

entre los pacientes con IAM que son remitidos para AP. Para ello se está evaluando el efecto de la administración de diferentes agentes farmacológicos (especialmente bloqueantes de las glucoproteínas IIb/IIIa o dosis bajas de agentes trombolíticos o ambas) previamente a la AP. Esta estrategia, es decir la realización de AP pero con la administración previa de estos agentes farmacológicos sin que ello suponga retraso en la AP, se denomina "angioplastia facilitada".

Los resultados del estudio ADMIRAL (*Abciximab before direct angioplasty and stenting in myocardial infarction regarding acute and long term follow-up*) parecen apoyar la administración temprana de abciximab en pacientes con IAM remitidos para la realización de AP. En el estudio SPEED (*Strategies for patency enhancement in the emergency department*; GUSTO-4 piloto), la combinación de abciximab y una dosis reducida de reteplasa permitió obtener una tasa de reperfusión superior que con la dosis estándar de reteplasa sin abciximab.<sup>12</sup> En los estudios IMPACT-AMI (*Integrilin to minimise platelet aggregation and coronary thrombolysis*),<sup>32</sup> e INTRO-AMI (*Integrilin and low-dose thrombolysis in acute myocardial infarction*),<sup>10</sup> la combinación de eptifibatide con dosis baja de trombolítico también logró una tasa de recanalización del vaso superior a la de la dosis estándar de trombolítico.

Algunos estudios como el CARESS in AMI (*Combined abciximab reteplase stent study in acute myocardial infarction*) y el FINESSE (*Facilitated intervention with enhanced reperfusion speed to stop events*), están evaluando la eficacia de la administración de abciximab o dosis bajas de trombolítico de forma temprana en pacientes con IAM remitidos para AP. Los resultados aportarán

más datos sobre si debemos administrar estos fármacos antes del traslado o durante el traslado a los pacientes con IAM derivados a otros centros para la realización de AP.

### Conclusiones

La AP es la mejor estrategia de reperfusión en el IAM, siempre que se realice en centros con personal entrenado e infraestructura adecuada. Sus beneficios, no obstante, no tienen por qué limitarse a los pacientes que ingresan en centros con AP, pues los pacientes que acuden inicialmente a centros sin AP pueden beneficiarse del traslado urgente a centros con programa de AP. Para ello es fundamental que exista una organización con los sistemas de transporte sanitario, según la cual se garantice que la AP puede iniciarse en los siguientes 90 minutos desde que se toma la decisión de trasladar al paciente. Los pacientes que probablemente se beneficien más de esta actitud son, además de los que tienen contraindicaciones para tratamiento trombolítico y aquellos con trombólisis fallida, los que tienen un tiempo de evolución de los síntomas superior a 3 horas.

Recepción: 4/8/2004 - Aprobación: 19/11/2004

Copyright © Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), 2004



Más información en [www.siicsalud.com](http://www.siicsalud.com):  
dirección de correspondencia, bibliografía,  
resumen, abstract, full text.

## El virus de hepatitis A: variabilidad y restricciones

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina



Artículo breve escrito por el autor para la edición en papel. El artículo amplio se publica en [www.siicsalud.com](http://www.siicsalud.com)



Viviana Andrea Mbayed, Columnista Experta de SIIC  
Investigadora y docente, Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Bs. As., Argentina

### Abstract

*Hepatitis A virus (HAV) is a hepatotropic agent that causes endemic infections in different regions of the world. The analysis of different strains has revealed the existence of a single antigenic type. However, the virus has shown genetic diversity, not only among different isolates –which group 7 genotypes– but also within a single isolate that exhibited a heterogeneous population. The analysis of such variability shows greater reliability when long regions of the genome are studied. The mechanisms responsible for the genomic variation involve point mutations due to errors of the viral polymerase and recombination among different strains, favoured by the co-circulation of different genotypes. It is herein sustained that, despite the antigenic variation, there exist structural constraints on the capsid proteins of HAV that allow the virus to preserve its antigenic structure without modifications. However, viral variants with modifications related to antigenic sites were found, either as part of the mixture of variants of a heterogeneous population or as the predominant sequence of a clinical isolate. The study of genomic variations, the evolutionary constraints and the mechanisms involved would contribute to predict the characteristics of future isolates and to define the sanitary control policies.*

El virus de hepatitis A (HAV) es un patógeno con tropismo hepático que causa infecciones endémicas en distintas regiones del mundo. La Argentina era considerada como un área de alta

### Resumen

El virus de hepatitis A (HAV) es un patógeno con tropismo hepático que causa infecciones endémicas en distintas regiones del mundo. Los estudios de distintas cepas determinaron la existencia de un único tipo antigénico. Sin embargo, el virus muestra diversidad genética, no sólo entre distintos aislamientos –que conforman 7 genotipos– sino también dentro de un único aislamiento, que exhibió heterogeneidad poblacional. El análisis de esa variabilidad reúne mayor confiabilidad frente a regiones extensas del genoma. Los mecanismos responsables de la variación genómica involucran mutaciones puntuales por errores de la polimerasa viral y recombinación entre virus distintos, favorecida por la cocirculación de diferentes genotipos. Se postula que, a pesar de la variación genética, existen limitaciones estructurales en las proteínas de cápside del HAV que le permiten mantener su estructura antigénica sin modificaciones. Sin embargo, se encontraron variantes virales con modificaciones vinculadas a sitios antigénicos, ya sea como parte de la mezcla de variantes de una población heterogénea o como secuencia predominante de un aislamiento clínico. El estudio de las variaciones genómicas, las restricciones evolutivas y los mecanismos involucrados podrían contribuir a predecir las características de futuros aislamientos y a definir las políticas sanitarias de control.

endemidad de estas infecciones<sup>1</sup> hasta que publicaciones más recientes<sup>2,3</sup> sugirieran un cambio en la situación epidemiológica, con un corrimiento hacia una clasificación de endemicidad inter-

media. Sin embargo, la información oficial del Ministerio de Salud de la Nación reveló un importante incremento en el número de casos de hepatitis A comunicados en el país durante 2003, con respecto al año anterior.<sup>4,5</sup>

Este virus pertenece a la familia Picornaviridae. Inicialmente y de manera provisional, en los comienzos de 1980 fue clasificado dentro del género *Enterovirus* debido a sus características biofísicas y bioquímicas. Posteriormente, el estudio más profundo reveló propiedades que lo distinguen de los enterovirus. En especial la caracterización genética y los análisis filogenéticos permitieron clasificarlo en un género independiente dentro de la familia, el de los hepatovirus. El virión contiene un genoma lineal de ARN de cadena simple, polaridad positiva, de aproximadamente 7.5 kb de largo. Como los otros genomas de la familia Picornaviridae, el del HAV se divide en tres partes: a) una región 5' no codificante covalentemente unida a la proteína viral VPg; b) un único marco de lectura abierto que codificaría todas las proteínas virales, con regiones designadas como P1—proteínas de cápside VP1, VP2, VP3 y VP4—, P2—proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C— y P3—proteínas no estructurales 3A, 3C y 3D y proteína VPg— y finalmente c) una región 3' no codificante seguida por un segmento de poli A.<sup>6</sup>

Los estudios antigénicos identificaron diferentes epitopes ubicados en las proteínas de cápside VP1 y VP3. Los análisis de neutralización de distintos aislamientos de este virus mostraron la existencia de un único tipo antigénico. Esta estabilidad antigénica es probablemente la responsable de la inmunidad de por vida que genera la infección natural, que previene de subsecuentes reinfecciones sintomáticas. Esto facilitó el desarrollo de vacunas que se utilizan en todo el mundo. Los estudios de seguimiento de las campañas de vacunación mostraron recientemente evidencias de memoria inmunológica, 12 años después de su administración en adultos.<sup>7</sup>

A pesar de la estabilidad antigénica este virus muestra diversidad genética, ya sea en la comparación entre distintos aislamientos como en el análisis de un único aislamiento.

En primer lugar, la comparación de aislamientos virales provenientes de distintas regiones del mundo se utilizó para definir 7 genotipos virales que incluyen 4 grupos de virus aislados en el hombre (genotipos I, II, III y VII) y 3 de origen simiano (genotipos IV, V y VI). Este trabajo inicial de Robertson y col.<sup>8</sup>—basado en las secuencias de nucleótidos de un segmento limitado del genoma: 168 nt de la unión entre VP1 y 2A— fue de gran utilidad para la epidemiología molecular del HAV al permitir la identificación de fuentes geográficas o epidemiológicas de aislamientos virales en muchos de los trabajos realizados posteriormente. Pero en un trabajo publicado en 2002,<sup>9</sup> nuestro grupo de investigación determinó que la robustez de los estudios filogenéticos sobre este virus se incrementa al extender la región genómica analizada a 248 nt. La confiabilidad de los análisis filogenéticos fue aun mayor cuando esta región fue reemplazada por 247 nt de la unión entre VP3 y VP1. Pero la mayor robustez en el estudio, evaluada mediante un análisis de *bootstrapping*, se logró al emplear conjuntamente las dos regiones, que sumaron en total 495 nt. Estudios posteriores<sup>10</sup> mostraron la necesidad de utilizar regiones extensas en la genotipificación porque, como se detalla más abajo, los resultados podrían estar seriamente comprometidos con un secuenciamiento limitado. Los estudios epidemiológicos que tengan como objetivo la identificación de fuentes o cadenas de transmisión no pueden basarse sólo en la determinación del genotipo, especialmente en áreas geográficas como la que nosotros hemos analizado, en la que sólo detectamos un único subgenotipo circulante. Dentro de ese subgenotipo se observó diversidad genética entre los aislamientos, con presencia de agrupamientos entre las secuencias más relacionadas. En estos casos el uso de secuencias limitadas del genoma no dio soporte estadístico a los agrupamientos. La confiabilidad de las asociaciones sólo se logró cuando se analizaron regiones genómicas de mayor tamaño.

En segundo lugar, el análisis intrapoblacional de muestras individuales puso en evidencia la heterogeneidad genética que exhiben poblaciones del HAV de muestras clínicas y de pasajes realizados *in vitro* a partir de virus purificado por plaqueo.<sup>11</sup> En ese estudio se analizaron, por una parte, muestras de pacientes vinculados a un brote alimentario de HAV y, por otra, virus cultivado en el laboratorio a partir de una cepa citopatogénica que fue clonada por plaqueo y sometida a pasajes sucesivos en cultivo. El análisis me-

dante clonado molecular y secuenciamiento mostró heterogeneidad entre diferentes secuencias genómicas en cada muestra.

Para comprender la fuente de la variabilidad genética detectada en este virus se debe recordar que se trata de un virus con genoma ARN. Los virus ARN se caracterizan en general por una elevada frecuencia de mutaciones, en el orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido.<sup>12</sup> Esto se asocia con los niveles de error en el copiado de la enzima viral, una ARN polimerasa dependiente de ARN, en ausencia de mecanismos de corrección. La elevada tasa de mutación en estos genomas tiene como consecuencia que las poblaciones virales se presenten como una mezcla heterogénea de variantes genómicas que difieren en sus secuencias en, por lo menos, un nucleótido. Esta composición heterogénea de las poblaciones virales fue demostrada en varios ARN virus y retrovirus. Originalmente, a esta distribución genómica viral se le aplicó la denominación de *cuasiespecies*,<sup>13-15</sup> pero otros autores consideran que se trata de poblaciones heterogéneas de mutantes que pueden abordarse con las herramientas de la genética poblacional sin recurrir al modelo de *cuasiespecies*.<sup>16,17</sup>

Además del mecanismo de las mutaciones puntuales, los virus ARN siguen otros procesos que les confieren variación genómica, como el intercambio de material genético por recombinación.<sup>18,19</sup> Estos intercambios genéticos se observaron también entre cepas de HAV. El proceso de recombinación que tiene lugar entre genomas de este virus se demostró mediante ensayos que involucran crecimiento de cepas o multiplicación de replicones de HAV en cultivo celular.<sup>20-22</sup> Trabajos recientes evidenciaron que estos procesos también se producen en poblaciones naturales de HAV, ya que se estableció la presencia de virus recombinante entre dos genotipos distintos (IB y VII) en una muestra clínica que no fue objeto de replicación *in vitro*.<sup>10</sup> El proceso de recombinación requiere la coinfección con más de una cepa del virus en un mismo individuo. La cocirculación de diferentes tipos virales en una misma región geográfica, que se está reportando con mayor frecuencia, tal vez refleje el mayor relevamiento de estas infecciones realizado a nivel mundial.<sup>23-27</sup> Más aun, la infección mixta de un mismo individuo—esencial para la recombinación—con dos cepas pertenecientes a los subgenotipos IA y IB fue comunicada por De Paula y col.<sup>28</sup> Este evento se ve favorecido por la alta endemicidad que las infecciones con HAV alcanzan en determinadas poblaciones alrededor del mundo.

La identificación por Costa Matioli y col.<sup>10</sup> del aislamiento 9F94 como recombinante sólo pudo realizarse a partir de la secuenciación de una extensa región genómica que comprendió las zonas codificantes de las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3. Es decir que, tal como proponíamos en un trabajo anterior,<sup>9</sup> los resultados de los análisis genéticos sobre el HAV resultan más robustos e informativos cuando se analiza una región genómica mayor que la inicialmente descrita para su genotipificación—168 nt de la unión VP1-2A—. La detección de recombinación en este virus pone un alerta sobre los estudios filogenéticos que se lleven a cabo, ya que la selección de la región genómica a analizar tendrá profunda influencia sobre los resultados obtenidos. Secuencias provenientes de distintos ancestros tendrán diferentes historias evolutivas.

Esta diversidad genética—que como ya dijimos se observa no sólo en estudios de tipo epidemiológico con la comparación de aislamientos provenientes de distintos individuos infectados sino también en el estudio de la infección de un único individuo—resulta sorprendente dada la gran estabilidad antigénica. El mantenimiento de la estructura antigénica sin modificaciones, sus causas y mecanismos despertaron el interés de distintos investigadores.

En ese sentido, Sánchez y col.<sup>29</sup> sostienen que existen limitaciones estructurales en las proteínas de cápside del HAV. Se basan en la observación de menores frecuencias de mutaciones no sinónimas en HAV que en otros picornavirus tales como FMDV y PV-1. En un trabajo posterior<sup>11</sup> estos autores señalan que la región codificante de VP1 analizada mostró mayor limitación en la variación a nivel aminoacídico que VP3. Durante los últimos años la comparación de las frecuencias de cambios sinónimos y no sinónimos se utilizó como herramienta para la detección de presiones selectivas y adaptación. Cuando un reemplazo aminoacídico ofrece una ventaja selectiva, la sustitución nucleotídica que lo origina se fija en mayor proporción que una sinónima; en cambio, si el aminoácido es deletéreo la selección purificadora reduci-

rá su fijación.<sup>30</sup> Las menores frecuencias de mutaciones no sinónimas en HAV parecen indicar por lo tanto que una fuerte selección negativa opera sobre el patrón de estas sustituciones, especialmente en VP1, evitando así que se produzcan ciertos reemplazos aminoacídicos. La existencia de fuertes restricciones evolutivas implicaría que la mayor parte de las mutaciones resultarían deletéreas y que por lo tanto sólo pocos patrones de cambio fueran experimentados. En estos casos, serían esperables altos niveles de evolución convergente o paralela.<sup>31</sup>

Dada esta mayor frecuencia de mutaciones sinónimas del HAV frente a otros virus y considerando que tales mutaciones pueden estar relacionadas con el uso diferencial de codones, algunos investigadores analizaron los codones utilizados por este virus. Así se determinó el empleo profuso de codones raros—definidos como aquellos con abundancia menor del 30% que el codón sinónimo más abundante—en localizaciones estratégicas.<sup>29</sup> Se postula que el uso de codones raros podría contribuir a mantener la estructura del ARN y de las proteínas, reduciéndose de esta manera su variabilidad. Estos y otros autores<sup>32</sup> demostraron que el HAV tiene un desvío en el uso de codones que es mayor que en otros virus ARN, es decir que muestra una preferencia por ciertos codones sobre otros sinónimos. Se sabe que diferentes codones sinónimos son usados con diferente frecuencia en distintos organismos, diferentes tejidos y aun en distintos genes, lo que contribuye al control traduccional de la expresión génica. Se argumenta que ciertos codones son favorables para una traducción eficiente y por lo tanto menos propensos al reemplazo durante la evolución. Consecuentemente, regiones genómicas con abundancia en tales codones estarían sometidas a reemplazos nucleotídicos menos frecuentes.<sup>33</sup>

A pesar de estas restricciones estructurales se describieron cambios no sinónimos vinculados con sitios antigénicos. Por un lado, algunos de los clones de las poblaciones analizadas por Sánchez y col.<sup>11</sup> mostraron sustituciones asociadas a sitios antigénicos previamente descritos en VP3. Cabe mencionar que estas mutantes estaban presentes aun cuando la secuencia consenso de la población se mantenía sin modificaciones. Esto parece indicar que un reservorio de variantes podría existir en las poblaciones virales a pesar de la conservación antigénica del consenso. También sorprende el hallazgo de una cepa viral, proveniente de un paciente infectado, que tiene una delección de 45 nt (15 aa) en la región codificante de VP1, que involucra algunos aminoácidos que fueron descritos previamente como parte de sitios inmunodominantes.<sup>34</sup>

Se buscaron también otras características fenotípicas que pudieran correlacionarse con los cambios genotípicos. Distintos trabajos investigaron la existencia de una asociación entre la gravedad de la infección y las secuencias virales. La comparación de secuencias de genoma completo de cepas causantes de hepatitis fulminante con las de hepatitis autolimitadas (todas pertenecientes al genotipo IA) no encontró sustituciones nucleotídicas o aminoacídicas que se correlacionaran con las distintas formas de enfermedad.<sup>35</sup> Sin embargo, otro grupo de investigación informó correlación significativa entre hepatitis fulminante y genotipo viral distinto del IA.<sup>36</sup> Posteriormente, Fujiwara y col.<sup>37</sup> comunicaron el hallazgo de un menor número de variaciones en la región 5' no

codificante de virus aislado desde pacientes con hepatitis fulminante cuando fueron comparados con aislamientos de pacientes con hepatitis grave y no grave. Por otro lado, no encontraron correlación entre la secuencia de los 168 nt de la unión VP1-2A de aislamientos clínicos y la gravedad de la enfermedad hepática.<sup>38</sup> La asociación entre las secuencias nucleotídicas y las características de la enfermedad clínica es un tema controvertido. Debe recordarse que la participación de la respuesta inmune del huésped es importante en el mecanismo de patogenia de estas infecciones.<sup>6</sup>

Durante los últimos años el desarrollo de técnicas moleculares benefició el avance en el conocimiento de la epidemiología molecular del HAV y, más recientemente, en el comportamiento evolutivo de su genoma y proteínas. Se ha hecho evidente que, a pesar de su estabilidad antigénica, existen distintos mecanismos—mutaciones puntuales con generación de heterogeneidad poblacional y recombinación entre genotipos distintos—por los que el genoma viral no permanece estable, sino que por el contrario es objeto de múltiples modificaciones. El análisis de las estrategias que le permiten conservar su estructura antigénica a pesar de su variación nucleotídica resulta importante porque en esta conservación se basa la existencia de un único serotipo y la prevención mediante vacunación con inmunógenos de distintos subgenotipos. El estudio de las restricciones evolutivas y de sus mecanismos podría contribuir a predecir las características y el comportamiento de futuros aislamientos y a definir las políticas sanitarias de control. Esto impulsa los estudios moleculares que tiendan a describir con mayor acercamiento las poblaciones del HAV. El análisis más profundo y amplio de sus características genéticas y de su relación con el huésped facilitará también la comprensión de las diferentes manifestaciones patogénicas que tiene este virus.

Recepción: 10/5/04 - Aprobación: 25/10/04

Copyright © Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), 2004

#### Bibliografía

- González J, Fay O, Canero-Velasco MC et al. Hepatitis A virus infection in children in Argentina: a pilot study. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1997;27:331-334.
- Tapia-Conyer R, Santos JI, Cavalcanti AM et al. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *Am J Trop Hyg* 1999;61:825-829.
- Tanaka J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 2000;18S:57-60.
- Boletín semanal de notificaciones. Año 2002. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud. República Argentina.
- Boletín semanal de notificaciones. Año 2003. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud. República Argentina.



Más información en [www.siicsalud.com](http://www.siicsalud.com):  
dirección de correspondencia, bibliografía  
completa, *full text* y patrocinio.

## Deseo recibir Salud(i)Ciencia

Autorizo a que se debite de mi tarjeta de crédito el importe de \$72, correspondiente al precio y gastos de envío de 6 ejemplares.

Tarjeta de Crédito  Tarjeta de Crédito N°  Código de seguridad

Nombre  Edad  Matrícula N°   
Dirección profesional  Teléfono   
Domicilio particular  Localidad   
Provincia/estado  CP  País

Firma del Titular

Aclaración de Firma

• Tel.: (54 11) 4342-4901 • Fax: (54 11) 4331-3305 • e-mail: [admiedit@siicsalud.com](mailto:admiedit@siicsalud.com) • Dirección postal: SIIC, Casilla de Correo 2568, C1000WAZ Correo Central, Bs. As., Argentina.