

Replicación *in vitro* del virus de la hepatitis C

Gerardo Santos-López,^{a,*} Verónica Vallejo-Ruiz,^b y Julio Reyes-Leyva^a

^aLaboratorio de Virología y ^bLaboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla, México

Uno de los principales problemas en la investigación del virus de la hepatitis C (VHC) ha sido la carencia de un modelo de replicación en cultivo celular. De hecho, el reconocimiento de este virus como agente causal de hepatitis no se llevó a cabo por métodos de aislamiento convencionales como ha sucedido con la mayoría de los virus conocidos. El VHC fue caracterizado como tal hasta que su genoma fue clonado, con lo que se definió como la principal causa de la denominada hepatitis no A/no B. Actualmente se estima que el 3 % de la población mundial se encuentra infectado por este virus y está en riesgo de desarrollar algún problema crónico de hígado como cirrosis y hepatocarcinoma.

Se han realizado múltiples ensayos para infectar células en cultivo con virus provenientes de suero de pacientes infectados. Los mejores resultados se han obtenido utilizando cultivos primarios de hepatocitos humanos o de chimpancé, única especie que, además de la humana, puede ser infectada. Sin embargo, los rendimientos son extremadamente bajos y no son útiles para estudios de laboratorio. Para solucionar este problema y para obtener un genoma viral autorreplicativo, un grupo de investigación alemán propuso un sistema, el replicón, que permite obtener niveles de replicación 100,000 veces mayores a los que se obtienen en los cultivos primarios. Para tal efecto, el genoma del VHC, originalmente de ARN, es convertido mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en una cadena doble de ADN que, posteriormente, es insertada en un plásmido que posee un promotor para la polimerasa del fago T7. A partir de la secuencia clonada se puede obtener ARN de cadena sencilla en sentido positivo (como el genoma viral) mediante transcripción *in vitro*, el cual es introducido a las células en cultivo donde podrá replicarse de manera autónoma ya que contiene las secuencias que codifican para las proteínas necesarias, entre ellas una ARN polimerasa dependiente de ARN, y las proteasas que permiten la maduración de sus proteínas.¹ El sistema se estableció originalmente con un genoma incompleto que carecía de las proteínas estructurales, por lo que no es posible que se formen partículas virales, lo cual no es necesario para que el replicón funcione.

Este sistema ha sido utilizado principalmente en estudios de replicación, con los que se han podido determinar algunos componentes y condiciones mínimas para que este proceso se lleve a cabo. Un objetivo muy importante ha sido también su uso en el desarrollo de probables fármacos con actividad antiviral dirigidos específicamente contra la replicación. No obstante, el sistema del replicón tiene poca utilidad en otro tipo de estudios que requieren necesariamente la formación de partículas virales infecciosas, tales como aspectos inmunológicos sistémicos en animales de laboratorio, o para determinar aspectos importantes del ciclo viral.

Recientemente, la colaboración de los grupos de investigación de Takaji Wakita (Tokio, Japón) y de Ralf Bartenschlager (Heidelberg, Alemania), usando como base las técnicas de construcción del replicón, lograron obtener partículas virales infectantes en los sobrenadantes de cultivos celulares.² Para este trabajo, se realizó la copia completa del genoma viral que se introdujo en un plásmido para después ser sometido a transcripción *in vitro* y obtener copias del genoma completo del VHC. Particularmente se utilizó una cepa denominada JFH-1 (por *japan fulminant hepatitis*), la cual se replicó y ensambló de manera efectiva en la línea celular Huh-7 de hígado humano para formar partículas con características biofísicas muy semejantes a las esperadas para el VHC. Datos relevantes de este trabajo son que las partículas virales obtenidas son capaces de infectar nuevamente las células Huh-7, así como los chimpancés mediante inoculaciones experimentales.

Antes de que este hallazgo fuera publicado formalmente en la revista *Nature Medicine*, otro grupo de investigación, dirigido por Francis Chisari (La Jolla, E.U.A.), solicitó la colaboración de Takaji Wakita para producir partículas virales en cultivo. En este caso se usó la línea celular Huh-7.5.1, derivada de las células Huh-7, obteniéndose mejores resultados en la producción de los viriones³ ya que los genomas y proteínas virales son capaces de producirse más rápido y en mayor cantidad que en las células Huh-7 originalmente utilizadas. En células Huh-7.5.1 se pueden obtener títulos del orden de 10⁵ unidades infecciosas por ml de cultivo celular, lo cual representa aproximadamente 50 veces más que lo que

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Gerardo Santos-López. Laboratorio de Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS, Km. 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec, 74360 Metepec, Pue., México. Tel. y fax: +52 (244) 444-0122; E-mail: gsantos@cinvestav.mx

se obtiene en células Huh-7. Las razones por las que las células Huh-7.5.1 tienen ventaja en la producción de viriones no se ha determinado todavía; sin embargo, se sabe que estas células tienen una mutación puntual en la proteína RIG-I por la que pierde funcionalidad. RIG-I es un componente importante de la maquinaria celular involucrada en la activación del factor regulador 3 del interferón (IRF-3), que a su vez interviene en la activación de la respuesta innata antiviral, lo que probablemente hace que en estas células el VHC tenga menos restricciones para su replicación.¹

Casi al mismo tiempo, el grupo de investigación de Charles Rice (Nueva York, E.U.A.) diseñó un sistema muy semejante para producir partículas del VHC en cultivo, con la diferencia de que el genoma utilizado es una combinación entre la cepa JHF-1 y la cepa J6, obteniendo un genoma químérico que se adaptó bien a las células Huh-7.5, línea de la que derivan directamente las células Huh-7.5.1.⁴ Este trabajo informa que las partículas obtenidas son de características muy similares a los informados por los otros grupos de investigación, obteniendo títulos cercanos a 10^6 unidades infecciosas por ml.

En los últimos meses se han presentado otros estudios que informan aumento en el rendimiento de este sistema de producción de viriones, lo cual es importante para tener una

fuente de material biológico para realizar los diversos estudios sobre VHC pendientes desde hace mucho tiempo. Otra serie de trabajos se orientan hacia la obtención de distintos genotipos virales, ya que, tanto las clonas de JHF-1 como de J6 son de genotipo 2a. Mientras que el genotipo más frecuente y que mayores problemas presenta durante el tratamiento en los pacientes es el 1b. Sin duda esta serie de trabajos contribuirá en gran medida al estudio detallado del ciclo de replicación viral así como a la obtención de nuevos fármacos para el tratamiento de la infección por el VHC.

Referencias

1. Bartenschlager R, Pietschmann T. Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(28):9739-40.
2. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11(7):791-796.
3. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(26):9294-9299.
4. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309(5734):623-626.