

REVIEW: EVIDENCIAS DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS C DE LA HEPATITIS EN BIOPSIAS HEPÁTICAS DETECTADAS POR LA MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA

¹Viviana Falcón, ¹Nelson Acosta-Rivero, ⁴Mineko Shibayama, ¹Ivón Menéndez, ¹María-C de la Rosa, ²Bienvenido Gra, ¹Santiago Dueñas-Carrera, ²Waldo García, ²Eduardo Vilar, ¹Jose Silva, ¹Deliana Lopez, ³Maritza González-Bravo, ³Emilio Felino Acosta, Jesús Seoane, ¹Juan Morales, ⁴Juan Kouri y ⁴Victor Tsutsumi

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba

²Instituto de Gastroenterología, C.P. 10400, Habana. ³Escuela Latinoamérica de Medicina, Habana, Cuba

⁴Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), México.

*Autor de Correspondencia: Dra. viviana.falcon@cigb.edu.cu

RESUMEN

La infección por el virus C de la hepatitis (VCH) representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. Este trabajo es una revisión sobre las lesiones morfológicas que se detectan en el hígado con infección crónica por el VCH. Las lesiones celulares en la hepatitis crónica causada por el VCH no son específicas pero existen rasgos histológicos que son característicos de esta. Estos consisten en la formación de folículos linfoides en los espacios porta, daño de los conductos biliares, y esteatosis micro- o macrogotular en los hepatocitos. En la mayoría de los estudios se demuestra la presencia de los antígenos y ARN del VCH en el citoplasma de los hepatocitos infectados, aunque la proteína de la cápsida también se localiza en el núcleo. Por otro lado, la microscopía electrónica ha revelado la presencia de hepatocitos balonados con dilatación del retículo endoplasmático y la mitocondria, y la presencia de un gran número de citolisosomas, cuerpos lamelares y grandes gotas de lípidos. También se observan con frecuencia alteraciones del núcleo y del nucleolo. Varios estudios muestran la presencia de partículas semejantes a virus (PSV) envueltas con diámetros entre 30 y 65 nm en el citoplasma y en vesículas de los hepatocitos. Además, se detectan PSV semejantes a nucleocápsidas virales con diámetros entre 20-30 nm en el citoplasma y/o el núcleo de los hepatocitos. Estos datos indican que los estudios de microscopía constituyen una herramienta poderosa para dilucidar algunos de los mecanismos implicados en la replicación del VCH y su patogénesis.

Palabras claves: HCV, VCH, cápsida, partículas semejantes a virus, VLP, PSV, microscopía electrónica de transmisión, microscopía óptica.

REVIEW: LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY EVIDENCES OF HEPATIC C VIRUS INFECTION IN LIVER BIOPSIES

SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) infection represents a major problem of public health worldwide. In the present study, an attempt was made to review data on morphological lesions in the liver in the course of chronic type C hepatitis. Cell lesions detected by light microscopy show characteristic, although not pathognomonic histological changes. These consist of lymphoid aggregates in portal tracts, sometimes with germinal centers, damage of bile duct epithelium, and micro- or macrovesicular steatosis of hepatocytes. In most studies, HCV antigens are demonstrable in the cytoplasm of infected hepatocytes by immunohistochemical staining although some reports indicate a nuclear localization, especially of core protein. Detection of HCV RNA sequences in fixed liver tissues by in situ hybridization appears to be a more sensitive method than immunohistochemical staining. Severe ultrastructural cell damage typical of acute viral hepatitis has been observed at electron microscope level. This includes ballooning hepatocytes with dilatation of the endoplasmic reticulum and mitochondria, and the presence of a large number of cytolysosomes, lamellar bodies and large lipid droplets. Alterations of nuclei and nucleoli were also frequent. Enveloped virus-like particles (VLPs) with average diameters between 30-65 nm have been observed in the cytoplasm and inside cytoplasmic vesicles. In addition, VLPs resembling nucleocapsids with 20-30 nm in diameter have been detected in the cytoplasm and/or in the nuclei of hepatocytes. Data indicate that microscopy studies might be powerful tools to elucidate some of the mechanisms involved in HCV replication and pathogenesis.

Keywords: core protein, virus-like particles, transmission electron microscopy, light microscopy.

INTRODUCCIÓN

La infección crónica por el virus C de la hepatitis (VCH) puede ocasionar una amplia variedad de problemas clínicos y pronósticos en diverso grado, así como la progresión de la enfermedad, que oscila de hepatitis mínima a grave hasta cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) en algunas personas [1;2]. Los pacientes con infección crónica por el VCH pueden desarrollar compromiso hepático progresivo. Este proceso empieza con la inflamación persistente, lesiones en las vías biliares y puede proceder a esteatosis hepática (hígado graso), a fibrosis (desarrollo de tejido fibroso), y a cirrosis (cicatrices) del hígado. Cuando las células hepáticas normales son remplazadas por grasa, tejido fibroso, y cicatrices, resultan incapaces de llevar a cabo sus funciones metabólicas, la producción de proteínas y la eliminación de toxinas del cuerpo [3-5]. Tras el diagnóstico de la infección crónica por el VCH, es importante establecer la gravedad de la afectación hepática. El mejor método disponible hoy en día para valorarla es la biopsia hepática. Esta es cara y se asocia con alguna morbilidad. No obstante, es considerada el patrón de referencia para la evaluación de pacientes con hepatitis crónica [2].

Durante las últimas décadas el considerable desarrollo de los métodos para el análisis ultraestructural y la detección específica de componentes particulares utilizando la microscopía electrónica de transmisión (MET), ha provisto al estudio de patógenos microbianos en el medio ambiente celular con una adecuada herramienta de laboratorio [6;7]. El propósito de esta revisión es describir las características morfológicas de la lesión hepática que tienen lugar durante la infección por el VCH.

Lesiones Morfológicas detectadas por Microscopia óptica en la hepatitis crónica de tipo C

Las lesiones en el hígado infectado con el VCH se asemejan a las observadas en otros tipos de hepatitis

virales crónicas, como la hepatitis crónica de tipo B. La afectación hepatocitaria en la hepatitis crónica (HC) causada por el VCH (HCC) en estadios precoces es leve con ligera inflamación linfocitaria en forma de agregados o folículos linfoides, leve necrosis periportal, escasa apoptosis intraacinar y ligero infiltrado inflamatorio lobulillar [5;8]. El CHC en pacientes infectados con el VCH suele desarrollarse sobre un hígado cirrótico existiendo pocos casos sin cirrosis previa [9].

Los hallazgos histológicos en la HCC presentan rasgos histológicos que ayudan a diferenciarlos de otros tipos de hepatitis crónicas. Las alteraciones hepatocitarias incluyen degeneración acidofílica, cuerpos apoptóticos y degeneración balonizante con o sin cuerpos de Mallory [9]. El infiltrado inflamatorio portal que se observa en el hígado de los pacientes con HCC contiene fundamentalmente monocitos y linfocitos que tienden a formar folículos linfoides [9;10]. También se describen células dendríticas acompañando a este infiltrado linfoide [11]. Los sinusoides pueden estar infiltrados focal o difusamente por linfocitos [9]. Asociado al infiltrado inflamatorio portal puede existir daño de los conductos biliares. En estos, se observa estratificación, vacuolización, eosinofilia y degeneración nuclear del epitelio o infiltración de la pared del conducto por los linfocitos [12;13].

Se puede observar transformación de los hepatocitos en células gigantes con un gran número de núcleos celulares, alteraciones en su estructura y presencia de numerosos nucleolos [14]. Otro hallazgo histológico es la esteatosis macrogotular, más frecuente que en otras formas de hepatitis virales [12;15]. También pueden encontrarse granulomas epitelioides de localización portal o intraacinar en algunos pacientes [16;17].

Por otro lado, los bajos títulos virales presentes en las células infectadas por el VCH dificulta la detección de las proteínas virales mediante las técnicas de inmunohistoquímica. También, se dificulta la detección del ARN viral mediante la técnica de reacción en cadena

de la polimerasa (RCP) o técnicas de hibridación “in situ” [18]. Las proteínas de la envoltura (E1,E2) y las proteínas no estructurales (NS2-NS5) se detectan en el citoplasma de las células infectadas en la mayoría de los casos [19-23]. Por el contrario, la localización de la proteína de la cápsida (C) es un tema controversial. La proteína C se localiza fundamentalmente en el citoplasma, aunque la forma madura de C se puede detectar en el núcleo y el citoplasma [20;23-25].

La detección del ARN del VCH mediante la técnica de hibridación in situ tiene la limitación del bajo número de copias de las moléculas del ARN viral presentes en las biopsias de hígado embebidas en parafina [23;26]. Por esto, los investigadores prefieren detectar el ARN del VCH en biopsias de hígado frescas congeladas utilizando sistemas de amplificación de señales [20;23;27]. No obstante, los datos recientes indican que incluso los especímenes procesados con parafina pueden ser utilizados para detectar el ARN del VCH [19]. En este caso se utiliza la técnica de transcripción reversa (TR)-RCP in situ que demostró que puede detectar el ácido nucleico viral en el tejido hepático de diversas fuentes de pacientes. Estas incluyen aquellos pacientes donde no se detecta el ARN viral en el suero. La ventaja de este sistema sobre las pruebas que se desarrollan en tejido congelado, es en primer lugar que el tejido procesado carece de infectividad. En segundo lugar, estas muestras tienen el antecedente de la evaluación histológica. Esto permite excluir otras enfermedades y el tejido que no sea representativo de la muestra hepática.

La utilización de técnicas hibridocitoquímicas y sus variantes (p.e., TR-RCP in situ) indican la prevalencia de la localización citoplasmática del ARN del VCH [20;23;28-30]. También hay datos que refieren la prevalencia de señales específicas del ARN viral en el núcleo de hepatocitos, en células del conducto biliar y en linfocitos [31].

Lesiones Morfológicas detectadas por Microscopia Electrónica en la hepatitis crónica de tipo C

Los patrones ultraestructurales de la afectación hepatocitaria en la HCC se observan tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células infectadas. Estos incluyen la identificación de hepatocitos balonados, con dilatación del retículo endoplasmático (RE), de las mitocondrias (Figura 1B), y con desprendimiento de la envoltura nuclear (Figura 1C), así como linfocitos en contacto estrecho con los hepatocitos [32-34]. En algunos casos se observó la presencia de varios núcleos celulares en los hepatocitos, con envoltura nuclear irregular y engrosamiento de su contorno [35;36].

También se observó la lobulización del núcleo y la presencia de inclusiones citoplasmáticas (Figura 1F) [33;36].

Otros estudios detectaron una tendencia a formar sistemas que se asemejan a la heterocromatina, que incluyen sistemas de túbulos superpuestos entre 20 y 30 nm de diámetro [36-38]. No obstante, algunos autores consideran que estas alteraciones tubulares no muestran relación con el material genético viral y no son típicos de la infección por el VCH [38].

Las lesiones citoplasmáticas comprenden la presencia de un gran número de citolisosomas (figura 1D) y de cuerpos laminares (Figura 1E) [33;34]. Otras alteraciones observadas incluyeron la dilatación de numerosas cisternas del RE, la presencia de gotas grandes de lípidos y cuerpos cristaloides en el citoplasma [14;24;33;39]. Además, se observaron estructuras tubulares en el RE, y forma semicircular del RE [33;40]. Las lesiones ultraestructurales también se detectan en la mitocondria de los hepatocitos [14;33;41]. En general se observa destrucción de la membrana mitocondrial, que en ocasiones pierden su estructura de bicapa [33;41;42]. También se observan partículas semejantes a virus (PSVs) y cuerpos cristaloides en las mitocondrias [14;24;41;43;44].

Las alteraciones ultraestructurales típicas de la apoptosis son frecuentes en los hepatocitos de los pacientes con HCC [24;39]. Entre éstas se destacan la disminución de tamaño de algunos hepatocitos y la presencia de núcleos apoptóticos que se caracterizan por la condensación de la cromatina. En el citoplasma de algunos hepatocitos se ha

detectado la presencia de fragmentos nucleares. También se observaron cuerpos apoptóticos (CA) libres entre los hepatocitos. Estos CA generalmente son fagocitados por las células circundantes como los hepatocitos, las células Kupffer (CK) y las células sinusoidales endoteliales (CSE) [24].

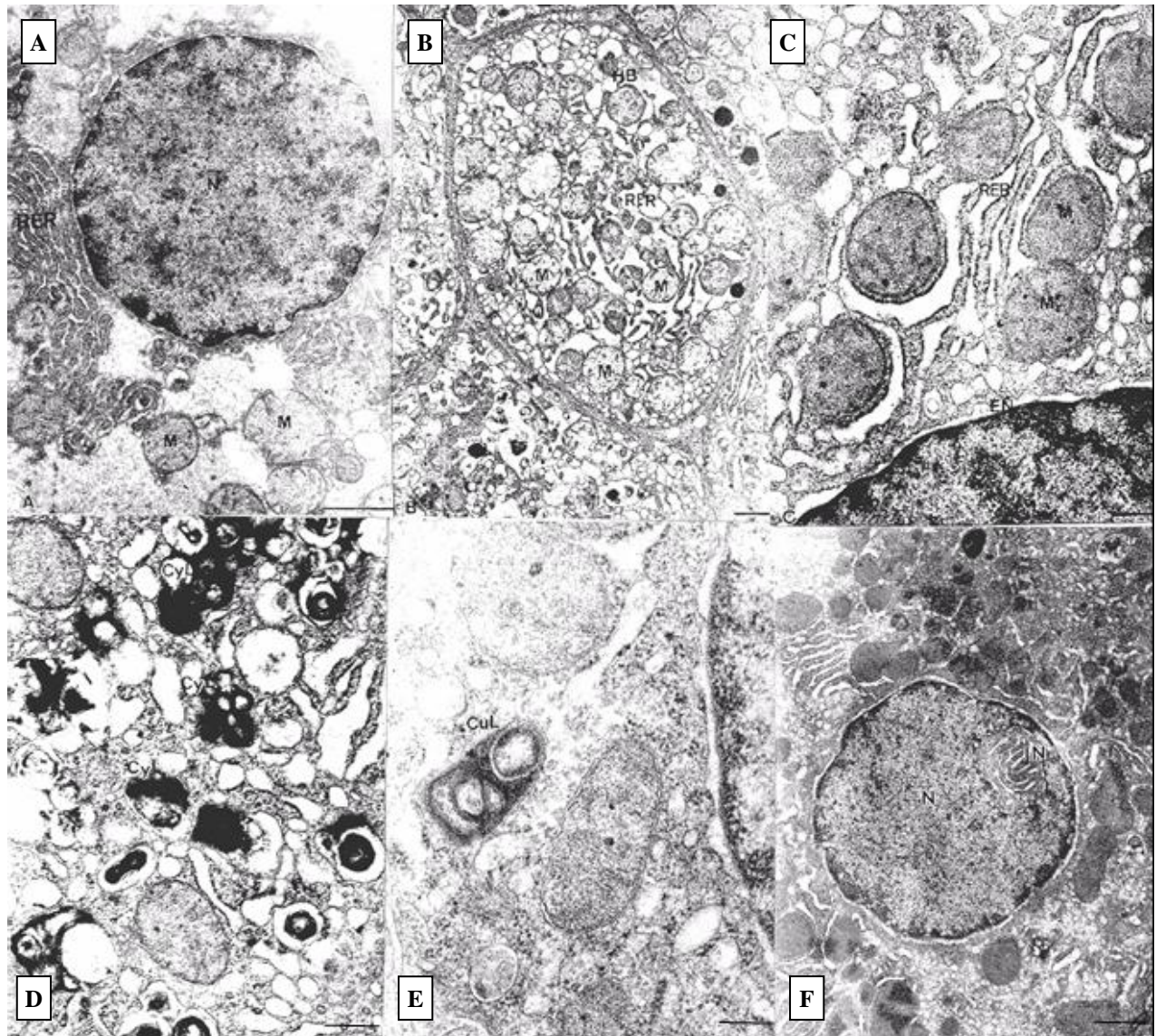


Fig. 1. MET de biopsias hepáticas. A: Biopsia hepática de una persona sana. El núcleo (N), las mitocondrias (M) y el RER se observan sin alteración. B: Las biopsias hepáticas de los pacientes infectados con el VCH mostraron daños a nivel ultraestructural como son: hepatocitos balonados (HB), con dilatación del RER y mitocondrias (M).

C: Parte de un hepatocito balonado con dilatación del RER, las mitocondrias (M) y desprendimiento de la envoltura nuclear (EN). D: La presencia de un gran número de citolisosomas (Cy). E: Un cuerpo laminar (CuL) en el citoplasma de parte de un hepatocito. F: Inclusiones nucleares (IN)

(Barra = 1 μ m en A, B y F; 500 nm en C y D; 200 nm en E).

Diferentes trabajos reportaron la presencia de PSVs o sus agregados en el citoplasma o en el RE de las células infectadas con el VCH [33;40;45-52] (Tabla I). PSVs simples envueltas (con membrana), con diámetros entre 30 nm y 65 nm se observaron en el citoplasma o en el RE de los hepatocitos (Figuras 2B, 2C y 2E) [33;47;51]. También se detectaron partículas simples envueltas con diámetros entre 40 nm y 65 nm dentro de vesículas citoplasmáticas (Figura 2D) [33;40;46;50;52]. Otra observación fue la presencia de PSVs no envueltas (sin membrana) con un diámetro promedio de 20 nm (Figura 2F) formando agregados de PSVs en el citoplasma de los hepatocitos y de las células estrelladas (CE) [33;45;49]. Es importante destacar que también se ha detectado la presencia de PSVs no envueltas entre 20–30 nm de diámetro en el núcleo de los hepatocitos [48].

Estudios de inmunomicroscopía electrónica (IME) identificaron a las proteínas del VCH en biopsias hepáticas con el uso de anticuerpos monoclonales (AcM) y policlonales [22;33;49;53-55]. La mayoría de los estudios ultraestructurales que utilizan técnicas

inmunocitoquímicas en varios modelos de investigación demostraron la localización citoplasmática de las proteínas del VCH. Las proteínas de la envoltura E1 y E2, y las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4 y NS5 se detectaron en el RE [33;51;56;57], en el citoplasma [33;43;56] o en el área perinuclear [22].

La proteína C se localiza generalmente en el citoplasma de los hepatocitos asociada a las membranas del RE rugoso (RER) (Figura 3B) y a gotas de lípidos [33;53;58;59]. También se localiza de forma esporádica en el núcleo y en la mitocondria [24;43;48;59;60]. Resulta interesante destacar que la proteína C del VCH se detectó en células extraparenquimatosas del hígado [49]. La proteína C se localizó en el citoplasma y el núcleo de CE, y en células semejantes a miofibroblastos (MFB) en biopsias hepáticas de pacientes infectados por el VCH (Figura 4D,F). Esta proteína también se localizó sobre la superficie de las gotas de lípido en las CE y de estructuras semejantes a las fibras de colágeno (FC) en la matriz extracelular (MEC) de biopsias hepáticas de los pacientes con HCC (Figura 4B,F).

Tabla 1. Detección de partículas semejantes a virus (PSV) en el hígado o en células de cultivo infectados con el VCH.

Observaciones ME	Tipo de Célula infectada	Autor
PSVs en vesículas citoplasmáticas: diámetro de 40-45 nm diámetro de 50 nm diámetro de 50-60 nm diámetro de 65 nm	Hepatocitos humanos fetales Células TOFE Hepatocitos humanos Células Daudi y hepatocitos de chimpancés Células HepG2 Hepatocitos humanos	Iacovacci y col. [50] Serafino y col.[40] Bosman y col. [45] Shimizu y col. [52] Dash y col. [46] Falcón y col. [33]
PSVs en citoplasma o RE: diámetro de 30-55 nm diámetro de 45 nm diámetro de 20 nm	Hepatocitos humanos Celulas HeLaG Hepatocitos humanos Células estrelladas humanas	Falcón y col. [33] Mizuno y col. [51]] Falcón y col. [33], Bosman y col. [45] Falcón y col. [49]
PSVs en núcleo	Hepatocitos humanos	Falcón y col. [48]

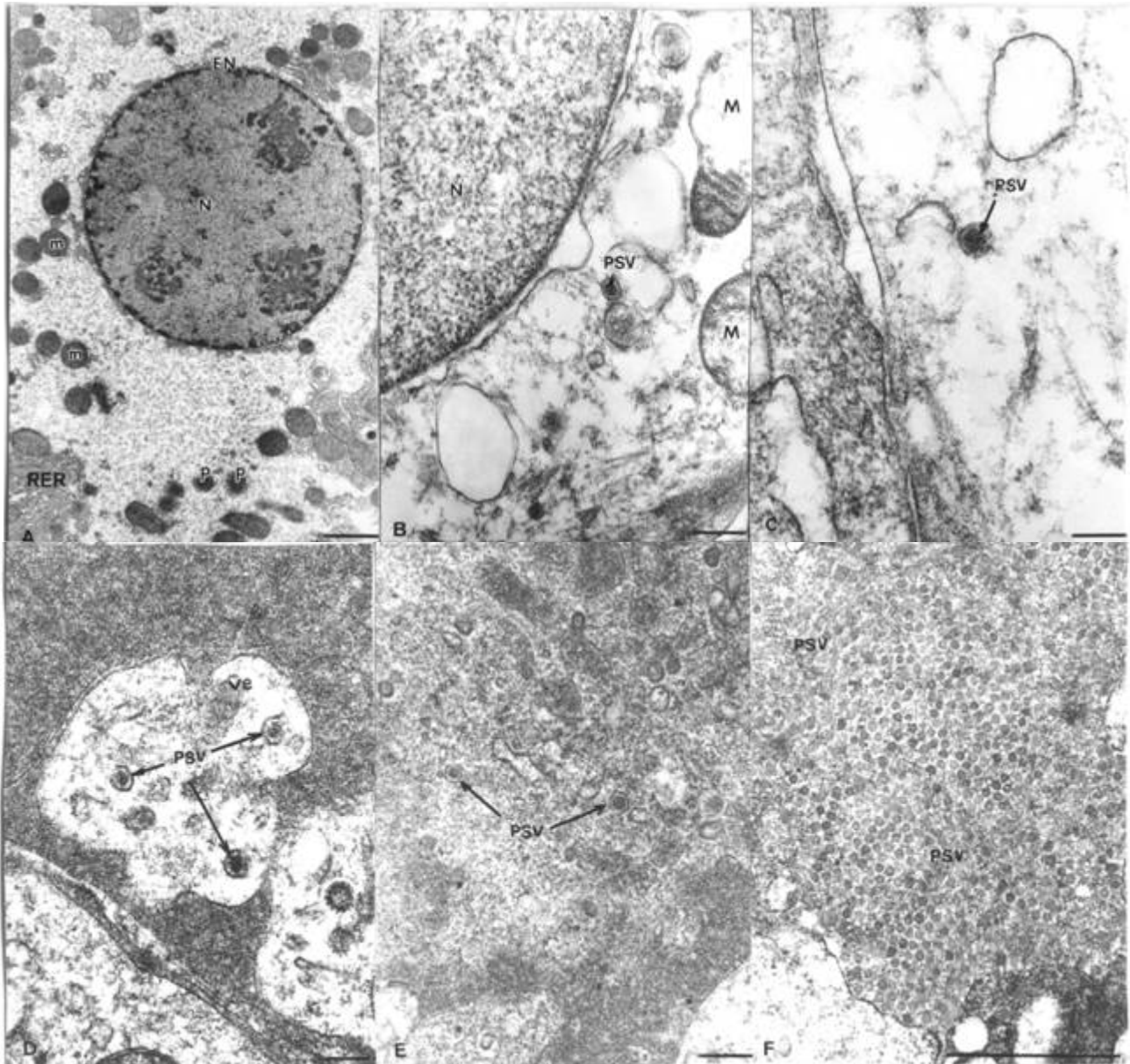


Figura 2. MET de biopsias hepáticas. A: Biopsia hepática de una persona sana. No se observan PSV, ni daño a nivel ultraestructural, se señala el núcleo (N), la envoltura nuclear (EN), el retículo endoplasmático rugoso (RER), peroxisomas (P) y mitocondrias (M). B-F: Biopsias hepáticas de pacientes infectados con el VHC. B y C: Simples PSV envueltas, de aproximadamente 65 nm de diámetro en el citoplasma de los hepatocitos. El núcleo se señala como (N) y las mitocondrias como (M), detectándose en estas últimas la pérdida de las crestas mitocondriales. D: Simples partículas envueltas de 65 nm dentro de vesículas citoplasmáticas (Ve). E: PSV envueltas con un diámetro entre 30 a 55 nm en el citoplasma de los hepatocitos. F: PSV no envueltas con un diámetro aproximadamente de 30 nm, estas partículas formaban agregados tipo cuerpos cristaloides en el citoplasma de los hepatocitos (Barra = 2 μ m en A; 200 nm en B, C, D y F; 500 nm en E).

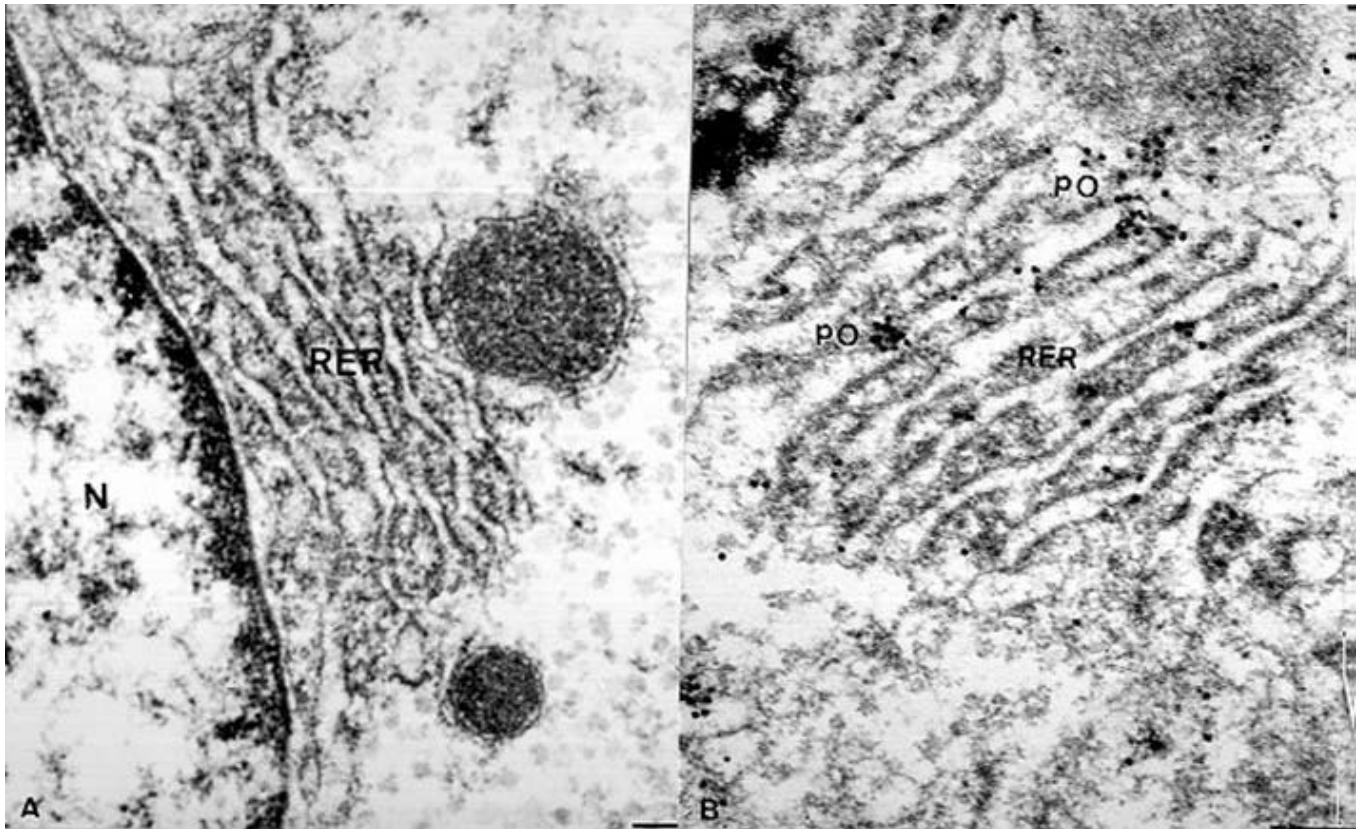


Figura 3. IME de biopsias hepáticas. A: Biopsia hepática de persona sana. No hubo marcaje de los polipéptidos del core del VHC en el citoplasma ni en la membrana del RER en los hepatocitos de una persona sana. B: Se observaron polipéptidos del core en el citoplasma y en la membrana del RER de un paciente infectado con el VHC, se señalan las partículas de oro coloidal como PO. En todos los casos se usó el AcM CBSS–HepC.1 y el oro-IgG anti-ratón (Barra =500 nm en A y 200 nm en B).

Las moléculas virales se detectaron en el citoplasma de los hepatocitos infectados. Estos resultados son consistentes con lo observado utilizando la microscopía óptica. En resumen, las evidencias microscópicas de la lesión hepática causada por el VCH demuestran la presencia daño hepático causado por el sistema inmune o

directamente por el VCH. También se observan estructuras relacionadas con la replicación del VCH en el citoplasma de los hepatocitos y sugieren la posibilidad de que al menos una parte de la morfogénesis del virión ocurra en vesículas citoplásmicas.

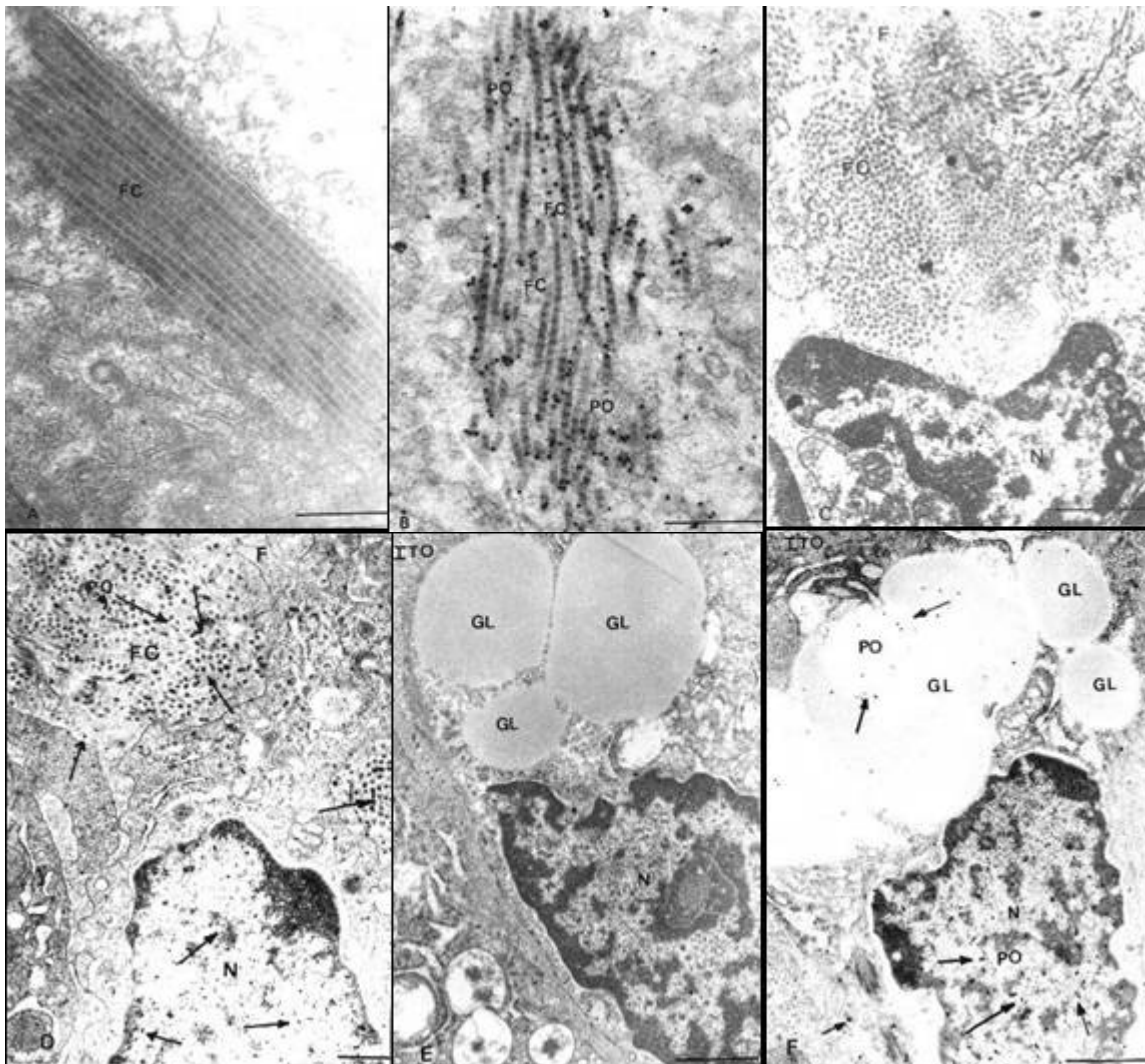


Figura 4. IME de biopsias hepáticas. A: En las fibras colágenas (FC) de una biopsia hepática de una persona sana no se observaron los polipéptidos del core del VHC. B: Se identificaron polipéptidos del core en las FC de un paciente., se señalan las partículas de oro como PO. C: Biopsia hepática de una persona sana. En las células semejantes a fibroblastos (F) no se observaron los polipéptidos del core del VHC, FC (fibras colágenas) y N (núcleo). D: Se identificaron polipéptidos del core del VHC sobre células semejantes a fibroblastos de pacientes (F), se señalan con flechas las partículas de oro coloidal (PO) y con N (núcleo). E: En las células estrelladas (Ito) de una persona sana no se observaron los polipéptidos del core del VHC, GL (gotas de lípido) y N (núcleo). F: Se identificaron polipéptidos del core del VHC sobre las células estrelladas de un paciente, se señalan con flechas las partículas de oro coloidal (PO), GL (gotas de lípido) y N (núcleo). En todas las muestras se empleó el AcM CBSS-HepC.1 y el oro-IgG anti-ratón (*Barra = 1 μ m en C, E y F; 500 nm en A, B y D*).

REFERENCIAS

- [1] Alter, M.J., Margolis, H.S., Krawczynski, K., Judson, F.N., Mares, A., Alexander, W.J., Hu, P.Y., Miller, J.K., Gerber, M.A., & Sampliner, R.E. (1992) "The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team". *N. Engl. J. Med.*, 327, 1899-1905.
- [2] Gebo, K.A. & Bartlett, J.G. (2002) "Management of hepatitis C: a review of the NIH Consensus Development Conference". *Hopkins. HIV. Rep.*, 14, suppl-iv.

- [3] Gerber, M.A., Krawczynski, K., Alter, M.J., Sampliner, R.E., & Margolis, H.S. (1992) "Histopathology of community acquired chronic hepatitis C. The Sentinel Counties Chronic Non-A, Non-B Hepatitis Study Team". *Mod. Pathol.*, 5, 483-486.
- [4] Gerber, M.A. (1995) "Pathobiologic effects of hepatitis C". *J. Hepatol.*, 22, 83-86.
- [5] Morales, T.G., Sampliner, R.E., Bhattacharyya, A., & Alter, M.J. (1995) "Liver histology in anti-HCV-positive persons with normal or minimally elevated aminotransferases". *J. Clin. Gastroenterol.*, 21, 301-305.
- [6] Carrascosa, J.L. (1986) "Bacteriophage morphogenesis". *Electron microscopy of proteins*, Vol. 5. Harris J. R y Horner R. W. (eds). Academic Press. London, 37-70.
- [7] Risco, C. & Pinto da Silva, P. (1995) "Cellular functions during activation and damaged by pathogens: immunogold studies on the interaction of bacterial endotoxins with target cells" *Microsc. Res. Tech*, 31, 141-158.
- [8] Goodman, Z.D. & Ishak, K.G. (1995) "Histopathology of hepatitis C virus infection" *Semin. Liver Dis.*, 15, 70-81.
- [9] Dhillon, A.P. & Dusheiko, G.M. (1995) "Pathology of hepatitis C virus infection". *Histopathology*, 26, 297-309.
- [10] Gerber, M.A. (1994) "Pathology of hepatitis C". *FEMS Microbiol. Rev.*, 14, 205-210.
- [11] Galle, M.B., De Franco, R.M., Kerjaschki, D., Romanelli, R.G., Montalto, P., Gentilini, P., Pinzani, M., & Romagnoli, P. (2001) "Ordered array of dendritic cells and CD8+ lymphocytes in portal infiltrates in chronic hepatitis C". *Histopathology*, 39, 373-381.
- [12] Gerber, M.A. (1995) "Pathobiology of hepatitis C". *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, 79:162-70., 162-170.
- [13] Goldin, R.D., Patel, N.K., & Thomas, H.C. (1996) "Hepatitis C and bile duct loss". *J. Clin. Pathol.*, 49, 836-838.
- [14] Kasprzak, A., Biczysko, W., Adamek, A., Zabel, M., & Surdyk-Zasada, J. (2001) "Correlation of morphological alterations of light and electron microscopy in chronic type B and C hepatitis". *Med. Sci. Monit.*, 7 Suppl 1:138-46., 138-146.
- [15] Rubbia-Brandt, L., Leandro, G., Spahr, L., Giostra, E., Quadri, R., Male, P.J., & Negro, F. (2001) "Liver steatosis in chronic hepatitis C: a morphological sign suggesting infection with HCV genotype 3". *Histopathology*, 39, 119-124.
- [16] Goldin, R.D., Levine, T.S., Foster, G.R., & Thomas, H.C. (1996) "Granulomas and hepatitis C". *Histopathology*, 28, 265-267.
- [17] Harada, K., Minato, H., Hiramatsu, K., & Nakanuma, Y. (1998) Epithelioid cell granulomas in chronic hepatitis C: immunohistochemical character and histological marker of favourable response to interferon-alpha therapy. *Histopathology*, 33, 216-221.
- [18] Chu, H.W., Dash, S., & Gerber, M.A. (1994) "Genomic and replicative hepatitis C virus RNA sequences and histologic activity in chronic hepatitis C". *Hum. Pathol.*, 25, 160-163.
- [19] Dries, V., von, B., I, Muller, M., Gerken, G., Schirmacher, P., Odenthal, M., Bartenschlager, R., Drebber, U., Meyer zum Buschenfeld, K.H., & Dienes, H.P. (1999) "Detection of hepatitis C virus in paraffin-embedded liver biopsies of patients negative for viral RNA in serum". *Hepatology*, 29, 223-229.
- [20] Falcón, V., Acosta-Rivero, N., Shibayama, M., Luna-Munoz, J., Miranda-Sanchez, M., de la Rosa M-C, Menéndez, I., Gra, V., Dueñas-Carrera, S., García, G., Vilar, E., Silva, J., Lopez, D., González-Bravo, M., Fernández-Ortega, C., Casillas, D., Morales, J., Kouri, J., & Tsutsumi, V. (2005) "Evidences of

- hepatitis C virus replication in hepatocytes and peripheral blood mononuclear cells from patients negative for viral RNA in serum". *Am J Infect Dis*, 1, 34-42.
- [21] Gonzalez-Peralta, R.P., Fang, J.W., Davis, G.L., Gish, R., Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, M., Mondelli, M.U., Lesniewski, R., Phillips, M.I., Mizokami, M., (1994) "Optimization for the detection of hepatitis C virus antigens in the liver". *J. Hepatol.*, 20, 143-147.
- [22] Hiramatsu, N., Hayashi, N., Haruna, Y., Kasahara, A., Fusamoto, H., Mori, C., Fuke, I., Okayama, H., & Kamada, T. (1992) "Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome". *Hepatology*, 16, 306-311.
- [23] Lau, J.Y., Krawczynski, K., Negro, F., & Gonzalez-Peralta, R.P. (1996) "In situ detection of hepatitis C virus--a critical appraisal". *J. Hepatol.*, 24, 43-51.
- [24] Falcón, V., Acosta-Rivero, N., Shibayama, M., Luna-Munoz, J., Miranda-Sanchez, M., Gaviñondo, J., de la Rosa, M.C., Menéndez, I., Gra, B., García, W., Dueñas-Carrera, S., Silva, J., Chinea, G., González-Bravo, M., Alvarez, F., Morales, J., Kouri, J., & Tsutsumi, V. (2005) "Detection of HCV components and pathological reactions in apoptotic hepatocytes from chronically HCV-infected patients". *American Journal of Infectious Diseases*, 1, 12-24.
- [25] Ravaggi, A., Natoli, G., Primi, D., Albertini, A., Levvero, M., & Cariani, E. (1994) "Intracellular localization of full-length and truncated hepatitis C virus core protein expressed in mammalian cells". *J. Hepatol.*, 20, 833-836.
- [26] Komminoth, P., Adams, V., Long, A.A., Roth, J., Saremaslani, P., Flury, R., Schmid, M., & Heitz, Ph.U., (1994) "Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in-situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in-situ RT-PCR". *Path Res Pract*, 190, 1017-1025.
- [27] Negro, F., Krawczynski, K., Quadri, R., Rubbia-Brandt, L., Mondelli, M., Zarski, J.P., & Hadengue, A. (1999) "Detection of genomic- and minus-strand of hepatitis C virus RNA in the liver of chronic hepatitis C patients by strand-specific semiquantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction". *Hepatology*, 29, 536-542.
- [28] Cho, S.W., Hwang, S.G., Han, D.C., Jin, S.Y., Lee, M.S., Shim, C.S., Lee, D.W., & Lee, H.B. (1996) "In situ detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue using a digoxigenin-labeled probe created during a polymerase chain reaction". *J. Med. Virol.*, 48, 227-233.
- [29] Falcón, V., Acosta-Rivero, N., Shibayama, M., Luna-Munoz, J., Miranda-Sanchez, M., de la Rosa, M.C., Menéndez, I., García, G., Gra, B., Dueñas-Carrera, S., Lopez, D., González-Bravo, M., Fernández-Ortega, C., Casillas, D., Morales, J., Kouri, J., & Tsutsumi, V. (2005) "Evidences of Apoptosis in Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes and Peripheral Blood Mononuclear Cells in the Absence of Liver Injury". *American Journal of Infectious Diseases*, 1, 43-49.
- [30] Kojima, S., Tanaka, Y., Enomoto, N., Marumo, F., & Sato, C. (1996) "Distribution of hepatitis C virus RNA in the liver and its relation to histopathological changes". *Liver*, 16, 55-60.
- [31] Walker, F.M., Dazza, M.C., Dauge, M.C., Boucher, O., Bedel, C., Henin, D., & Lehy, T. (1998) "Detection and localization by in situ molecular biology techniques and immunohistochemistry of hepatitis C virus in livers of chronically infected patients". *J. Histochem. Cytochem.*, 46, 653-660.
- [32] Falcón V (2000) "Expresión de antígenos de dos virus hepatotrópicos en hepatocitos y en cepas de la

- levadura *Pichia pastoris* transformada”. Tesis Doctorado, CIGB, Universidad de la Habana.
- [33] Falcón, V., Acosta-Rivero, N., Chinaea, G., Gavilondo, J., de la Rosa, M.C., Menendez, I., Duenas-Carrera, S., Vina, A., Garcia, W., Gra, B., Noa, M., Reytor, E., Barcelo, M.T., Alvarez, F., & Morales-Grillo, J. (2003) “Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients”. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 305, 1085-1090.
- [34] Schaff, Z. & Lapis, K. (1990) “Fine structure of hepatocytes during the etiology of several common pathologies”. *J Electron Microsc Tech*, 14, 179-207.
- [35] Lefkowitz, J.H., Schiff, E.R., Davis, G.L., Perrillo, R.P., Lindsay, K., Bodenheimer, H.C., Jr., Balart, L.A., Ortego, T.J., Payne, J., Dienstag, J.L. (1993) “Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B”. *The Hepatitis Interventional Therapy Group. Gastroenterology*, 104, 595-603.
- [36] Villari, D., Pernice, M., Spinella, S., Squadrito, G., Rodino, G., Brancatelli, S., Longo, G., & Raimondo, G. (1995) “Chronic hepatitis in patients with active hepatitis B virus and hepatitis C virus combined infections: a histological study”. *Am. J. Gastroenterol.*, 90, 955-958.
- [37] Balercia, G., Accordini, C., Di Piramo, D., Martella, F., & Tomezzoli, A. (1993) “An ultrastructural study of six cases of chronic active C hepatitis. A comparison with chronic active B hepatitis”. *Ultrastruct. Pathol.*, 17, 477-482.
- [38] Branch, A.D. (1996) “Replication of hepatitis C virus: catching it in the act”. *Hepatology*, 23, 372-375.
- [39] Schaff, Z., Eder, G., Eder, C., & Lapis, K. (1992) “Ultrastructure of normal and hepatitis virus infected human and chimpanzee liver: similarities and differences”. *Acta Morphol. Hung.*, 40, 203-214.
- [40] Serafino, A., Valli, M.B., Alessandrini, A., Ponzetto, A., Carloni, G., & Bertolini, L. (1997) “Ultrastructural observations of viral particles within hepatitis C virus-infected human B lymphoblastoid cell line”. *Res. Virol.*, 148, 153-159.
- [41] Barbaro, G., Di Lorenzo, G., Asti, A., Ribersani, M., Belloni, G., Grisorio, B., Filice, G., & Barbarini, G. (1999) “Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical findings”. *Am. J. Gastroenterol.*, 94, 2198-2205.
- [42] Barbaro, G., Di Lorenzo, G., Belloni, G., Asti, A., Pellicelli, A.M., & Barbarini, G. (2001) “Hepatic iron storage and megamitochondria formation in patients with chronic hepatitis C related to the hepatitis C virus genotype”. *Dig. Liver Dis.*, 33, 81-83.
- [43] Moriya, K., Fujie, H., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Tsutsumi, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Kimura, S., & Koike, K. (1997) “Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in the liver of transgenic mice”. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 50, 169-177.
- [44] Moriya, K., Nakagawa, K., Santa, T., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Tsutsumi, T., Miyazawa, T., Ishibashi, K., Horie, T., Imai, K., Todoroki, T., Kimura, S., & Koike, K. (2001) “Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis”. *Cancer Res.*, 61, 4365-4370.
- [45] Bosman, C., Valli, M.B., Bertolini, L., Serafino, A., Boldrini, R., Marcellini, M., & Carloni, G. (1998) “Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients”. *Res. Virol.*, 149, 311-314.
- [46] Dash, S., Kalkeri, G., McClure, H.M., Garry, R.F., Clejan, S., Thung, S.N., & Murthy, K.K. (2001) “Transmission of HCV to a chimpanzee using virus

- particles produced in an RNA-transfected HepG2 cell culture". *J. Med. Virol.*, 65, 276-281.
- [47] de Vos, R., Verslype, C., Depla, E., Fevery, J., van Damme, B., Desmet, V., & Roskams, T. (2002) "Ultrastructural visualization of hepatitis C virus components in human and primate liver biopsies". *J. Hepatol.*, 37, 370-379.
- [48] Falcón, V., Acosta-Rivero, N., China, G., de la Rosa, M.C., Menendez, I., Duenas-Carrera, S., Gra, B., Rodriguez, A., Tsutsumi, V., Shibayama, M., Luna-Munoz, J., Miranda-Sanchez, M.M., Morales-Grillo, J., & Kouri, J. (2003) "Nuclear localization of nucleocapsid-like particles and HCV core protein in hepatocytes of a chronically HCV-infected patient". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 54-58.
- [49] Falcón, V., Acosta-Rivero, N., Shibayama, M., China, G., Gavalondo, J.V., de la Rosa, M.C., Menendez, I., Gra, B., Duenas-Carrera, S., Vina, A., Garcia, W., Gonzalez-Bravo, M., Luna-Munoz, J., Miranda-Sanchez, M., Morales-Grillo, J., Kouri, J., & Tsutsumi, V. (2005) "HCV core protein localizes in the nuclei of nonparenchymal liver cells from chronically HCV-infected patients". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329, 1320-1328.
- [50] Iacovacci, S., Manzin, A., Barca, S., Sargiacomo, M., Serafino, A., Valli, M.B., Macioce, G., Hassan, H.J., Ponzetto, A., Clementi, M., Peschle, C., & Carloni, G. (1997) "Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro". *Hepatology*, 26, 1328-1337.
- [51] Mizuno, M., Yamada, G., Tanaka, T., Shimotohno, K., Takatani, M., & Tsuji, T. (1995) "Virion-like structures in HeLa G cells transfected with the full-length sequence of the hepatitis C virus genome". *Gastroenterology*, 109, 1933-1940.
- [52] Shimizu, Y.K., Feinstone, S.M., Kohara, M., Purcell, R.H., & Yoshikura, H. (1996) "Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy". *Hepatology*, 23, 205-209.
- [53] Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M.J., Miyamura, T., & Brechot, C. (1997) "Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 1200-1205.
- [54] Krawczynski, K., Beach, M.J., Bradley, D.W., Kuo, G., Di Bisceglie, A.M., Houghton, M., Reyes, G.R., Kim, J.P., Choo, Q.L., & Alter, M.J. (1992) "Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification". *Gastroenterology*, 103, 622-629.
- [55] Sansonno, D., Cornacchiulo, V., Iacobelli, A.R., Gatti, P., Di Stasi, M., & Dammacco, F. (1995) "Demonstration and distribution of HCV RNA sequences by in situ hybridization and HCV-related proteins by immunohistochemistry in the liver tissue of patients with chronic HCV infection". *Pathobiology*, 63, 239-248.
- [56] Blight, K., Lesniewski, R.R., LaBrooy, J.T., & Gowans, E.J. (1994) "Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver". *Hepatology*, 20, 553-557.
- [57] Selby, M., Erickson, A., Dong, C., Cooper, S., Parham, P., Houghton, M., & Walker, C.M. (1999) "Hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 originates in the endoplasmic reticulum and requires cytoplasmic processing for presentation by class I MHC molecules". *J. Immunol.*, 162, 669-676.
- [58] Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., & Koike, K. (1997) "Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice". *J. Gen. Virol.*, 78, 1527-1531.
- [59] Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura,

- S., Miyamura, T., & Koike, K. (1998) "The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice". *Nat. Med.*, 4, 1065-1067.
- [60] Okuda, M., Li, K., Beard, M.R., Showalter, L.A., Scholle, F., Lemon, S.M., & Weinman, S.A. (2002) "Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein". *Gastroenterology*, 122, 366-375.
- [61] Arrieta, J.J., Rodriguez-Inigo, E., Casqueiro, M., Bartolom, M.J., Manzarbeitia, F., Herrero, M., Pardo, M., & Carreno, V. (2000) "Detection of hepatitis C virus replication by In situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus". *Hepatology*, 32, 97-103.
- [62] Haruna, Y., Kanda, T., Honda, M., Takao, T., & Hayashi, N. (2001) "Detection of hepatitis C virus in the bile and bile duct epithelial cells of hepatitis C virus-infected patients". *Hepatology*, 33, 977-980.
- [63] Lorient, M.A., Bronowicki, J.P., Lagorce, D., Lakehal, F., Persico, T., Barba, G., Mergey, M., Vons, C., Franco, D., Belghiti, J., Giacca, M., Housset, C., & Brechot, C. (1999) "Permissiveness of human biliary epithelial cells to infection by hepatitis C virus". *Hepatology*, 29, 1587-1595.
- [64] Nuovo, G.J., Lidonnici, K., MacConnell, P., & Lane, B. (1993) "Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA". *Am. J. Surg. Pathol.*, 17, 683-690.
- [65] Nuovo, G.J. (2000) "In situ strand displacement amplification: an improved technique for the detection of low copy nucleic acids". *Diagn. Mol. Pathol.*, 9, 195-202.