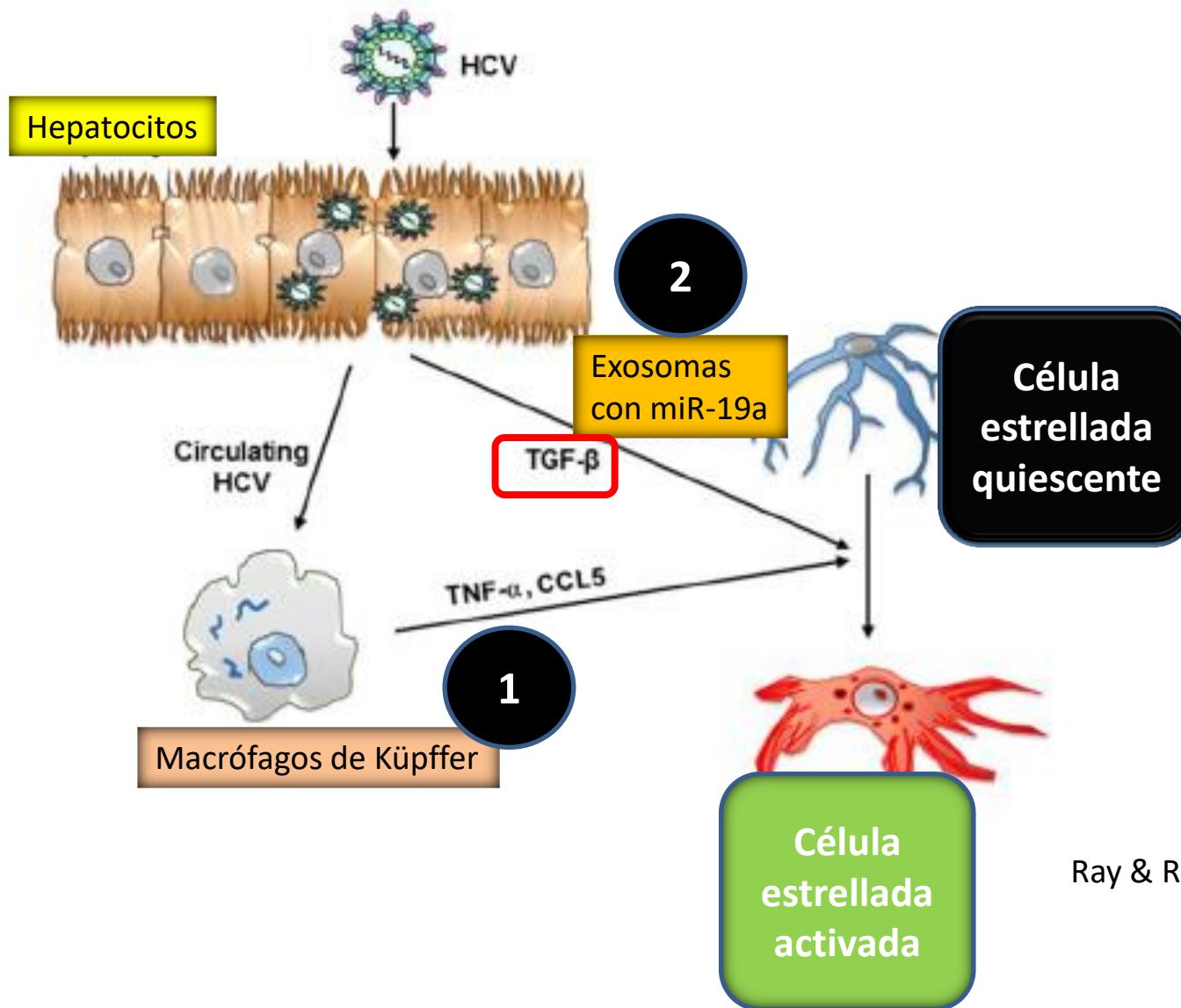
# Hepatitis C crónica

**El HCV puede promover la apoptosis  
¡o inhibirla...!**

**El delicado balance, dependerá de las proteínas  
expresadas en el contexto de la replicación viral  
y de la respuesta inmune del paciente...**



# Promoción de la fibrosis / cirrosis por HCV



Ray & Ray, Hepatology, 2018.





**70 – 90 % de los  
HCC se desarrollan  
en pacientes con  
cirrosis**



# Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus.

Hepatitis C virus (HCV) infection is the most common blood-borne infection in the United States, with estimates of 4 million HCV-infected individuals in the United States and 170 million worldwide. Most (70-80%) HCV infections persist and about 30% of individuals with persistent infection develop chronic liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Epidemiological, viral and host factors have been associated with the differences in HCV clearance or persistence, and studies have demonstrated that a strong host immune response against HCV favours viral clearance. Thus, variation in genes involved in the immune response may contribute to the ability to clear the virus. In a recent genome-wide association study, a single nucleotide polymorphism (rs12979860) 3 kilobases upstream of the IL28B gene, which encodes the type III interferon IFN-3, was shown to associate strongly with more than a twofold difference in response to HCV drug treatment. To determine the potential effect of rs12979860 variation on outcome to HCV infection in a natural history setting, we genotyped this variant in HCV cohorts comprised of individuals who spontaneously cleared the virus ( $n = 388$ ) or had persistent infection ( $n = 620$ ). We show that the C/C genotype strongly enhances resolution of HCV infection among individuals of both European and African ancestry. To our knowledge, this is the strongest and most significant genetic effect associated with natural clearance of HCV, and these results implicate a primary role for IL28B in resolution of HCV infection.





# La dulce regulación del Sistema Inmune: Galectinas, Interleuquinas, Células Dendríticas y Linfocitos T

### Galectina 1

Inhibe  
fenómenos  
inflamatorios

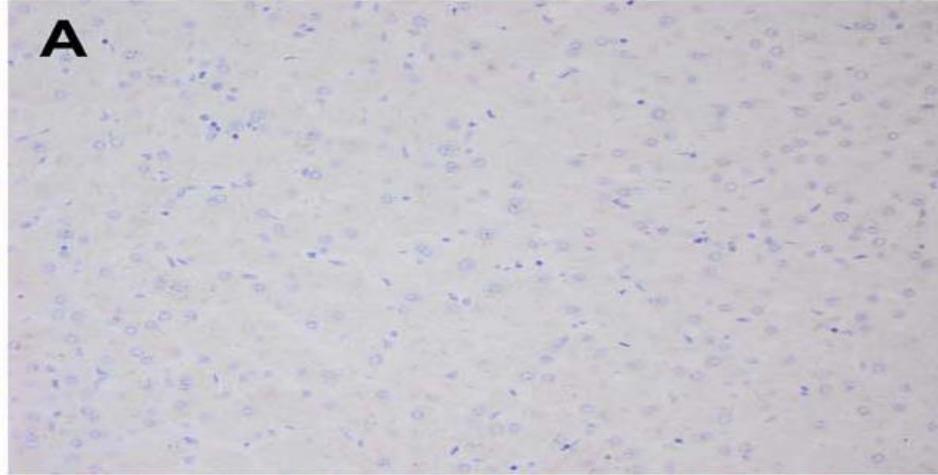
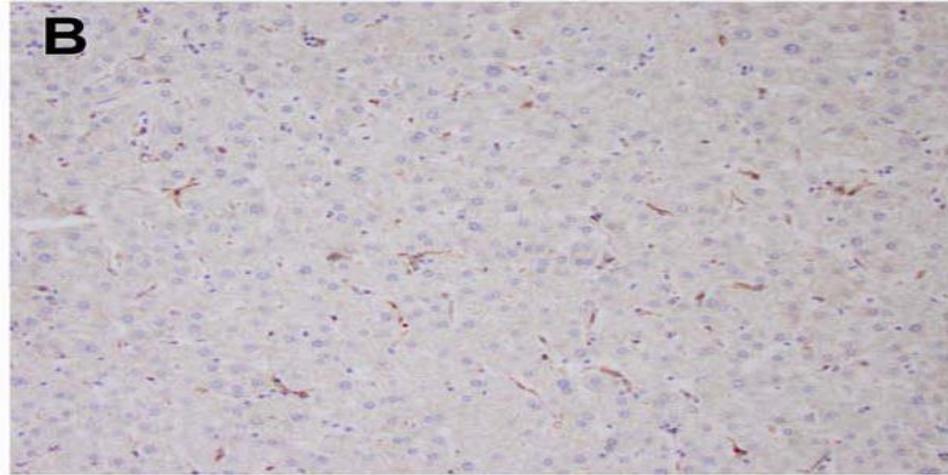
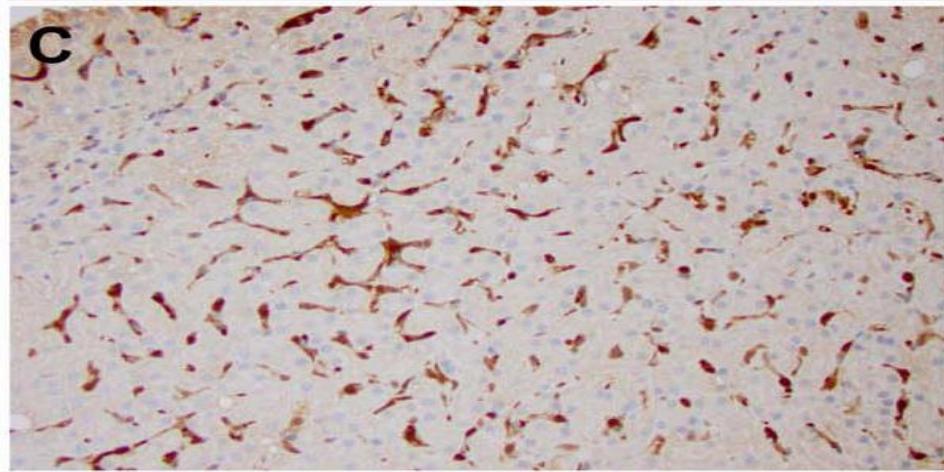
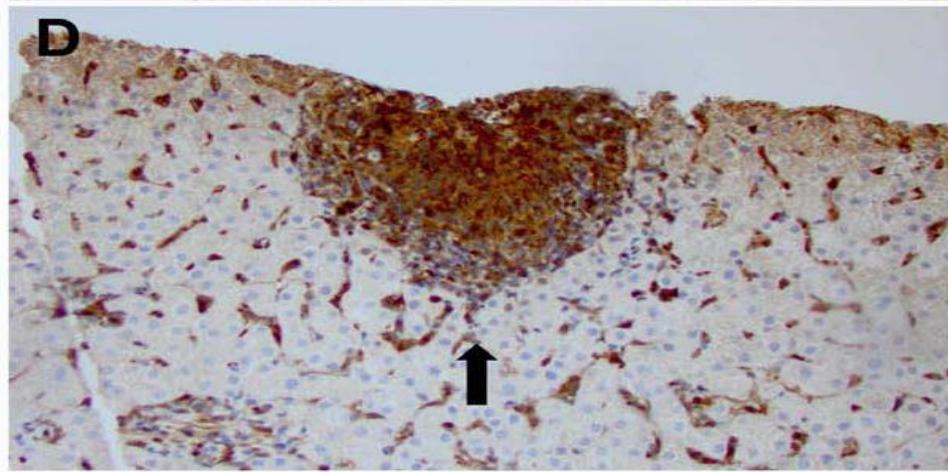
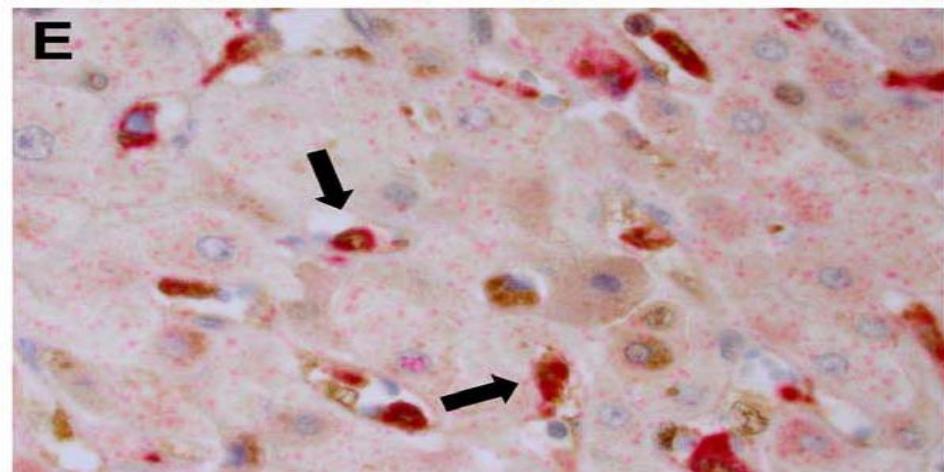
Promueve la  
respuesta Th2

### Galectina 3

Promueve  
fenómenos  
inflamatorios

Inhibe la  
respuesta Th2



**A****B****C****D****E**

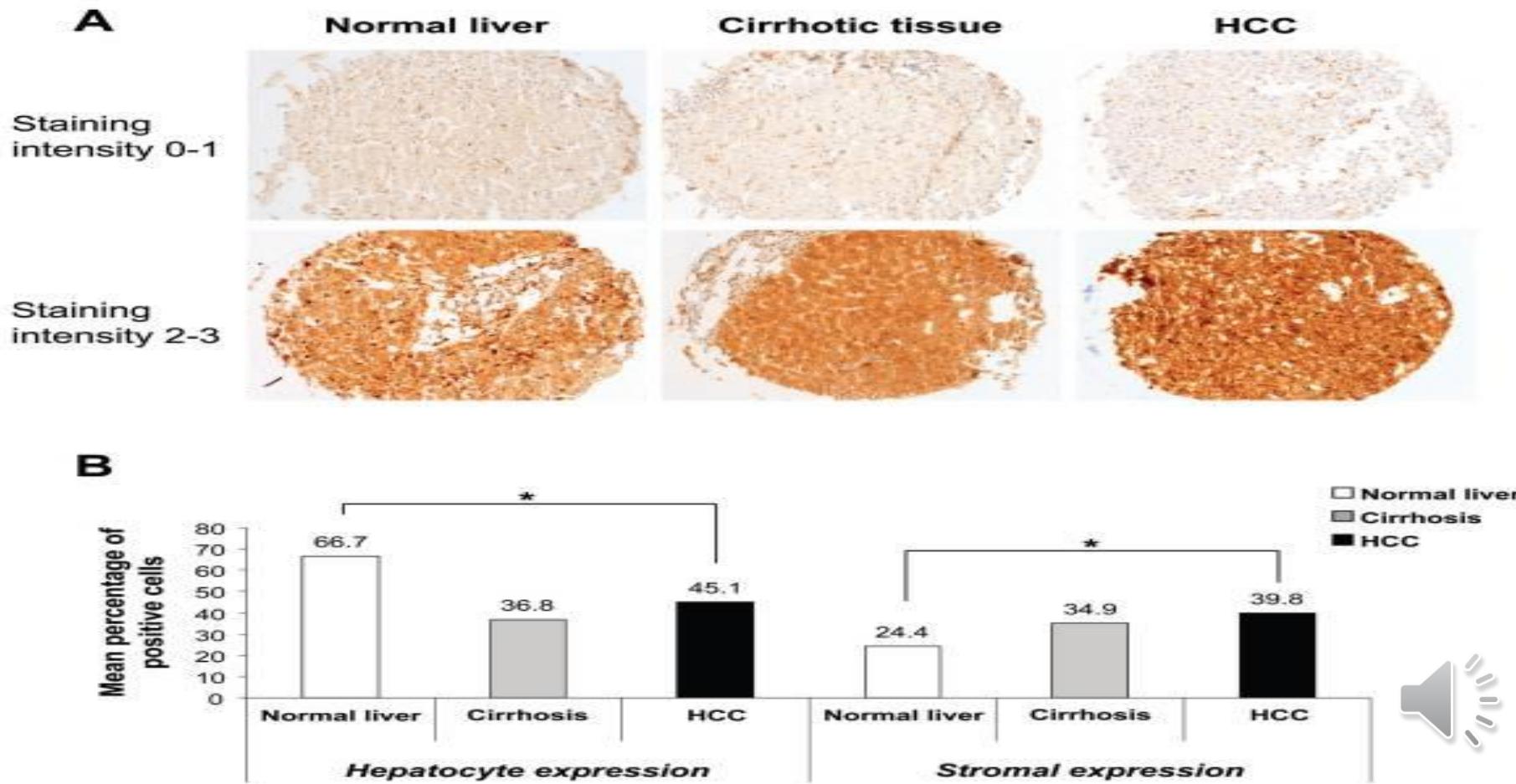
**La galectina 9 producida por las células de Küpffer promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias hepáticas y un incremento de las células Tregs.**

Fuente: Mengshol *et al*, PLoS One. 2010 Mar 4;5(3):e9504.  
Erratum en: PLoS One. 2010;5(3).



# Expresión de Gal-1 en humanos normales, cirróticos y con HCC

Spano *et al*, Mol Med. 6: 102–115, 2010.

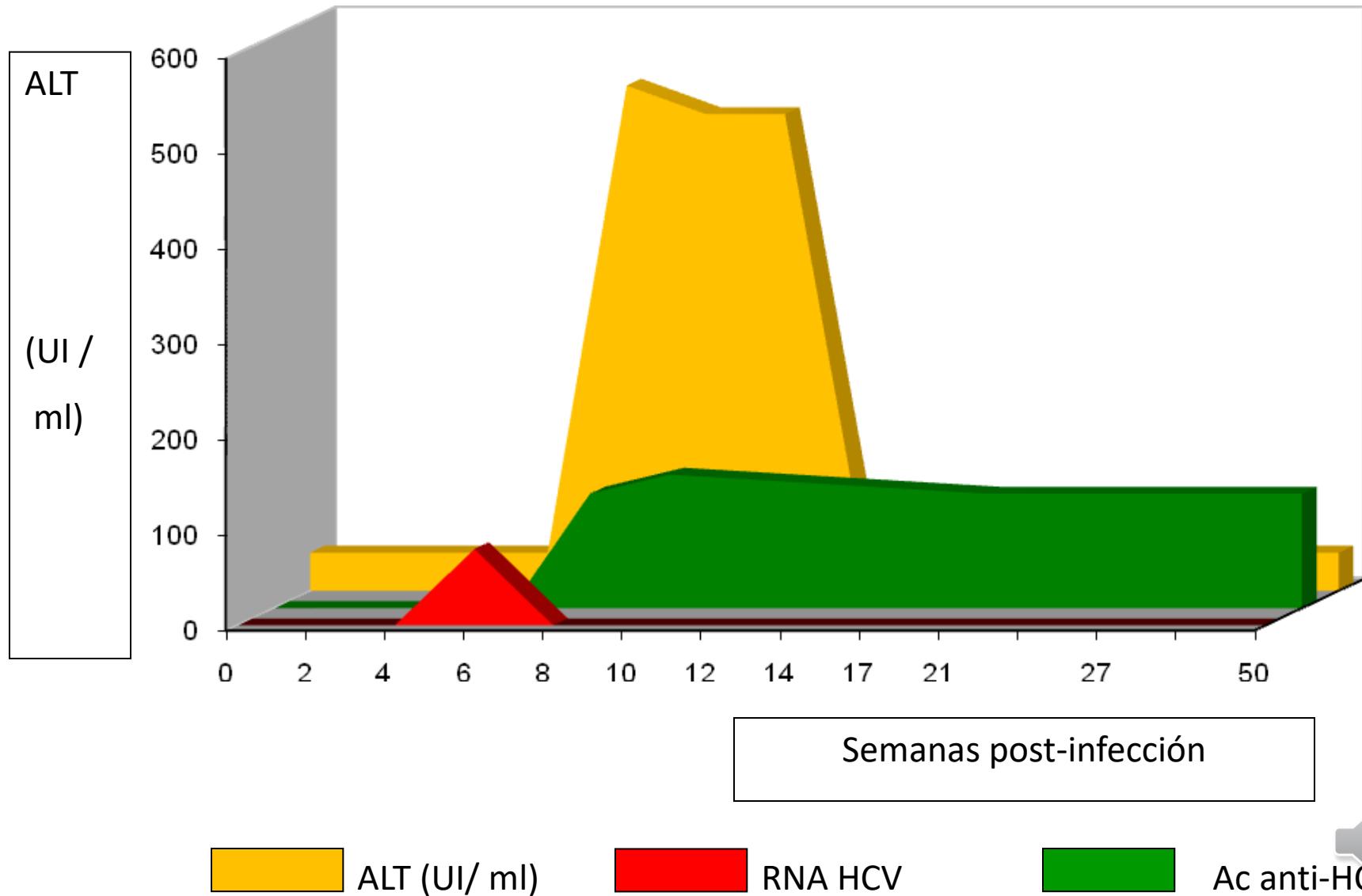


# Novel roles of galectin-1 in hepatocellular carcinoma cell adhesion, polarization, and in vivo tumor growth.

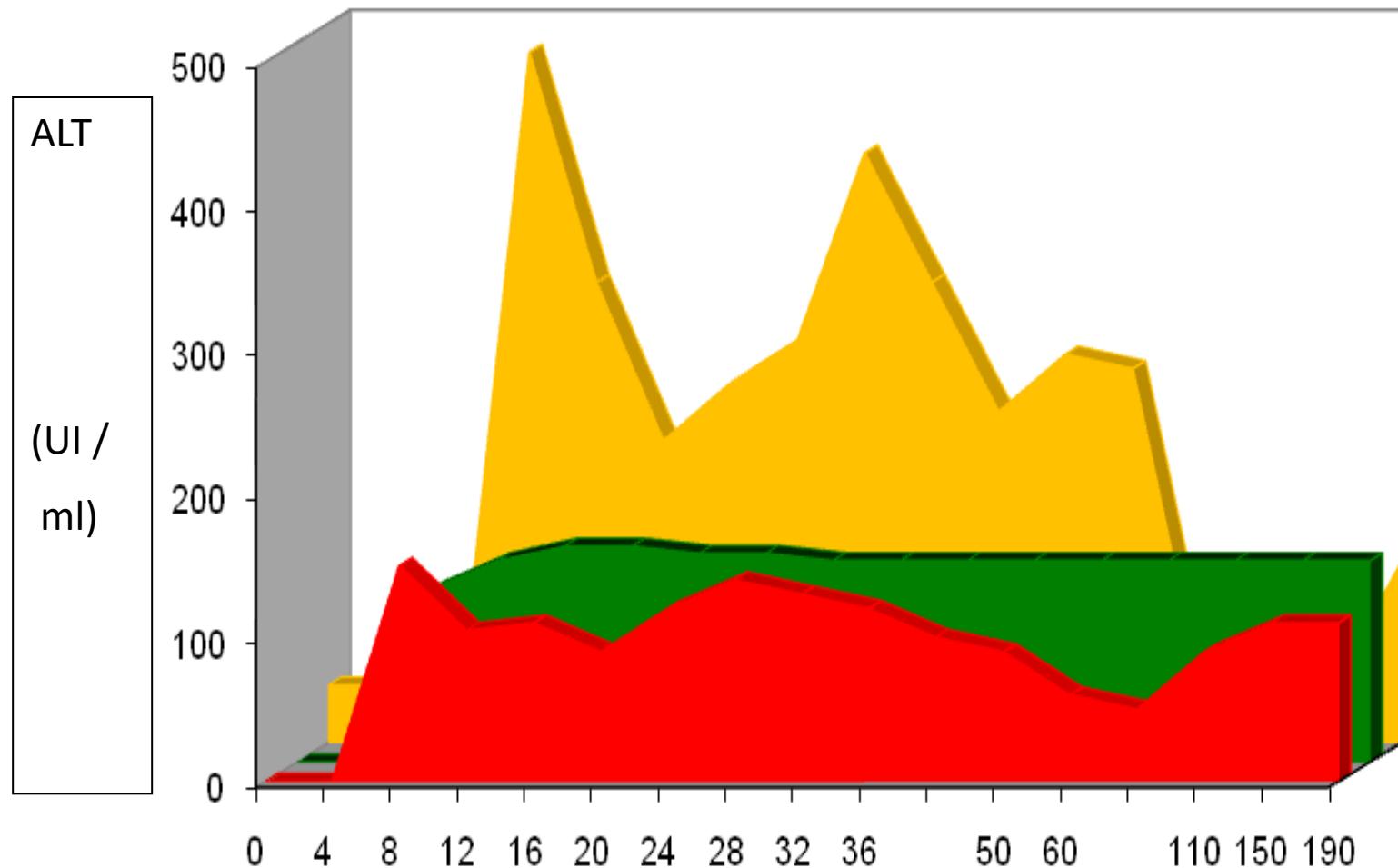
- Galectin-1 (Gal-1), a widely expressed  $\beta$ -galactoside-binding protein, exerts pleiotropic biological functions. **Gal-1 is up-regulated in hepatocarcinoma cells, although its role in liver pathophysiology remains uncertain.** We investigated the effects of Gal-1 on HepG2 hepatocellular carcinoma (HCC) cell adhesion and polarization. Soluble and immobilized recombinant Gal-1 (rGal-1) promoted HepG2 cell adhesion to uncoated plates and also increased adhesion to laminin. Antibody-mediated blockade experiments revealed the involvement of different integrins as critical mediators of these biological effects. In addition, exposure to rGal-1 markedly accelerated the development of apical bile canaliculi as shown by TRITC-phalloidin labeling and immunostaining for multidrug resistance associated-protein 2 (MRP2). Notably, rGal-1 did not interfere with multidrug resistance protein 1/P-glycoprotein or MRP2 apical localization, neither with transfer nor secretion of 5-chloromethylfluorescein diacetate through MRP2. Stimulation of cell adhesion and polarization by rGal-1 was abrogated in the presence of thiogalactoside, a galectin-specific sugar, suggesting the involvement of protein-carbohydrate interactions in these effects. Additionally, Gal-1 effects were abrogated in the presence of wortmannin, PD98059 or H89, suggesting involvement of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase and cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase signaling pathways in these functions. Finally, expression levels of this endogenous lectin correlated with HCC cell adhesion and polarization and up-regulation of Gal-1-favored growth of hepatocarcinoma in vivo. Conclusion: Our results provide the **first evidence of a role of Gal-1 in modulating HCC cell adhesion, polarization, and in vivo tumor growth, with critical implications in liver pathophysiology.**



A



B



Semanas post-infección



ALT (UI/ml)



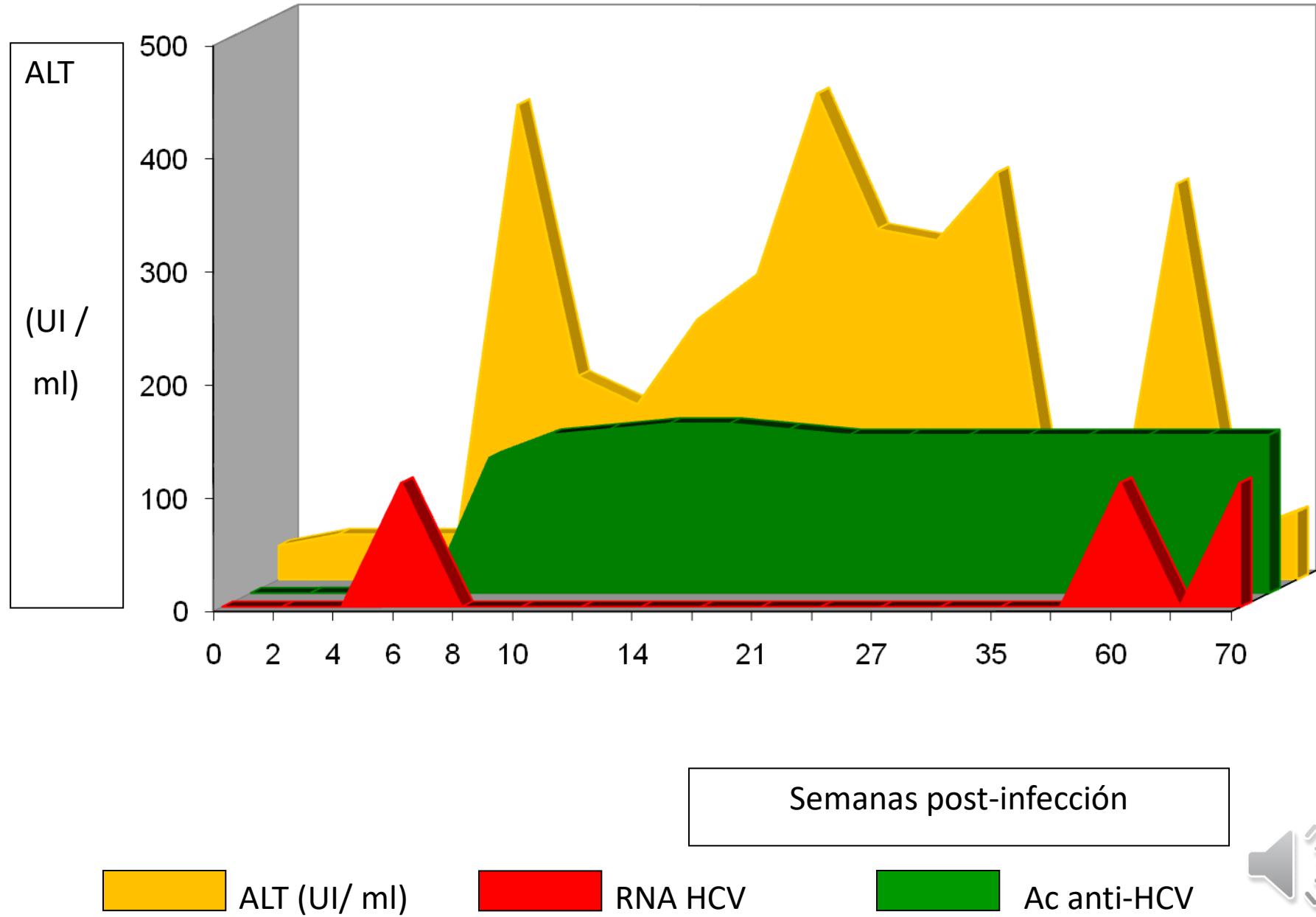
RNA HCV



Ac anti-HCV



C



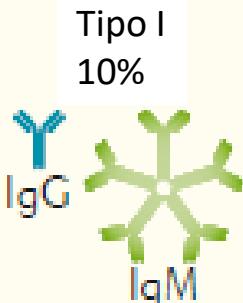
# Hepatitis C

- ✓ Estructura y función
- ✓ Replicación viral y sus implicancias en la epidemiología molecular, la patogénesis, el diagnóstico, la profilaxis y el tratamiento
- ✓ Inmunopatogénesis molecular de la hepatitis C a nivel hepático y su relación con el diagnóstico
- Inmunopatogénesis molecular de las manifestaciones extra-hepáticas

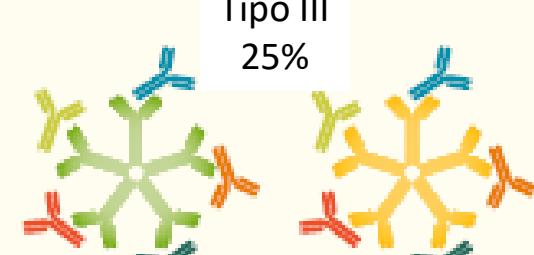
# Crioglobulinemias

- ✓ Enfermedades linfoproliferativas de LB

- ✓ Infecciones crónicas (HCV o HBV)
- ✓ Enfermedades linfoproliferativas
- ✓ Enfermedades autoinmunes
- ✓ Crioglobulinemia mixta esencial



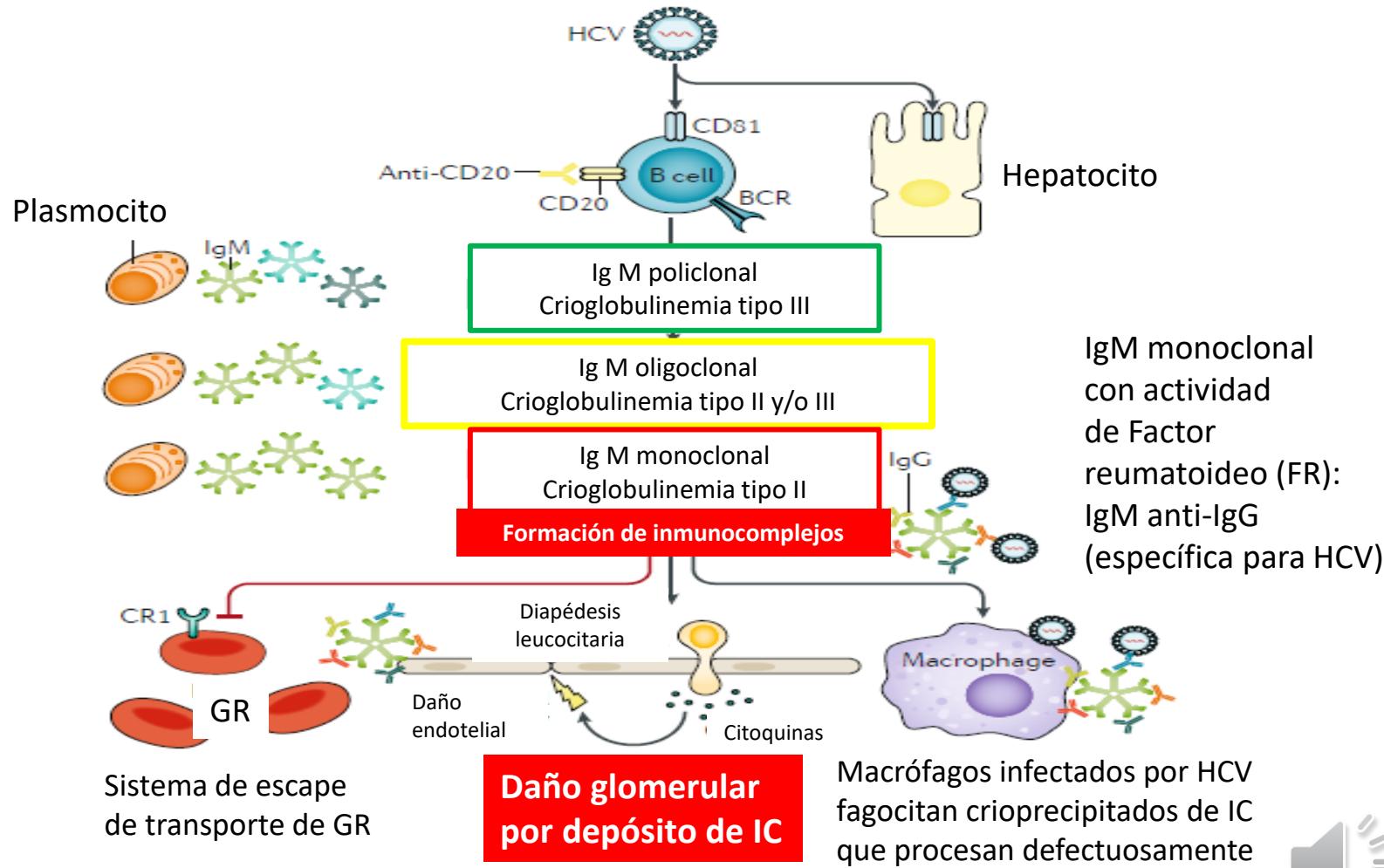
Ig M (> Ig G > Ig A)  
monoclonal



Crioglobulinemia mixta



# Patogénesis de la vasculitis por HCV



# Úlceras por vasculitis asociadas a crioglobulinemia por HCV

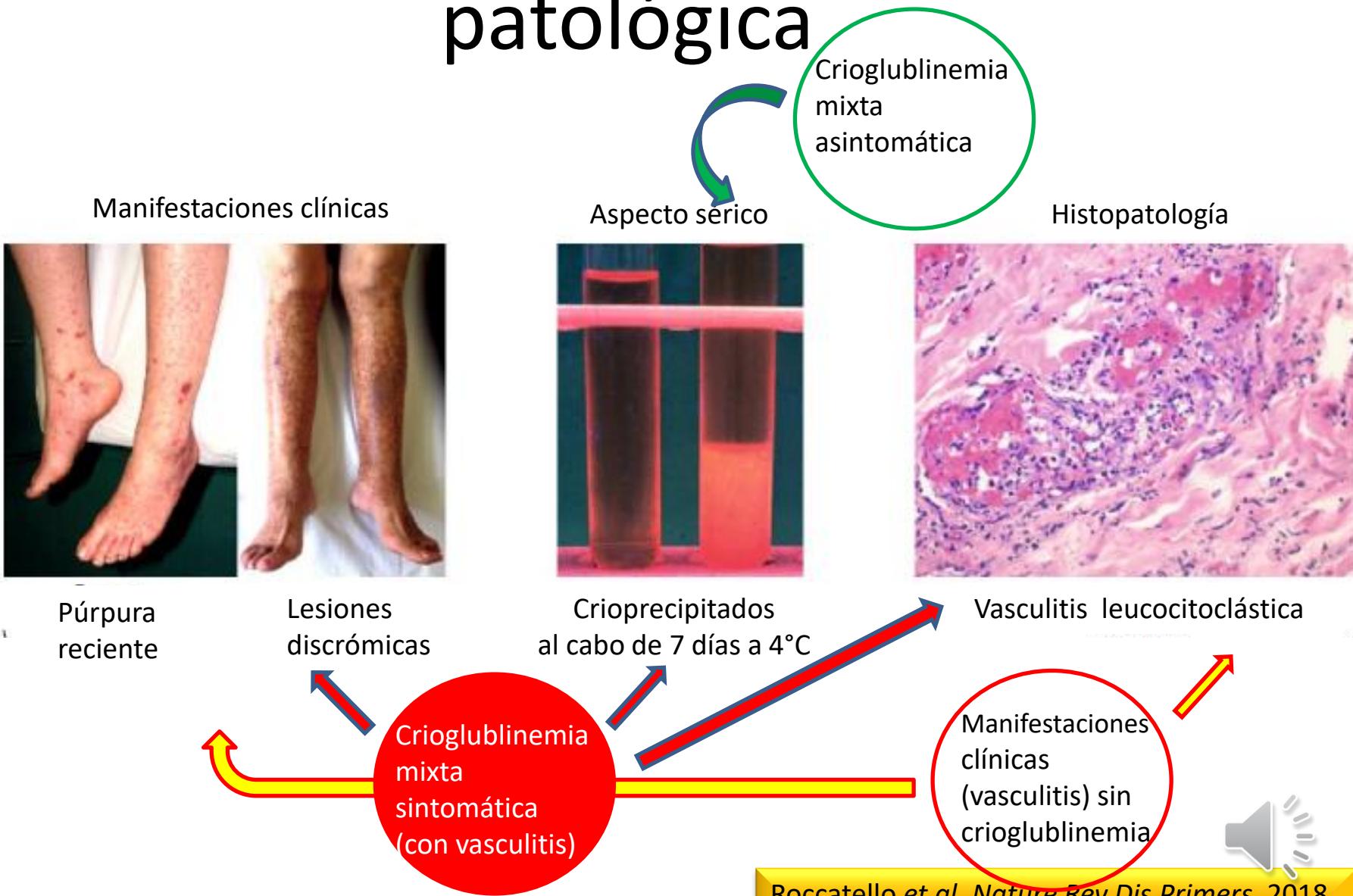


**Clínica:** úlceras de tobillo y pierna por vasculitis asociada a crioglobulinemia.

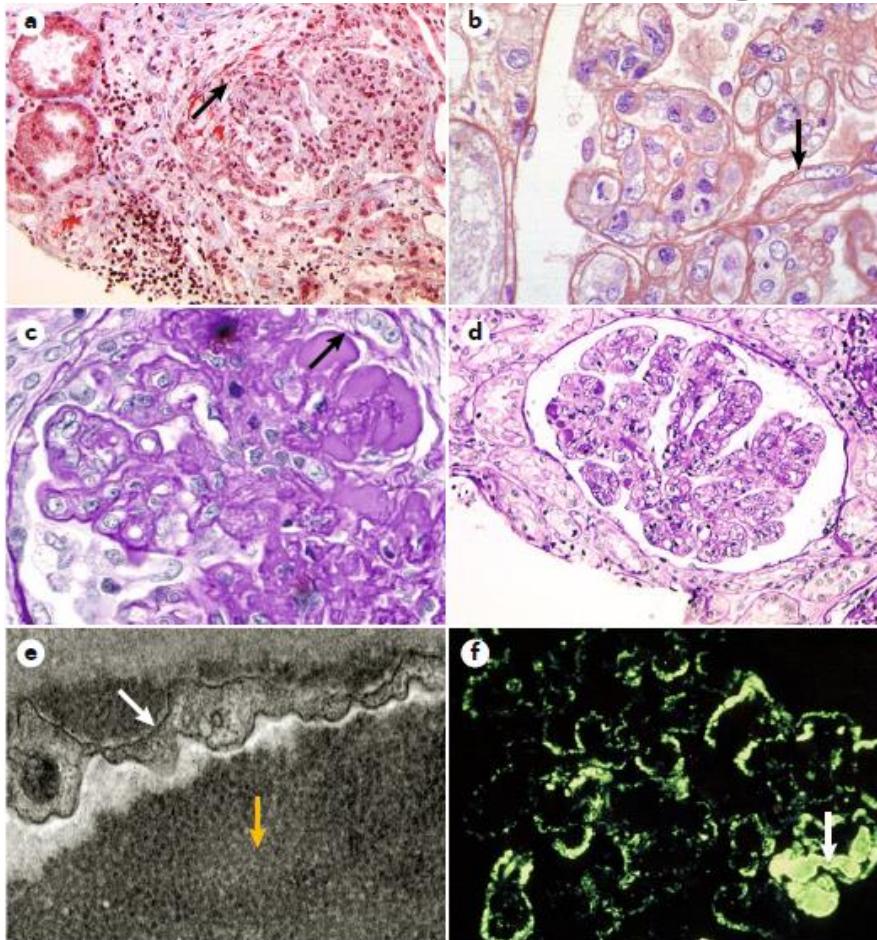
**Patología:** vasculitis con necrosis fibrinoide de la pared vascular, núcleos picnóticos y detritus nucleares de granulocitos y mononucleares. H-E x20.



# Correlación clínico-serológica-patológica

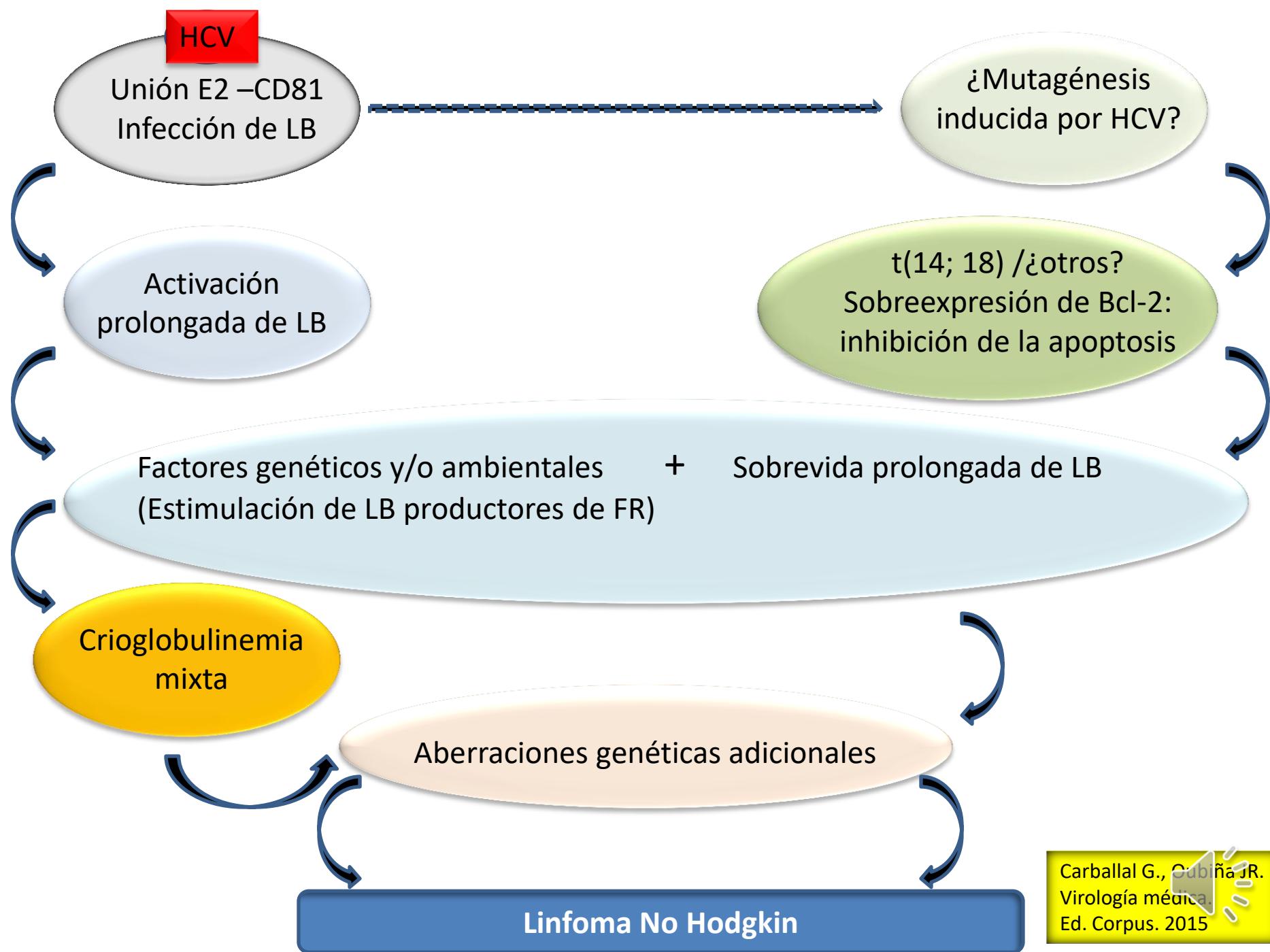


# Nefropatía por vasculitis crioglobulinémica



- a. M.O. (20x) Proliferación extracapilar en riñon, con necrosis fibrinoide (flecha) e interrupción de la cápsula.
- b. M.O. (x40x) Patrón membrano-proliferativo con apariencia de doble contorno de la membrana basal.
- c. M.O. (x20) Tinción con PAS de precipitados de crioglobulinas (flecha) y reduplicación con interposición celular en la membrana basal.
- d. M.O. (10x) Tinción con PAS mostrando una glomerulo-nefritis difusa membrano-proliferativa, con duplicación de la membrana basal, interposición de células mesangiales, y presencia de leucocitos y macrófagos subendoteliales con depósitos de componentes inmunes, expansión y proliferación mesangial , con depósito de leucocitos intracapilares y acumulación de trombos hialinos.
- e. M.E. Depósitos electrón-densos, correspondientes a crioglobulinas precipitadas en el espacio subendotelial (flecha blanca) y en la luz capilar (flecha amarilla)
- f. Inmunofluorescencia demostrando el depósito de IgM con acumulación segmentada (flecha) correspondiente a los trombos observados con M.O.





# Poliarteritis nodosa



Púrpuras y vesículas eritematosas y hemorrágicas. Áreas limitadas de necrosis.



# Liquen plano y hepatitis C



Romano C et al. Expert Rev Exp Immunol, 2018

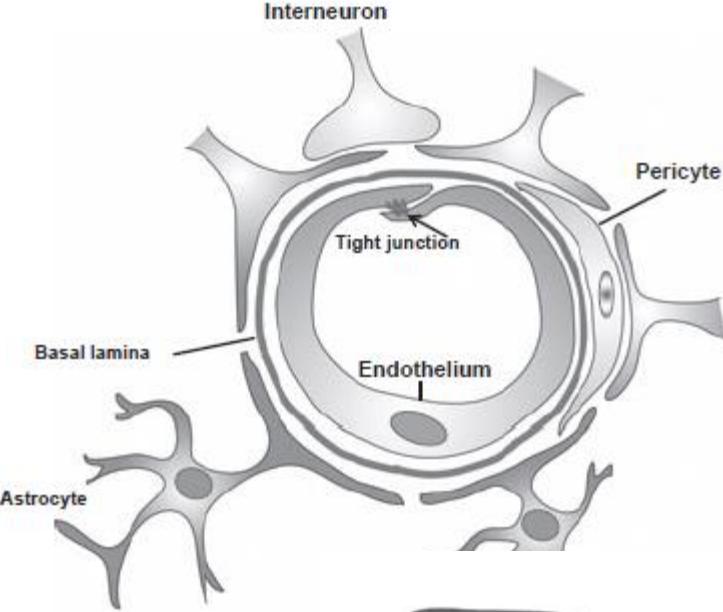
5x riesgo de infección por HCV  
en pacientes con liquen plano

2,5-4,5 x riesgo de padecer  
liquen plano  
en pacientes con HCV

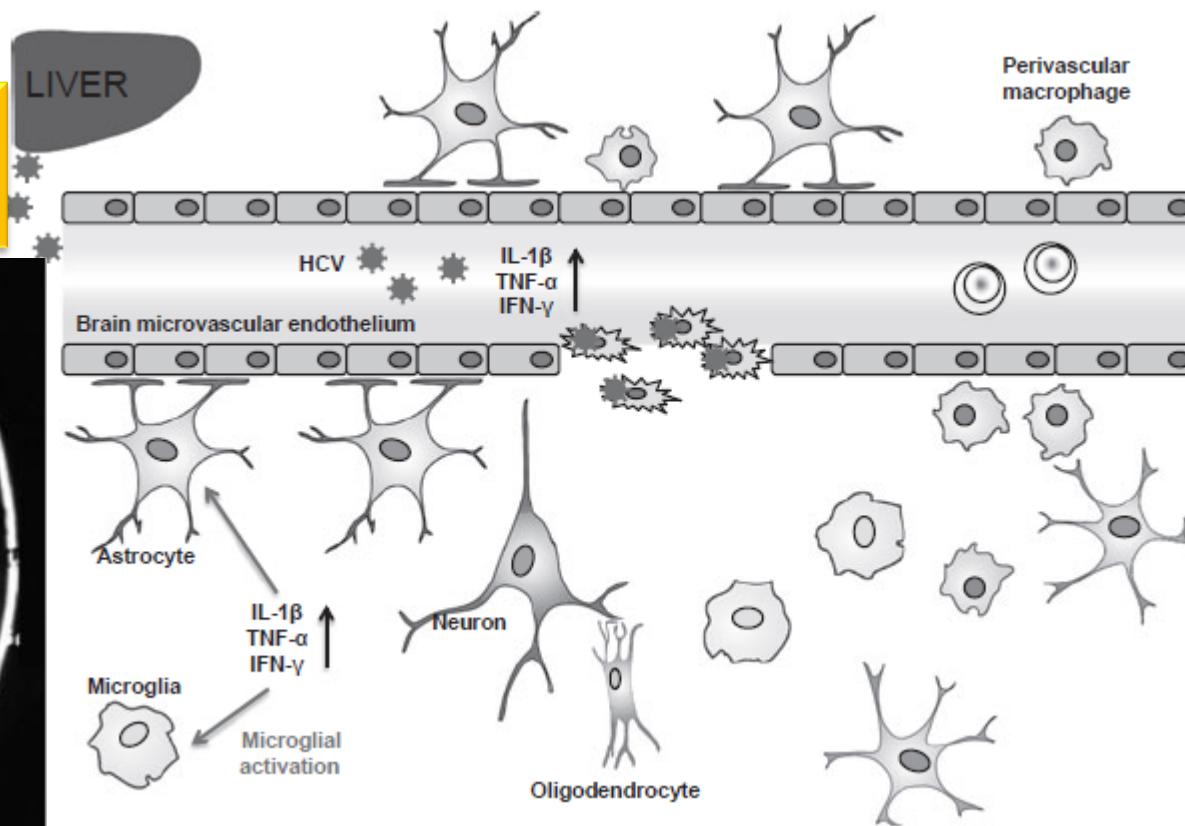
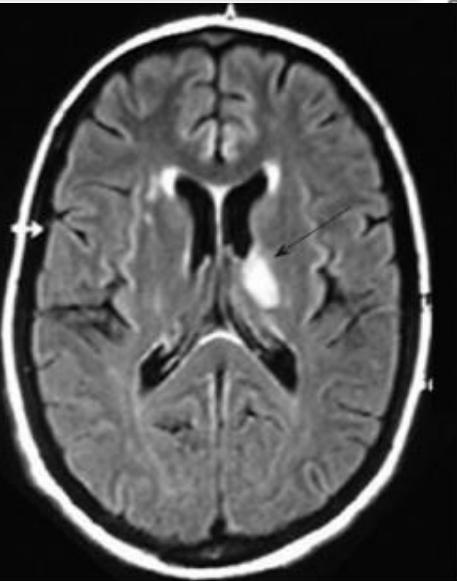
¿Qué tipo de asociación existe entre ambas enfermedades?



# HCV y el SNC



TAC: isquemia talámica en paciente infectado con HCV.



# Infecciones persistentes crónicas: modelo hepatitis C

## ✓ PARTE I

- ✓ ¿Por qué algunas infecciones son habitualmente agudas y otras frecuentemente persistentes crónicas?
- ✓ ¿Cuáles son los elementos de la Rta. Inmune y de los virus que se asocian con frecuencia a infecciones persistentes crónicas?
- ✓ ¿Cómo actúan?
- ✓ Algunos ejemplos de importancia médica

## ✓ PARTE II: la infección por HCV

## ➤ PARTE III: comparación con la infección producida por HBV.

- Síntesis.



# HBV y HCV: ¿sólo una cuestión de alfabeto?



¡La infección por HCV  
no es igual a la del HBV!

*Ver actividad*

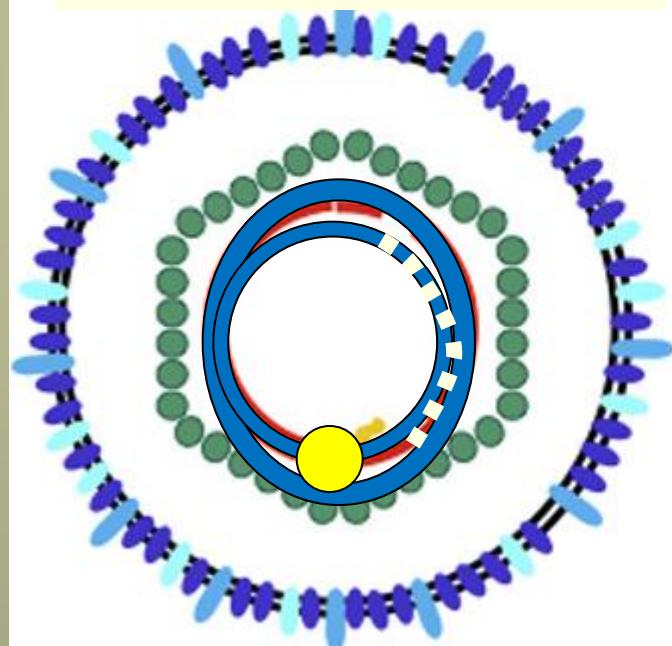
*introductoria del*

*Seminario 14*

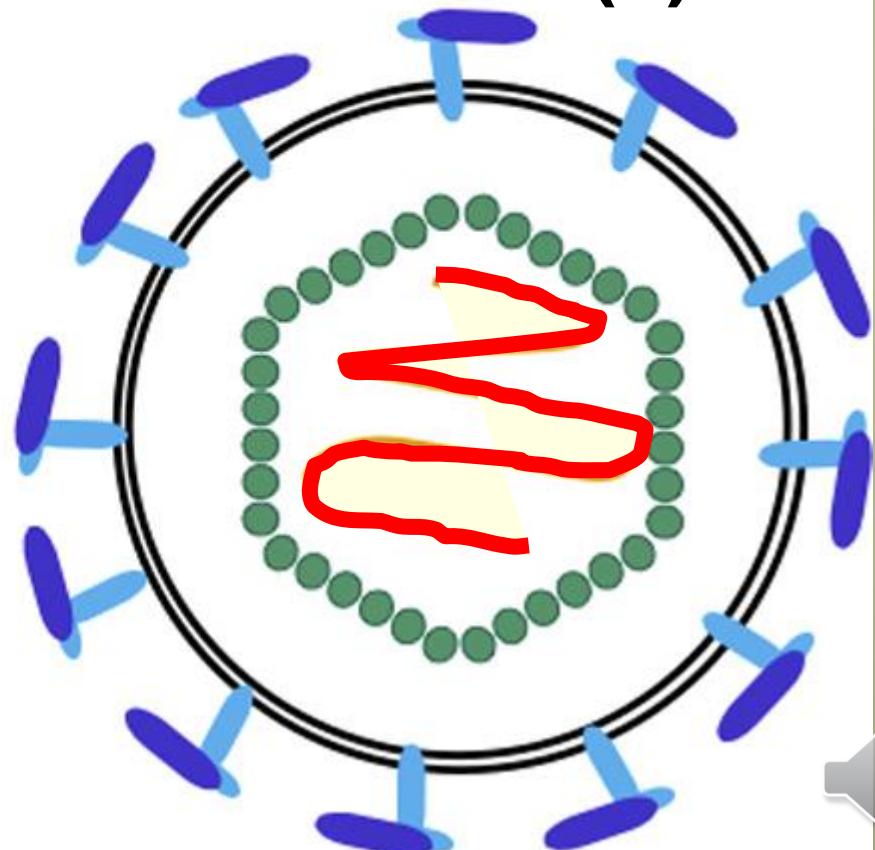


# HBV y HCV: estructura comparada

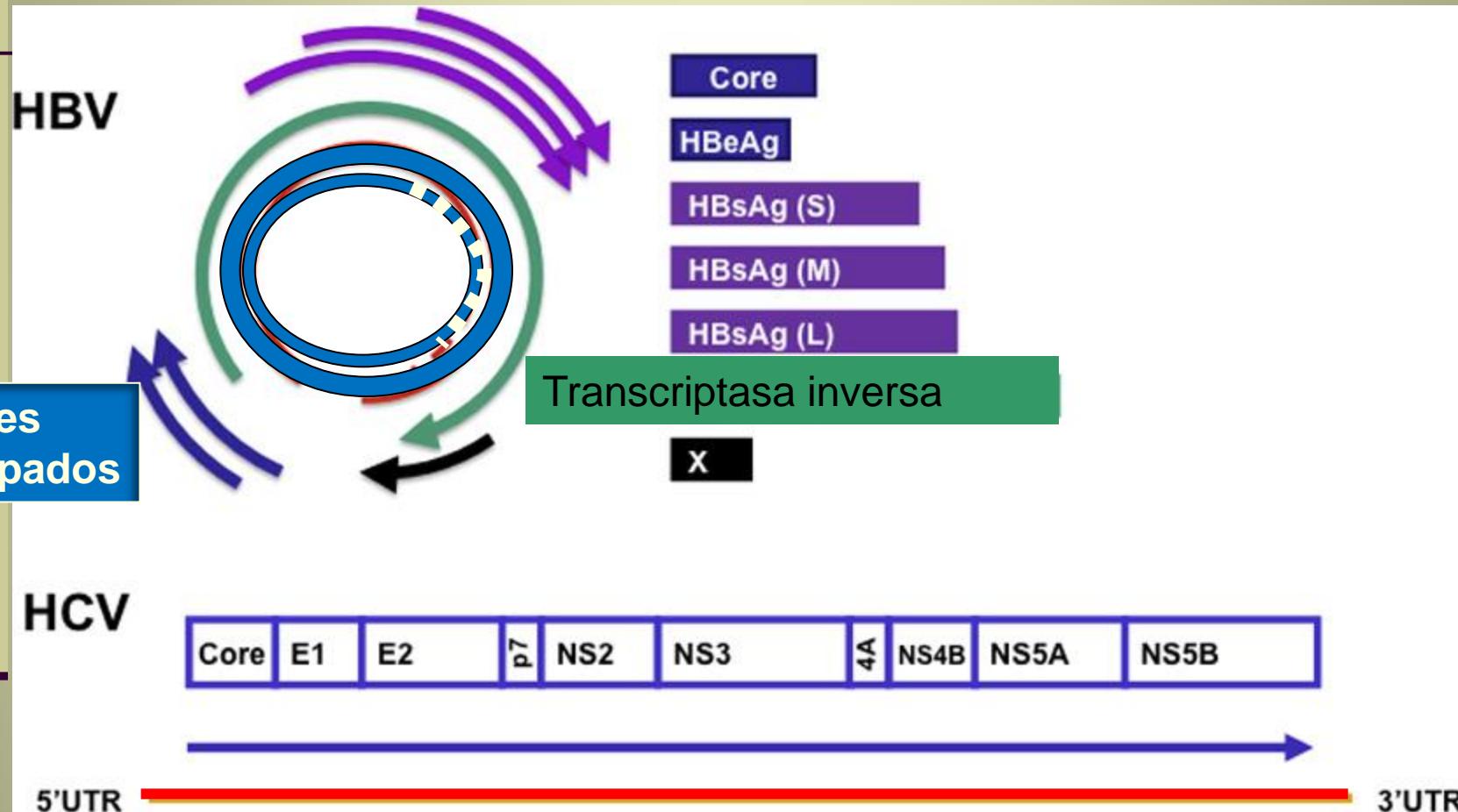
**HBV**  
**Hepadnavirus**  
DNA parcialmente  
bicatenario



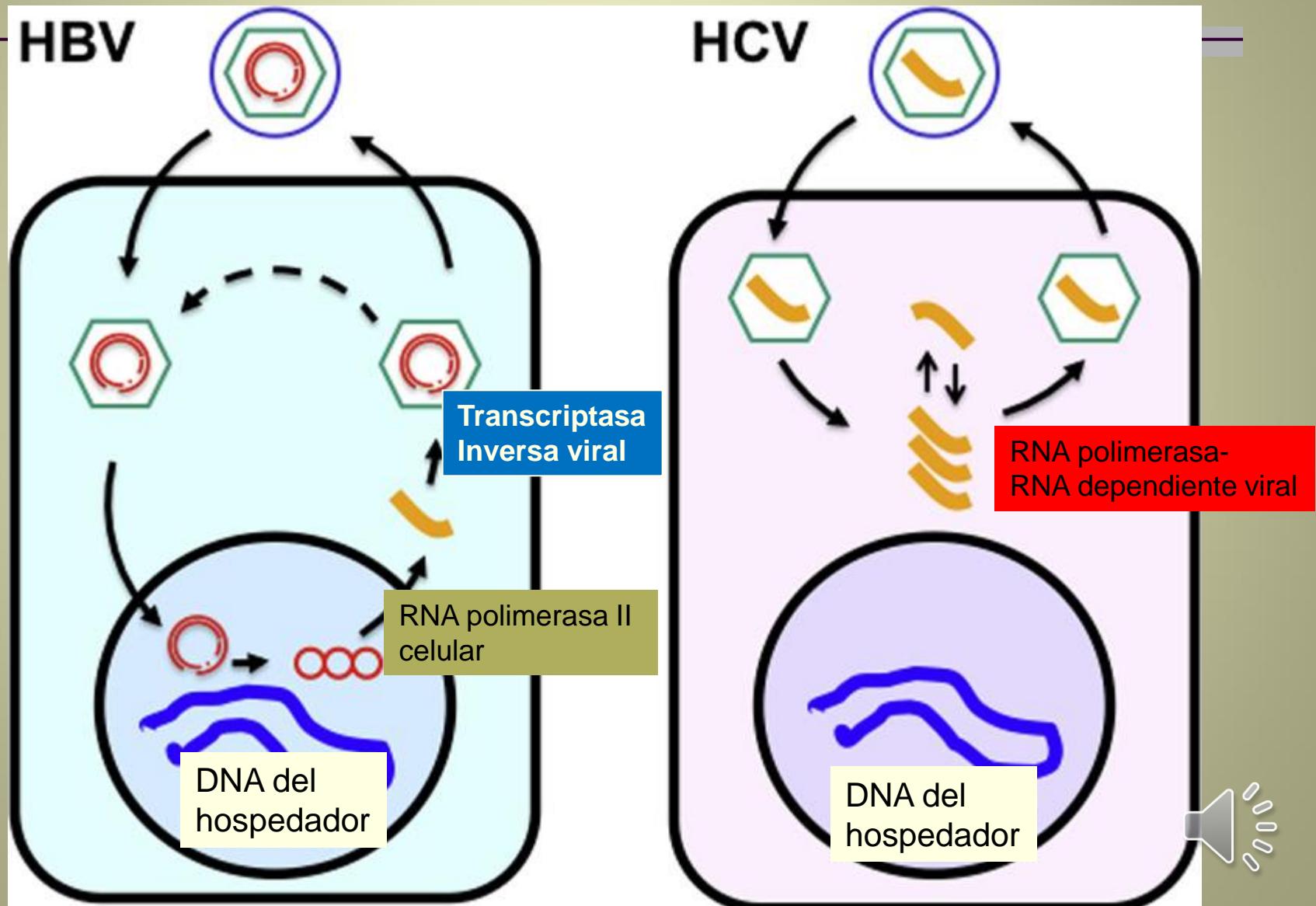
**HCV**  
**Hepacivirus**  
RNA (+)



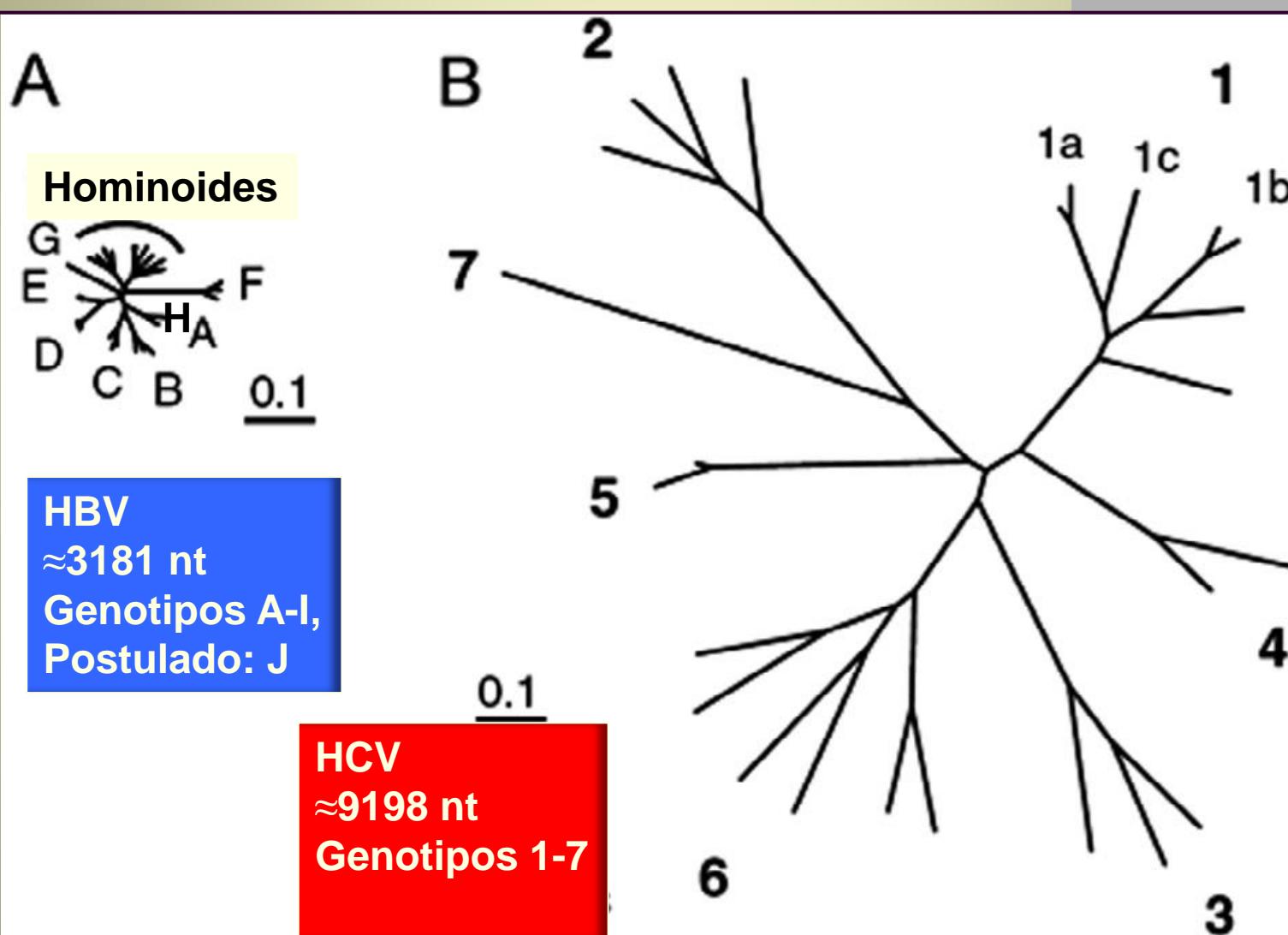
# HBV y HCV: estructura genómica



# Replicación de HBV y HCV: comparación



# Diversidad genética comparativa del HBV y del HCV



# Virología e Inmunología de las infecciones por HBV y HCV: síntesis

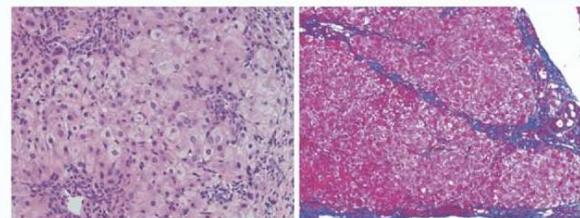
	HBV	HCV
Prevalence worldwide	257 million people infected	71 million people infected
<b><u>Virology</u></b>		
Virus	42 nm; enveloped nucleocapsid; partially double-stranded DNA genome	50 nm; enveloped nucleocapsid; positive stranded RNA genome
Family	Hepadnaviridae	Flaviviridae; Hepacivirus Genus
Genotypes	8 genotypes	6 major genotypes; more than 50 subtypes; quasispecies in each infected patient
Mutation rate	low	high
Virus half-life	2-3 days	3 hours
Virus production	$10^{10} - 10^{12}$ virions / day	$10^{12}$ virions / day
<b><u>Acute Infection</u></b>		
Outcome	>90% self-limited infection	<30% self-limited infection
Immunity	Longterm protective immunity	?
<b><u>Chronic Infection</u></b>		
Cause	Mostly from vertical/perinatal transmission: mother-to-neonate, early childhood infection	Mostly from horizontal transmission injection drug use, parenteral, sexual, nosocomial
Course	Distinct phases defined by ALT and viremia level HBeAg / antibody status	Stable ALT levels and viremia
Spont. resolution	About 1% per year (HBsAg loss)	No
<b><u>Treatment</u></b>		
IFN-based	PegIFN; 25% HBeAg seroconversion 3-7% HBsAg loss	PegIFN/ribavirin
Antiviral	Inhibition of transcriptase activity of viral polymerase; suppression of viral replication without elimination of cccDNA	Inhibition of viral protease and polymerase; >95% cure
Cure	functional cure (cccDNA persists, reactivation possible)	virological cure (virus completely cleared)

Rehermann B,  
Thimme R.  
Gastroenterology  
Agosto de 2018

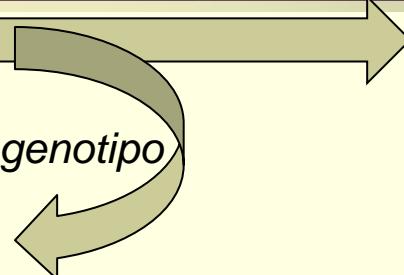
# Patogénesis de las infecciones por HBV / HCV : mecanismos de lesión

## Efecto citopático directo

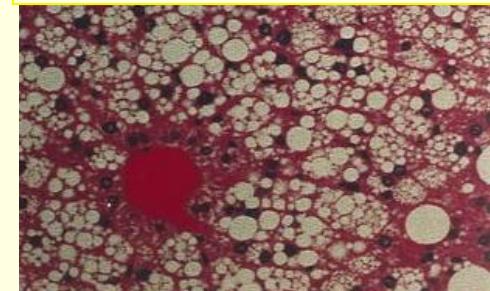
Sólo en inmunosuprimidos: ej. *fibrosis* por (sub)genotipo



C2 del HBV



Esteatosis por HCV



Ratones UPA-SCID (*inmunodeficientes con hígado humanizado*)

## Patología mediada por la Rta. inmune

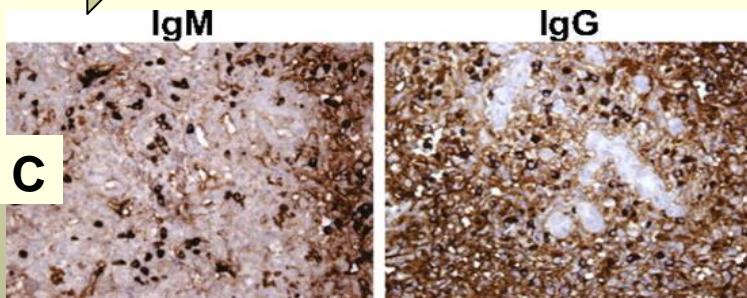
### Humoral (inmunocomplejos)

### Celular

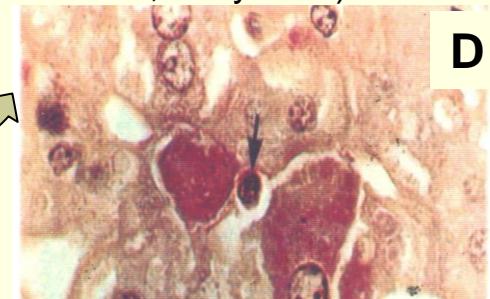
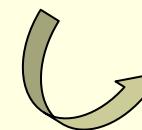
(Citotoxicidad: CTL, NK y NKT)

Glomerulonefritis membranosa  
(HBV / HCV)

Hepatitis aguda fulminante por HBV



C



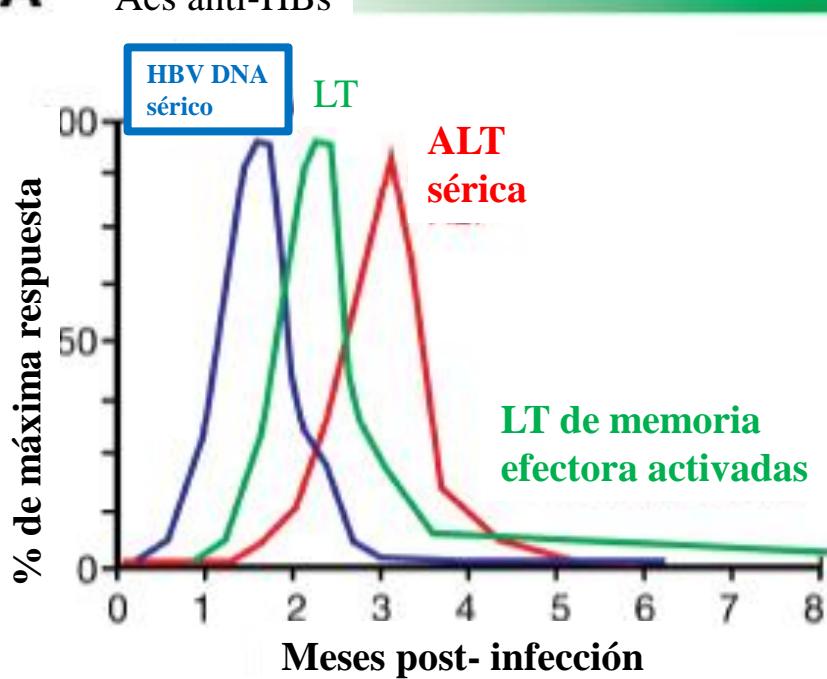
Hepatitis aguda o crónica por HBV o HCV



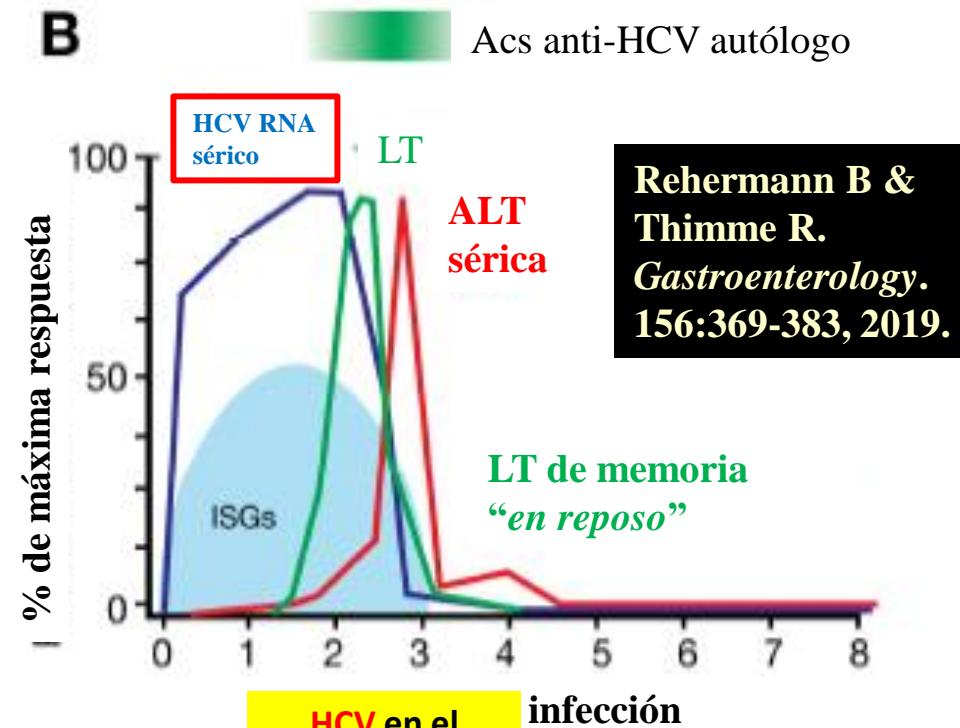
B

# Evolución inmuno-viroológica inicial de las infecciones por HBV y por HCV

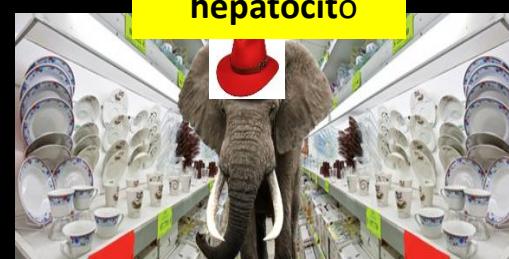
A



B



HBV replica en el hepatocito sin activar genes ISGs



¡No pasa desapercibido! Se sintetizan productos de genes ISG



# *Qué sabemos y qué ignoramos*

	What we know		What we do not know	
	HBV	HCV	HBV	HCV
Innate Response	- no ISG induction "stealth virus"	- strong ISG induction	- mechanisms circumventing ISG-induction	- relative role of ISGs in HCC and HCV-mediated interference with hepatic IFN system
	- functional and phenotypical alterations of NK cells	-	- Responsible pathways and reversibility of NK cell alteration	
	- IFN therapy leads to activation of immunity	- DAA therapy leads to rapid downregulation of ISGs and normalization of NK cell phenotype		
	- viral clearance associated with multi-specific CD4+ and CD8+ T cell responses	-	- relative role of cytolytic- versus non-cytolytic effector mechanisms	
	- enrichment of T cells at the site of infection	-	- impact of liver environment on function and phenotype of immune cells	
	- early loss of CD4+ T cell help leads to viral persistence	-	- nature of immune responses that drive disease progression	
	- T cell dysfunction and viral escape contribute to T cell failure	-	- mechanisms responsible for early CD4+ T cell failure	
Adaptive Response	- antiviral therapy leads at least to partial recovery of virus-specific T cell recovery	-	- relative role of different mechanisms of T cell failure	
	- humoral immune responses detectable	-	- extent to which antiviral therapy and viral control lead to restoration of protective immunity	
	-	- role of antibodies and B cells in different disease phases	- contribution of antibodies to viral control	



# *Hepatocarcinoma por HBV y HCV:* *síntesis*

## Vías compartidas

- ↑Inflamación – fibrosis – cirrosis
- ↑Señalización Ca<sup>++</sup> mediada
- ↑TGF-β
- ↑Estrés oxidativo
- ↓P53
- ↑Wnt / β catenina

## Vías específicas de c/virus

- Inestabilidad genómica: HBV integración; HCV: core NS3, NS5A
- Activación de oncogenes: HBV mutagénesis insercional; Proteínas HCV
- Depósito de Fe (poliproteína HCV)
- Aberraciones cromosómicas (HBV> HCV)
- Metilación del DNA: HCV>HBV



# Infecciones persistentes crónicas: modelo hepatitis C

## ✓ PARTE I

- ✓ ¿Por qué algunas infecciones son habitualmente agudas y otras frecuentemente persistentes crónicas?
- ✓ ¿Cuáles son los elementos de la Rta. Inmune y de los virus que se asocian con frecuencia a infecciones persistentes crónicas?
- ✓ ¿Cómo actúan?
- ✓ Algunos ejemplos de importancia médica
- ✓ PARTE II: la infección por HCV
- ✓ PARTE III: comparación con la infección producida por HBV.
- Síntesis.



# HEPATITIS C : SÍNTESIS (I)

- ✓ Enfermedad aguda o muy frecuentemente persistente crónica infecto-contagiosa causada por 1 único serotipo del HCV, con 7 genotipos asociados a diferencias en la respuesta a la terapéutica con DAAD.
- ✓ La infección es captada por diversos sensores, por lo que se sintetizan ISGs.
- ✓ La inmunidad mediada por los LT CD8+ es regulada por los LT CD4+, la que se evanece en quienes evolucionarán hacia la cronicidad.
- ✓ Los anticuerpos neutralizantes perduran períodos breves y protegen frente al virus infectante (autólogo).
- ✓ El HCV elabora múltiples estrategias de evasión a la Rta. Inmune innata y adaptativa, tanto humoral como celular.



## HEPATITIS C: SÍNTESIS (II)

- ✓ Existe compartmentalización de cuasiespecies del HCV en diversos órganos y aún dentro de un mismo órgano.
- ✓ Se producen manifestaciones hepáticas y extra-hepáticas con eventual compromiso renal, cutáneo, linfoideo y –raramente- del SNC, pudiendo observarse eventos inflamatorios y –en determinados casos- también tumorales.
- ✓ El virus promueve mecanismos de daño hístico directos (por ej. la esteatosis) e indirectos (por ej. la hepatitis crónica –mediada por la respuesta T débil, oligoclonal y oligo- o mono-específica-, o la vasculitis o la glomerulonefritis mediadas por el depósito de inmunocomplejos).

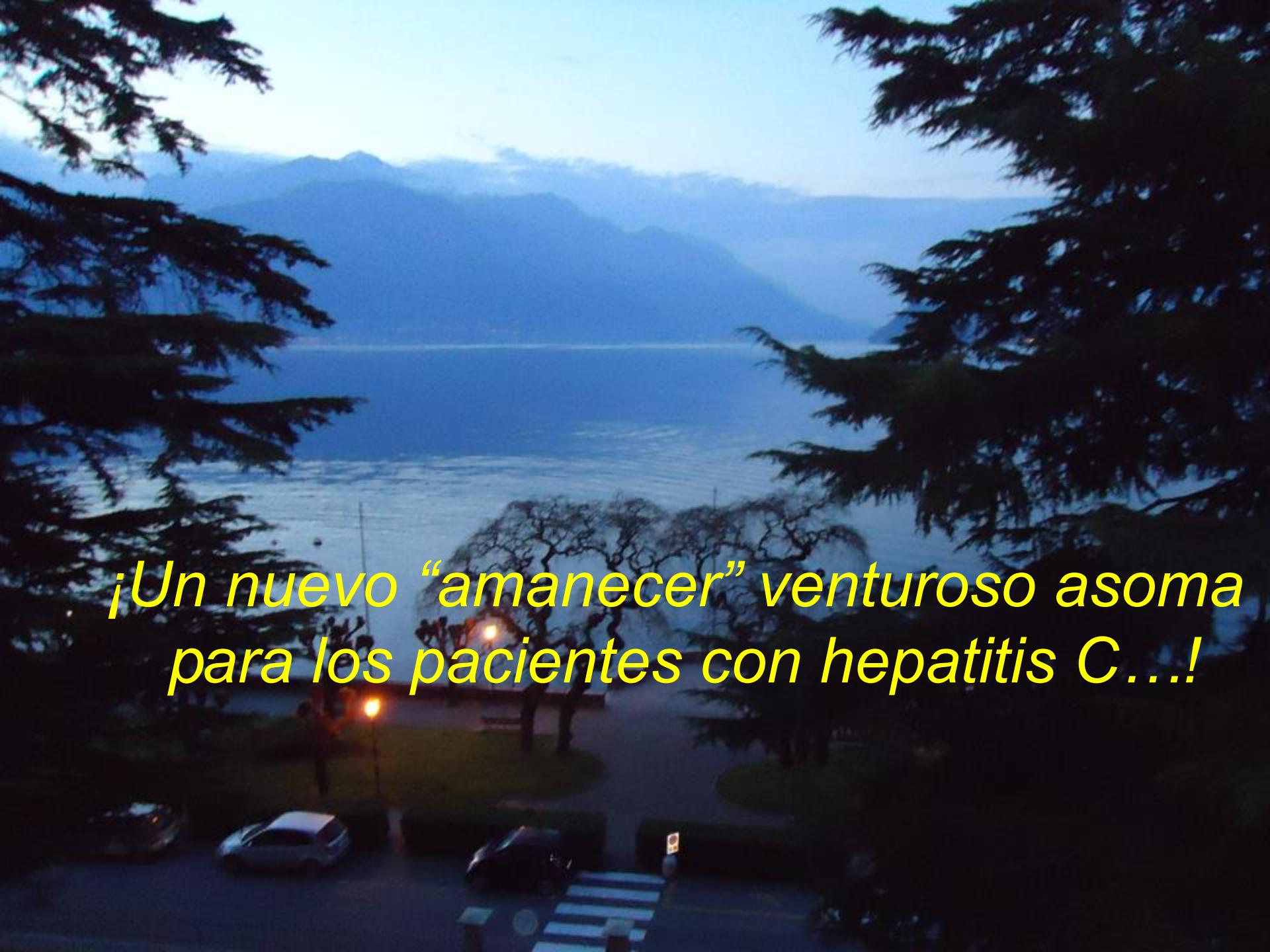


# Premio Nobel 2018 en Fisiología o Medicina



James P. Allison y Tasuku Honjo recibieron el galardón el 1-10-2018 por sus descubrimientos sobre CTLA-4 y PD-1, reguladores de la inmunoterapia anti-tumoral. ¡Extraordinaria implicancia en Virología: ensayos clínicos en curso para las hepatitis crónicas B y C!





*¡Un nuevo “amanecer” venturoso asoma para los pacientes con hepatitis C...!*