



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y
MEDICINA FÍSICA

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN LA
IDENTIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL VHC EN
MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS

BLANCA TORRES TORRES
Granada, 1997

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Blanca Torres Torres
D.L.: GR. 2340-2008
ISBN: 978-84-691-7275-9

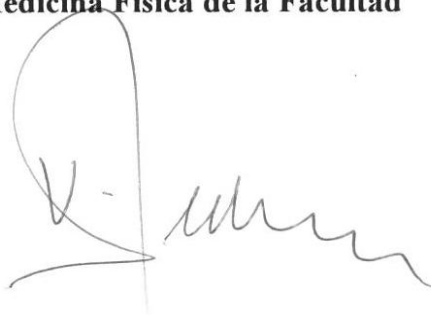
DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**VICENTE PEDRAZA MURIEL, Director del Departamento de Radiología y
Medicina Física**

**CERTIFICO que el presente trabajo ha sido realizado por la Licenciada D^a
BLANCA TORRES TORRES en el Laboratorio de Investigaciones Médicas y
Biología Tumoral del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad
de Medicina.**

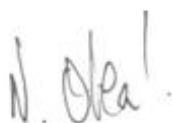
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'V. Pedraza Muriel', is written over the text of the certificate.

Granada, Mayo de 1997

DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA

FACULTAD DE MEDICINA

DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL



Prof. Dr.

Nicolás Olea Serrano



Prof. Dr.

José Luis Martín Ruiz



Prof. Dr.

Antonio Caballero Plasencia

Licenciada: Blanca Torres Torres

Aspirante al Grado de Doctora en Farmacia

Entre los agradecimientos me gustaría destacar la inestimable ayuda del Laboratorio Farmacéutico Serono, distribuidor del Interferón Beta Frone® que subvencionó en gran medida este trabajo a través de la Fundación “Salud 2000”. Su apoyo ha sido fundamental para el desarrollo de esta Tesis Docotoral.

TESIS DOCTORAL

ÍNDICE

- 1 -

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	11
1.1. - HEPATITIS VIRALES. GENERALIDADES	11
1.1.1.- VIRUS DE LA HEPATITIS A (VHA)	11
1.1.2.- VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)	12
1.1.3.- VIRUS DELTA (VHD)	14
1.1.4.- VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)	15
1.1.5.- VIRUS E DE LA HEPATITIS (VHE)	17
1.1.6.- HEPATITIS VIRALES TIPOS G Y F	18
1.2. - CONCEPTO E HISTORIA DE LA HEPATITIS C	19
1.2.1. - ESTRUCTURA Y TAXONOMÍA DEL VHC	21
1.2.2.- DIVERSIDAD Y MUTAGENIDAD VIRAL	25
1.2.3.- MECANISMOS DE REPLICACIÓN VIRAL	28
1.2.4.- VIRUS C DE LA HEPATITIS Y LOCALIZACIÓN EXTRAHEPÁTICA	29
1.3.- HISTORIA NATURAL DE LA HEPATITIS VÍRICA POR VHC	31
1.3.1.- HEPATITIS AGUDA POR VHC	32
1.3.1.1.- Características clínicas	33
1.3.2.- HEPATITIS CRÓNICA POR VHC	35
1.3.2.1.- Características clínicas	36
1.3.3.- HEPATITIS C Y HEPATOCARCINOMA	37
1.3.4.- HEPATITIS C Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES	40
1.3.4.1.- Hepatitis C y Síndrome de Sjögren	40
1.3.4.2.- Hepatitis C y anemia aplásica	41
1.3.4.3.- Hepatitis C y Crioglobulinemias mixtas	42
1.4.- HISTOPATOLOGÍA DE LAS HEPATITIS VIRALES AGUDAS Y CRÓNICAS	42
1.4.1.- HEPATITIS SUBAGUDA	44
1.4.2.- HEPATITIS FULMINANTE	45

1.4.3.- HEPATITIS AGUDA (HA)	45
1.4.4.- HEPATITIS CRÓNICA (HC).	48
1.5.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA HEPATITIS POR VHC	51
1.5.1.- PREVALENCIA	52
1.5.2.- INCIDENCIA EN ESPAÑA	53
1.5.3.- VÍAS DE TRANSMISIÓN	54
1.5.3.1.- Transmisión parenteral	54
1.5.3.2.- Transmisión no parenteral	57
1.5.4.- POBLACIÓN DE RIESGO	60
1.6.- PATOGENIA DE LA HEPATITIS VIRAL POR VHC	62
1.6.1.- CONCEPTOS DE INMUNOLOGÍA GENERAL	62
1.6.2.- TEORIA INMUNOPATOGENICA. CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS T CITOTÓXICAS	68
1.6.3.- ASPECTOS AUTOINMUNES EN LA PATOGENIA DE LA HEPATITIS CRÓNICA POR VHC	72
1.6.4.- APOPTOSIS Y HEPATITIS CRÓNICA POR VHC	73
1.6.5.- BIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VHC	75
1.7.- PROFILAXIS	77
1.8.- PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	80
1.8.1.- DIAGNÓSTICO DE LAS HEPATITIS VIRALES AGUDAS POR VHC	80
1.8.2.- DIAGNÓSTICO DE LAS HEPATITIS VIRALES CRÓNICAS POR VHC	82
1.8.3.- DETECCIÓN DE Ac IgG SÉRICOS FRENTE AL VHC	84
1.8.4.- MARCADORES DE INFECTIVIDAD	89
1.8.4.1.- Antígeno del virus C de la hepatitis	89
1.8.4.2.- IgM sérica frente al VHC	91
1.8.4.3.- Detección del genoma viral del VHC. Diagnóstico por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	92
1.8.4.3.1.- Ventajas de la PCR	98
1.8.4.3.2.- Inconvenientes de la PCR	99
1.8.4.3.3.- Utilidad de la PCR en muestras séricas de hepatitis por VHC	100

1.8.4.3.4.- Detección del RNA-VHC por PCR en hígado	101
1.8.4.3.5.- Detección del genoma VHC por PCR en otras localizaciones	102
1.9.- TRATAMIENTO	104
1.9.1.- TRATAMIENTO DE LAS HEPATITIS AGUDAS POR VHC	104
1.9.2.- TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C.	104
1.9.3.- LOS INTERFERONES Y SUS IMPLICACIONES BIOLÓGICAS	105
1.9.4.- MECANISMOS DE LA ACCIÓN ANTIVIRAL DE LOS INTERFERONES	109
1.9.4.1.- Efectos biológicos del IFN	111
1.9.4.2.- Aplicaciones clínicas del Interferón	114
1.9.4.3.- Eventualidades en el tratamiento con IFN	115
1.9.4.4.- Interacciones farmacológicas del Interferón	115
1.9.4.5.- Anticuerpos antiinterferón	116
1.9.4.6.- Tratamientos propuestos: papel del Interferón	117
1.9.4.7.- Factores predictivos de respuesta	119
1.9.4.8.- Ensayos clínicos con otros interferones	121
1.9.5.- OTROS ANTIVIRALES	121
1.9.6.- RECOMENDACIONES ACTUALES EN EL TRATAMIENTO CON IFN	125
1.9.7.- TRASPLANTE HEPÁTICO	126
1.10.- OBJETIVOS	127
2.- PACIENTES. MATERIAL Y MÉTODOS	129
2.1.- PACIENTES	129
2.1.1.- DESCRIPCIÓN DE LA SERIE CLÍNICA	129
2.1.2.- CRITERIOS DE SELECCIÓN	129
2.1.2.1.- Población base	129
2.1.2.2.- Criterios de inclusión	130
2.1.2.3.- Criterios de exclusión	130
2.2.- MÉTODOS CLÍNICOS	131
2.2.1.- BIOPSIA HEPÁTICA	131
2.2.2.1.- Estudio histopatológico	132

2.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS	132
2.3.1.- CONTROL DE LABORATORIO	132
2.3.2.- ESTUDIOS DE LA SEROLOGÍA VIRAL	133
2.3.3.- ESTUDIO DE AUTOANTICUERPOS	133
2.3.4.- ESTUDIO DEL GENOTIPO VIRAL DE VHC	133
2.3.4.1.- Determinación de la concentración óptima de sonda 5' biotinilada	134
2.3.4.2.- Protocolo	134
2.3.5.- METODOLOGÍA DE PCR	136
2.3.5.1.- Aislamiento y extracción del RNA viral en muestras de suero	136
2.3.5.2.- Aislamiento y extracción del RNA-VHC en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y en subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4	139
2.3.5.3.- Obtención del cDNA. Transcripción	141
2.3.5.4.- Amplificación del cDNA	144
2.3.5.5.- "Nested" PCR	145
2.3.5.6.- Análisis de los productos amplificados	146
2.3.6.- FASE FINAL DEL ESTUDIO	151
2.3.6.1.- Creación del archivo de datos y estadística descriptiva	151
2.3.6.2.- Análisis estadístico	153
2.4.- INSTRUMENTACIÓN	153
2.4.1.- CENTRÍFUGA REFRIGERADA	153
2.4.2.- MICRO CENTRÍFUGA	154
2.4.3.- CENTRÍFUGA CONVENCIONAL	154
2.4.4.- MICROSCOPIO ÓPTICO	154
2.4.5.- CABINA DE FLUJO LAMINAR	154
2.4.6.- CONGELADORES	154
2.4.7.- pH METRO	155
2.4.8.- BALANZA DE PRECISIÓN	155
2.4.9.- AGITADOR MECÁNICO	155
2.4.10.- SEPARADOR MAGNÉTICO DYNAL MPC-1	155

2.4.11.- TERMOCICLADOR	155
2.4.12.- SISTEMA DE ELECTROFORESIS	156
2.4.13.- TRANSILUMINADOR	156
2.4.14.- SISTEMA DE REPRODUCCIÓN FOTOGRÁFICA Y VÍDEO	156
2.4.15.- ANALISIS DE IMÁGEN	156
2.4.16.- OTROS	157
2.5.- REACTIVOS QUÍMICOS	157
2.5.1.- TAMPÓN ESTANDAR DE FOSFATO (PBS)	157
2.5.2.- TAMPÓN ESTANDAR DE FOSFATO CON ALBÚMINA BOVINA (PBS/BSA)	157
2.5.3.- TAMPÓN TRIS-BORICO-EDTA (TBE	157
2.5.4.- TAMPÓN TRIS	157
2.5.5.- FICOLL-HIPAQUE	158
2.5.6.- AGAROSA	158
2.5.7.- ACEITE MINERAL	158
2.5.8.- TAMPÓN DE CARGA	158
2.5.9.- DIETIL PIROCARBONATO (DEPC)	158
2.5.10.- BROMURO DE ETIDIO	158
2.5.11.- ACETATO SÓDICO	159
2.5.12.- OTROS REACTIVOS QUÍMICOS	159
2.5.13.- SOLUCIÓN DE NaCLO AL 10%	159
2.6.- REACTIVOS BIOLÓGICOS PARA PCR	159
2.6.1.- EXTRACCIÓN DEL RNA	159
2.6.2.- TRANSCRIPCIÓN	160
2.6.2.1.- Kit de Promega AMV Reverse Transcriptase (Catálogo nº 5102).	160
2.6.2.2.- Kit de Promega 4 dNTPs	160
2.6.2.3.- RNAsin Ribonuclease Inhibidor	160
2.6.2.4.- El primer	161
2.6.3.- AMPLIFICACIÓN	161
2.6.3.1.- Kit de Promega Taq DNA Polymerase	161

2.6.3.2.- El primer	161
2.6.4.- PRIMERS NESTED PCR	161
2.6.5.- MARCADORES DE TAMAÑO	161
2.6.5.1.- PhiX 174 DNA/Hinfl	161
2.6.5.2.- PhiX 174 DNA/HaeIII	162
2.6.6.- DYNABEADS M-450 PAN-B (CD19) Dynal.	162
2.6.7.- DYNABEADS M-450 (CD14) Dynal.	162
2.6.8.- DYNABEADS M-450 (CD8). Dynal.	163
2.6.9.- DYNABEADS M-450 (CD4). Dynal.	163
2.7.- REACTIVOS PARA TIPADO GENÉTICO	164
2.8.- MATERIAL FUNGIBLE	164
2.8.1.- MATERIAL DEL PLASTICO PARA EL AISLAMIENTO DEL RNA	
VIRAL	164
2.8.1.1.- Tubos eppendorf	164
2.8.1.2.- Puntas de pipetas con filtro (Tips)	165
2.8.2.- MATERIAL DE PLÁSTICO PARA LA SEPARACIÓN DE LAS	
DISTINTAS SUBPOBLACIONES CELULARES A PARTIR DE SANGRE	
TOTAL	165
2.8.2.1.- Pipetas	165
2.8.2.2.- Tubos de ensayo	165
2.8.3.- MATERIAL DE PLÁSTICO PARA LA PCR	165
2.8.3.1.- Tubos eppendorf	165
2.8.3.2.- Puntas de pipetas con filtro (Tips)	165
2.8.4.- OTRO MATERIAL FUNGIBLE	166
2.8.4.1.- Películas Fotográficas	166
2.9.- OTRO MATERIAL	166
3.- RESULTADOS	168
3.1.- DETERMINACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C	168
3.1.1.- ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA PREPARATIVA PARA PCR Y	
METODOLOGÍA DE PCR	168
3.1.2.- DETERMINACIÓN DEL GENOMA VIRAL VHC POR TÉCNICAS DE	

PCR EN MUESTRAS DE SANGRE: SUERO	170
3.1.3.- DETERMINACIÓN DEL GENOMA VIRAL VHC POR TÉCNICAS DE	
PCR EN MUESTRAS DE SANGRE: CELULAS SANGUÍNEAS	174
3.1.4.- GENOTIPO DEL VHC	177
3.2.- PROTOCOLO DE PACIENTES	178
3.2.1.- INTRODUCCIÓN	178
3.2.2.- PACIENTES TRATADOS CON INTERFERÓN-ALFA 2b	
RECOMBINANTE DURANTE 6 MESES	179
3.2.2.1.- Datos epidemiológicos	179
3.2.2.2.- Marcadores serológicos	181
3.2.2.3.- biopsia hepática	183
3.2.2.4.- Resultados de los parámetros analíticos hematológicos y	
bioquímicos	184
3.2.2.5.- Resultados del test PCR	202
3.2.3.- PACIENTES QUE NO CONCLUYERON EL TRATAMIENTO	212
3.2.3.1.- Datos epidemiológicos	212
3.2.3.2.- Resultados de los marcadores serológicos	214
3.2.3.3.- biopsia hepática	215
3.2.3.4.- Resultados de los parámetros analíticos hematológicos y	
bioquímicos	215
3.2.3.5.- Datos de PCR	224
3.2.4.- PACIENTES TRATADOS CON INTERFERÓN-BETA	224
3.2.4.1.- Datos epidemiológicos	225
3.2.4.2.- Resultados de los marcadores serológicos	226
3.2.4.3.- biopsia hepática	227
3.2.4.4.- Resultados de las determinaciones analíticas hematológicas y	
bioquímicas	227
3.2.4.5.- Datos de PCR	236
3.2.5.- PACIENTES NO TRATADOS	237
3.2.5.1.- Datos epidemiológicos	237
3.2.5.2. Resultados de los marcadores serológicos	239

3.2.5.3. - biopsia hepática	239
3.2.5.4.- Resultados de las determinaciones analíticas hematológicas y bioquímicas	241
3.2.5.5.- Datos de PCR	246
3.2.6.- PACIENTES NO VHC	247
3.2.6.1.- Datos epidemiológicos	247
3.2.6.2.- Resultados de los marcadores serológicos	249
3.2.6.3.- biopsia hepática	250
3.2.6.4.- Resultados de los parámetros analíticos hematológicos y bioquímicos analizados	251
3.2.6.5.- Resultados de PCR	252
4.- DISCUSIÓN	254
5.- CONCLUSIONES	273
6.- BIBLIOGRAFÍA	276
ANEXO I	292
ANEXO II	296
ANEXO III	299

TESIS DOCTORAL

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. - HEPATITIS VIRALES. GENERALIDADES

El término hepatitis se utiliza, en patología, para referirse a los procesos que lesionan de forma difusa el parénquima hepático.

Bajo este concepto se engloban las hepatitis virales junto a las hepatitis por tóxicos de patogenia diferente. Como es conocido existen numerosos tipos de virus capaces de producir necrosis hepatocelular e inflamación (ver tabla 1.1) aunque nos centramos en los que presentan tropismo exclusivo o predominante por los hepatocitos.

Los principales virus productores de episodios agudos/ crónicos de hepatitis víricas se denominan genéricamente virus hepáticos. En el momento actual este grupo viral incluye los clásicos virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis Delta (VHD) y los denominados productores de hepatitis NoANoB entre los que se han descrito el virus de la hepatitis C (VHC) de transmisión parenteral y el virus de la hepatitis E (VHE) de transmisión oro fecal. Además, se supone la existencia de dos nuevos agentes virales, el VHF relacionado con hepatitis parenterales seronegativas para el virus C y el VHG relacionado con la hepatitis sincitial de células gigantes.

1.1.1.- VIRUS DE LA HEPATITIS A (VHA)

Este tipo de hepatitis viral se denomina también infecciosa o epidémica. El VHA se aisló por primera vez en 1973 en las heces de un paciente afecto de hepatitis (Curso Hepatitis víricas, 1996); está clasificado dentro del género Hepatovirus, perteneciente a la familia Picornaviridae.

Morfológicamente las partículas virales carecen de envoltura y presentan

simetría icosaédrica. En ellas se puede distinguir una cápside y un core electrodenso.

La cápside de las partículas virales maduras presenta cuatro polipéptidos: VP1, VP2, VP3, y VP4, existe asimismo una proteína precursora VP0. Recientemente se ha evidenciado que VP1 y VP4 son proteínas más externas y por el contrario VP2 y VP3 se sitúan hacia el interior.

El genoma está constituido por una sola cadena de RNA lineal de 8.100 nucleótidos. Este RNA se traduce en una poliproteína de gran longitud que contiene once polipéptidos, cuatro estructurales y siete no estructurales que posteriormente son individualizados por la acción de enzimas proteolíticos, dando lugar a las proteínas funcionales.

El VHA expresa el antígeno HA Ag que presenta un poder inmunógeno potente capaz de suscitar una respuesta de anticuerpos precoz e intensa. Actualmente se conoce que se elaboran anticuerpos frente a VP1, VP2 y VP3 pero no frente a VP4 quizá por ser éste el de menor peso molecular. Posee una estructura estable con una variación genética muy pequeña, no habiéndose identificado por el momento subespecificidades antigénicas.

1.1.2.- VIRUS DE LA HEPATITS B (VHB)

Es un virus que pertenece a la familia de los Hepadnavirus o virus DNA hepatotropos. Este grupo está formado por varios virus DNA con carácter antigénico y morfológico similares, que producen infecciones hepáticas persistentes y cáncer hepático en algunos vertebrados superiores y entre ellos el hombre.

Morfológicamente el virión maduro o partícula Dane es una partícula esférica, posee una envoltura o cubierta lipoproteica en la que se incluyen diversas proteínas víricas. La nucleocápside es icosaédrica y en su interior se encuentra el ácido nucleico o DNA de doble cadena incompleta unido covalentemente a una enzima con actividad DNA-polimerasa. En el suero de portadores del VHB se distinguen otras partículas no infectantes, esféricas y tubulares de menor tamaño, constituidas por el mismo material de la envoltura y

que se encuentran en el suero en concentraciones mayores que la partícula Dane.

Estructuralmente la cápside está formada por copias de la proteína HBcAg, que se ensamblan espontáneamente. En su interior se encuentra el genoma o ácido nucleico, y dos proteínas con actividad enzimática, DNA- polimerasa y protein-quinasa.

Su genoma es una molécula de DNA circular que se caracteriza por la asimetría longitudinal de sus cadenas, lo que origina una porción bicatenaria y otra sencilla. La estructura circular del DNA se debe a la complementariedad existente entre los extremos 5' de ambas cadenas. El examen de la secuencia de nucleótidos de la cadena completa reveló cuatro amplias secuencias de lectura abierta (ORF) o regiones con capacidad codificadora denominadas regiones o genes S, PreC/C, Pol y X:

GEN S: codifica las 3 proteínas estructurales de envoltura del virus. Posee 3 codones o lugares donde se inicia la síntesis de estas proteínas, lo que origina 3 subregiones dentro del gen S denominadas:

*S: codifica una proteína que es el HBsAg (anteriormente conocido como Antígeno Australia).

*PRE S2: codifica un pequeño polipéptido que es importante como marcador pronóstico y diagnóstico. Su lectura va seguida de la del gen S dando lugar a una proteína mediana que sería la suma del HBsAg y de los 55 aa de PreS2.

*PRE S1: codifica un polipéptido que es donde se localiza el factor de unión al receptor celular del hepatocito. Su lectura va seguida de Pre S2 y HBsAg dando lugar a la proteína larga por ser la de mayor longitud ya que sería la suma de HBsAg+Pre S2+Pre S1.

GEN PREC/C: es el responsable de la expresión de los antígenos del núcleo o core viral. Si la lectura se inicia en el gen C, se codifica el HBcAg, que se expresa como p22, y se encuentra unido al retículo endoplásmico de la célula hepática, lo que impide que sea secretado a sangre. Si la lectura comienza en el extremo PreC, se sintetiza una proteína más larga, que puede sufrir una degradación por la acción de proteasas celulares, transformándose en una

proteína que se expresa como p16, y se identifica como HBeAg que adquiere una especificidad antigénica nueva, y puede ser secretado a sangre. Mutaciones en la región PreC impiden la secreción de HBeAg y esta situación correspondería a los individuos con hepatitis crónica y HBeAc positivos.

GEN POL: codifica una poliproteína con actividad DNA-Polimerasa. Su función es reparar o completar la cadena corta y así conseguir que el DNA sea bicatenario.

GEN X: codifica una proteína cuya misión no está muy clara, se piensa que pudiera tener función de transaminación de genes celulares.

En cuanto a la envoltura vírica está formada por los antígenos HBsAg, PreS1 y PreS2 que son los constituyentes de las tres proteínas (pequeña, mediana y larga). En la zona que corresponde al péptido Pre S1 Ag existen los dominios responsables de la unión VHB-hepatocito, que parece ser que tiene lugar en los receptores para IgA del hepatocito.

El VHB posee diferentes sistemas antigénicos que están constituidos por:

*Antígenos de superficie HBsAg, PreS1 y PreS2. HBsAg tiene carácter heterogéneo presentando subespecificidades antigénicas o subtipos antigénicos. En todas las variedades hay un grupo común a y cuatro determinantes d, y, w, r,; adw, adr, ayw, ayr, pero la variabilidad del HBsAg no afecta a la virulencia.

*Antígenos asociados al núcleo o Core: HBcAg y HBeAg. De este último también se conocen 3 subespecificidades antigénicas.

*También actúan como antígenos el propio DNA del virus y la DNA-polimerasa.

1.1.3.- VIRUS DELTA (VHD)

El hoy llamado virus delta fue descubierto en 1977 por Rizzetto en el núcleo de hepatocitos de pacientes con hepatitis B crónica (Rizzetto y cols, 1977). Inicialmente se pensó que el delta era una variedad antigénica de algún antígeno de la nucleocápside del VHB; posteriormente se estableció que el VHD era el marcador de la infección de un nuevo agente de hepatitis denominado VHD que tiene carácter biológico propio. Es un virus RNA defectivo, hepatotropo y

transmisible que requiere para su propia replicación, la multiplicación del VHB, ya que necesita HBsAg.

Morfológicamente es el virus RNA más pequeño que se conoce, es una partícula esférica; la partícula infecciosa es un híbrido formado por una envoltura lipoproteica, que es el antígeno de superficie del VHB (HBsAg), y en su interior se localiza el antígeno delta y el RNA monocatenario. La cápside está formada por el antígeno del VHD (HDAg) que consta de dos proteínas fosforiladas muy similares excepto en los últimos aminoácidos carboxiterminales. La envoltura es de naturaleza lipídica semejante a la del VHB maduro ya que está formada por HBsAg. El VHD, una vez recubierto por VHB, ya puede penetrar en el hepatocito y causar su propia infección. Por el momento no están bien establecidas cual o cuales son las funciones de ayuda que el VHB proporciona al VHD.

Su genoma está formado por RNA monocatenario y circular cerrado covalentemente y de polaridad positiva de 1636 nucleótidos. Este RNA no tiene el extremo 3' lo que explica que sea el genoma de un virus defectivo y por tanto no contenga la información necesaria para la síntesis de proteínas de superficie, imprescindibles para la construcción de la envoltura o cubierta. El análisis de la secuencia genómica ha mostrado la presencia de seis lugares de lectura abierta, siendo la quinta la responsable de la codificación de una proteína (la más larga), que realmente son dos proteínas relacionadas que unidas al genoma del VHD dan lugar al antígeno Delta.

El antígeno Delta está formado por dos proteínas mayores. La variabilidad genética no afecta al antígeno Delta.

1.1.4. - VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

Corresponde al virus NoANoB de transmisión parenteral. Comparte la organización genómica de los miembros de la familia Flaviviridae.

Morfológicamente el VHC es un virus pequeño de 30-60 nm, con una membrana de envoltura formada por glicoproteínas esenciales para su replicación y en su interior se engloba el genoma que es un ácido nucleico RNA monocatenario y circular de polaridad positiva.

El genoma está formado por 10.030 nucleótidos. En su secuencia se distinguen unas regiones que no tienen capacidad para codificar proteínas (UTR) y que se sitúan en los extremos 5' y 3', y otra región central que es capaz de codificar proteínas. La región no codificante contiene la secuencia más conservada de los distintos aislados víricos. La otra región codifica una única proteína de 3.000 aa, a partir de la cual se generan las diferentes proteínas individuales por la acción de proteasas de origen celular y viral.

Existen numerosos epítomos inmunológicos en todas las proteínas identificadas del VHC tanto estructurales como no estructurales, es decir, todas tienen marcado carácter antigénico, dando lugar por tanto a la aparición de anticuerpos séricos en todos los individuos infectados.

Se ha detectado una alta variabilidad genética debido a que los virus RNA poseen alta frecuencia de mutación, es decir presenta una gran heterogeneidad genómica (diferencias en la secuencia de nucleótidos). El grado de variabilidad no es homogéneo dentro de todo el genoma, existe una región hipervariable en la que se alcanza hasta un 51% de diferencias entre los distintos aislados. Su hipervariabilidad es consecuencia del escape inmunológico durante el curso de la infección crónica, postulándose que la selección inmune de estas variantes puede ser uno de los mecanismos de la infección persistente por VHC, lo cual podría explicar la elevada frecuencia de cronicidad. Se ha sugerido también, que los distintos genotipos del VHC, tendrían diferente susceptibilidad frente a tratamientos específicos.

Como consecuencia de la elevada tasa de mutación espontánea del VHC, en las personas infectadas el virus no se puede identificar como una secuencia única, sino que está constituido por una secuencia mayoritaria, acompañada de secuencias mutantes; esta característica es lo que se denomina "cuasiespecie". La caracterización molecular de aislados del VHC procedentes de distintos portadores, ha permitido distinguir diferentes genotipos virales siendo éstos formas más estables del virus.

1.1.5.- VIRUS E DE LA HEPATITIS (VHE)

La hepatitis E es una hepatitis viral de transmisión preferentemente entérica. Ha sido a partir de 1992 cuando el virus se ha podido adaptar a cultivos celulares.

Estructuralmente es una partícula esférica de pequeño tamaño, con simetría icosaédrica y sin envoltura, semejante a los Caliciviridae, aunque estudios posteriores revelan una mayor similitud con el virus de la rubeola y el subgrupo alfavirus.

Su genoma posee una única cadena poliadenilada de RNA de polaridad positiva, posee tres regiones de lectura abierta (ORF) parcialmente solapadas. En el extremo 5' se encuentran los genes no estructurales y en el extremo 3' los genes estructurales. Los genes no estructurales de ORF-1 parecen codificar la RNA-polimerasa dependiente del RNA y una proteína con actividad helicasa; ORF-2 parece codificar los componentes estructurales de la partícula viral y ORF-3 codifica una proteína de función desconocida.

Los antígenos virales más inmunógenos corresponden a los de la polimerasa, es decir ORF-1, los tipo específicos para las distintas cepas parecen ser codificados por ORF-3, los epítomos comunes en los virus aislados son codificados por el extremo 3' de ORF-2.

Existe una importante variación genética entre las diferentes cepas aisladas de Asia y México pero ambas presentan una elevada comunidad antigénica, lo que sugiere la existencia de un único serotipo con varias subespecificidades que tienen una distribución regional (Lok ASF y cols, 1994).

Su periodo de incubación es de unas 6 semanas y afecta principalmente a jóvenes. Aunque siempre suele manifestarse con ictericia nunca evoluciona a cronicidad, pero, desde el punto de vista clínico, la infección adquiere un carácter grave en forma de hepatitis fulminante en el caso de mujeres embarazadas, especialmente en el tercer trimestre de gestación.

1.1.6.- HEPATITIS VIRALES TIPOS G Y F

Existen otros virus hepatotropos incluidos en el concepto de NoANoBNoC. Los candidatos más cercanos a ser identificados son tres:

- * un virus NoANoBNoC de corto período de incubación, sin envoltura y más pequeño que el VHC.

- * un virus similar a los Togavirus, encontrado en el hígado de un caso con hepatitis fulminante NoANoBNoC; y

- * un virus similar a los paramixovirus, inductor de una hepatitis sincitial de células gigantes, éste parece ser el candidato más probable para llamarse virus de la hepatitis F (VHF).

Recientemente ha sido clonado un nuevo virus y denominado virus de la hepatitis G (VHG). La detección, clonación y caracterización del VHG fué realizada por el Virus Discovery Group por Abbott a cargo del Dr Isa Mushahhwar (1995), este grupo indicó que se trata de un virus RNA, similar a los Flavivirus y al VHC. Posteriormente se han encontrado anticuerpos al VHG en diversos colectivos y en diferentes porcentajes, detectándose en el 14% de los pacientes politransfundidos, en el 12% de los ADVP, el 27% de la población de Africa Occidental y en el 2% de los donantes en EEUU..

Se han encontrado tres genotipos: 1, 2, y 3, con una distribución geográfica bien definida, así, el genotipo 1 se encuentra en Africa, el 2 en América del Sur, en Europa coexisten el 2 y el 3 y, y por último el genotipo 3 predomina en Asia. Se han secuenciado los distintos genotipos mostrando una mayor tasa de conservación que el VHC, siendo más difícil su escape al sistema inmunológico. Este hecho implicaría, en parte, la escasa patogenicidad de este agente (Bartolomé J, 1996).

El VHG tiene capacidad de producir lesión hepática, al menos aguda, aunque no evoluciona a hepatitis crónica (Alter y cols, 1996), siendo el nivel de daño hepático similar al producido en la hepatitis C pudiendo persistir la viremia durante años. Esto implica la existencia del portador sano VHG. En consecuencia, el VHG puede ser citopático en fase aguda y no producir cronicidad, pudiendo

comportarse de forma inocua o bien producir hepatitis fulminante.

Este virus ya ha sido detectado en España, en donde se ha comunicado que está presente en una de cada cuatro hepatitis crónicas de diversa etiología (22% de las hepatitis por VHD, 20% de las hepatitis por VHB y 16% de las hepatitis por VHC). También se ha comunicado recientemente que puede producir hepatitis fulminantes de curso subagudo, lento, con varios picos de elevación de transaminasas y alta mortalidad (a diferencia de las inducidas por el VHA y VHB y similitud de las producidas por VHC).

1.2. - CONCEPTO E HISTORIA DE LA HEPATITIS C

El término hepatitis NoANoB comenzó a utilizarse para expresar la existencia de agentes productores de hepatitis distintos al virus de la hepatitis A (VHA) y al virus de la hepatitis B (VHB). A mediados de la década de los setenta se observó en pacientes drogadictos por vía parenteral y en hemofílicos la aparición de dos o más brotes de hepatitis aguda, separados entre sí por periodos de normalización de los niveles de transaminasas. Estos brotes no eran atribuibles a virus A, B, Citomegalovirus, virus Epstein-Bar o cualquier otro tipo de virus hepatotropos (tabla 1.1); Tampoco era producida esta hepatitis por tóxicos como la metildopa, isoniacida o papaverina ni se podía relacionar con alguna enfermedad auto inmune.

Otros indicios de la existencia de agentes NoANoB aparecieron después del desarrollo de los marcadores para identificar la infección por VHB. El antígeno de superficie del VHB (Ag HBs) se detectó en el 50-75% de las hepatitis post-transfusionales (HPT); sin embargo, la eliminación de la sangre de los donantes Ag HBs positivos, redujo únicamente en un 25% la frecuencia total de las HPT. De esta forma, se intentó implicar al VHA en la aparición de la HPT, pero al desarrollarse pruebas serológicas para identificar al VHA, se comprobó que este virus no jugaba un papel en la mismas, centrando la atención desde entonces en la búsqueda de agentes distintos a los virus conocidos, A y B.

Hasta hace poco tiempo el diagnóstico de la hepatitis NoANoB se realizaba por exclusión y se basaba en la existencia de un perfil bioquímico de

transaminasas elevadas, en ausencia de positividad para los marcadores serológicos del VHA, VHB, virus de Epstein Barr y Citomegalovirus, de contacto con fármacos hepatotóxicos, de insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades del tracto biliar, exceso de ingesta alcohólica y de desórdenes metabólicos y autoinmunes; el diagnóstico se reforzaba cuando existían factores de alto riesgo, tales como haber recibido transfusiones sanguíneas o cualquier otra exposición percutánea a sangre o sus derivados.

En 1989 Choo y cols identificaron el VHC a través de un proceso de clonación original, desarrollando posteriormente una prueba serológica específica para detectar anticuerpos circulantes contra el virus. En la actualidad a esta hepatitis vírica se la denomina hepatitis C o hepatitis NoANoB de transmisión parenteral.

Desde 1991 se dispone de la secuencia completa del virus C (Houghton M, 1991) y más tarde se consiguió fotografiarlo por primera vez.

Tabla 1.1.

VIRUS HEPATOTROPOS

- | | |
|----------------------|--|
| - Hepatitis A | - Virus Varicela-Zoster |
| - Hepatitis B | - Virus Herpes simple. |
| - Hepatitis Delta | - Virus Coxsakie. |
| - Hepatitis E | - Virus del Sarampión y Rubeola. |
| - Hepatitis C | - Arenavirus (Fiebre de Lassa). |
| - Fiebre amarilla | - Virus de la Enfermedad de Marburg. |
| - Citomegalovirus. | - Virus Ebola (Fiebre del Zaire). |
| - Virus Epstein-Barr | - Virus de la fiebre del Valle del Rift. |

1.2.1. - ESTRUCTURA Y TAXONOMÍA DEL VHC

Los estudios más extensos sobre la estructura del virus de la hepatitis C se deben a Choo, Houghton y cols., 1989, (investigadores de la Chiron Corporation - USA-): incrementaron la concentración de antígeno viral de suero e hígado de chimpancés infectados por virus NoANoB obteniendo RNA y mediante un sistema de transcriptasa inversa lograron DNA complementario (cDNA), estableciendo una genoteca de cDNA en un vector de expresión, el bacteriófago landa gt-11, que se utilizó para infectar *Escherichia coli*, logrando expresar así las proteínas codificadas por cada clon. Las diversas proteínas obtenidas se pusieron en contacto con plasma de pacientes con hepatitis NoANoB en fase de convalecencia, en los que se supuso debían existir anticuerpos contra el virus NoANoB; de esta forma se obtuvo un clon que contenía el genoma que codificaba el antígeno de un virus NoANoB (cDNA 5.1.1.). Este clon se demostró que no derivaba del DNA sino de una molécula RNA monocatenaria presente en las infecciones NoANoB. La secuencia de nucleótidos del clon 5.1.1. se localiza en una parte de la cadena de RNA de lectura abierta (ORF); esta parte ORF se ha clonado en levaduras obteniéndose un antígeno que consta de tres epítomos contiguos de la región no estructural del genoma que se denominó C-100 y se utilizó para el desarrollo de una prueba de captura en fase sólida para detectar anticuerpos específicos, inicialmente mediante RIA y posteriormente por ELISA.

Así, trabajando inicialmente con un radioinmunoensayo (RIA) y posteriormente con una prueba de enzimoimmunoanálisis (ELISA), se pudo realizar un estudio de prevalencia anti VHC, demostrando que este agente era la causa más frecuente de HPT-NoANoB, siendo el anti VHC positivo aproximadamente en el 80% de las HPT y en el 60% de las hepatitis esporádicas. Estudios anteriores demostraron que el virus era sensible al cloroformo, lo que sugería la existencia de una cápsula lipídica (hidrofóbica), de tamaño calculado entre 30 y 60 nm de diámetro.

Las proteínas estructurales son componentes esenciales de la partícula vírica, se encuentran las proteínas C17 y C19 que tienen la característica de

poderse unir a las partículas del RNA, motivo por el cual se supone que constituyen la nucleocápside viral. Aparecen otras proteínas como la C22 o las glicoproteínas GP-35 y GP-72 que se suponen forman parte de la envoltura viral.

Las proteínas no estructurales regulan la función y crecimiento viral. Entre ellas se encuentran la C-33-C y la C-100-3 que son utilizadas en el test ELISA de diagnóstico.

Desde 1991 se cuenta con la secuencia completa del genoma del virus de la hepatitis C (Houghton M, 1991). Su estructura está constituida por una envoltura lipídica formada por glicoproteínas esenciales para su replicación. En el núcleo nos encontramos con el genoma, formado por unos 10.030 nucleótidos cuya organización genómica es similar a la de los flavivirus, en el se distinguen unas regiones que no tienen capacidad para codificar proteínas (UTR) y que se sitúan en los extremos 5' y 3', y otra región central que es capaz de codificar proteínas (figuras 1.2.1 y 1.2.2).

Figura 1.2.1.

Organización genómica del VHC

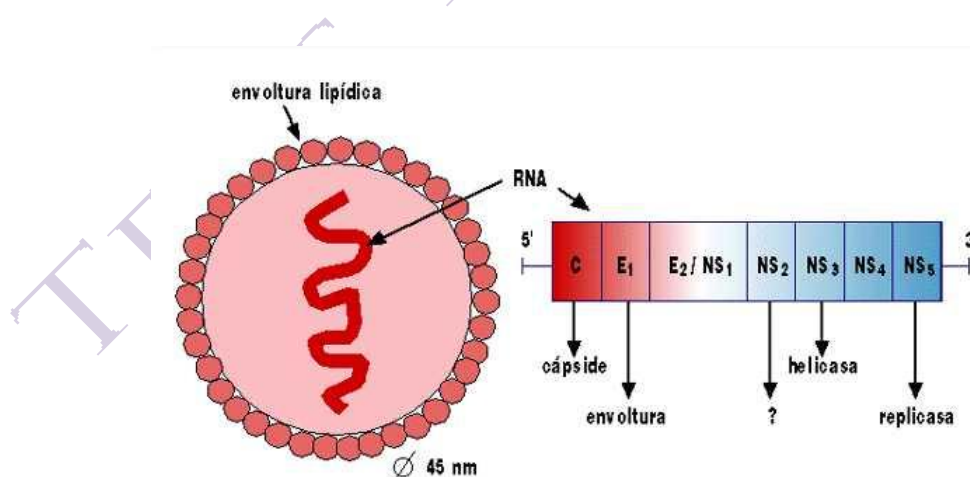
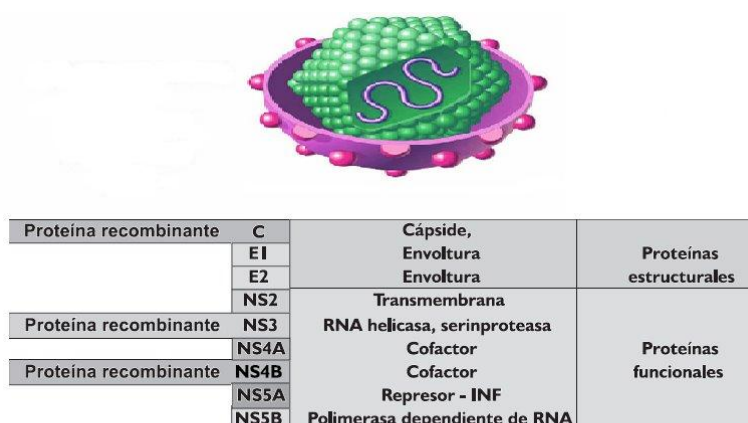


Figura 1.2.2.



La región no Codificante: en el extremo 5' terminal con 324 - 341 pares de bases, comienza siempre por el aminoácido metionina y precede a la secuencia codificante; es la secuencia más conservada de los distintos aislados víricos lo que sugiere que dicha región puede jugar un papel importante durante la replicación viral. En el otro extremo de la cadena de RNA existe una pequeña secuencia denominada 3' que contiene entre 27 y 55 nucleótidos y que posee un extremo terminal de poliadenina que podría servir al mismo tiempo de RNA mensajero.

La región Codificante: consta de 9.033 nucleótidos. Se comporta como una región de lectura abierta (ORF) que codifica una única proteína de 3.000 a.a., a partir de la cual por proteólisis se generan las diferentes proteínas individuales por la acción de proteasas de origen celular y viral. Las proteínas estructurales se localizan en el extremo 5' y las no estructurales en la región intermedia y extremo 3'. En analogía con los Flavivirus se asume que las proteínas estructurales están codificadas aproximadamente por la cuarta parte de la región codificante, representadas por los dominios E (envoltura) y C (core). Los 3/4 restantes del genoma codifican las proteínas no estructurales (NS), llamados dominios NS2, NS3, NS4 y NS5.

Así, las proteínas virales codificadas e identificadas en el momento actual son:

A).- Proteínas estructurales:

- * Dominio C: codifica la proteína de la nucleocápside, de 22 Kd (proteína del Core).
- * Dominio E1: codifica la glicoproteína de envoltura de 35 Kd (gp35).
- * Dominio NS1 /E2: codifica la glicoproteína de envoltura de 70 Kd (gp72) y una proteína no glicosilada p19.

B).- Proteínas no estructurales:

- * Dominio NS2: codifica una proteína de 23 Kd muy hidrófoba y asociada a membranas celulares, cuya función es la de anclaje a estas.
- * Dominio NS3: codifica una proteína soluble de 60 Kd, con dos actividades enzimáticas helicasa, importante en el proceso de replicación, y proteasa que interviene en el procesamiento de la poliproteína precursora.
- * Dominio NS4: codifica una proteína de 363 a.a. y 52 Kd muy hidrófoba que parece tener también función de anclaje a la membrana celular.
- * Dominio NS5: es multi funcional, codifica una proteína de 116 Kd, cuya función es de polimerasa RNA dependiente, encargada de la replicación del genoma viral.

Para que se produzca la proteólisis de la poliproteína precursora codificada por el extremo 5' se necesita de una actividad serín proteinasa (codificada por la región NS3) y de actividad autocatalítica con característica metaloproteinasa (codificada por NS3 y NS2). Es muy importante el conocimiento de estas actividades enzimáticas responsables del procesamiento de la proteína precursora, ya que podría manipularse con fines terapéuticos.

Existen pequeñas homologías entre los nucleótidos del genoma del VHC y los de ciertos virus de la familia de los flavivirus humanos, de pestivirus y de plantivirus. Sin embargo, la región 5' terminal del genoma es altamente homóloga (45 al 90%) con la región equivalente de los pestivirus. Esto sugiere que el VHC puede ser una evolución de los pestivirus o de los flavivirus o pariente cercano de

los mismos. Además el genoma del VHC al igual que los flavivirus y los pestivirus, codifica una única poliproteína a partir de la que se generan las diferentes proteínas individuales.

Con respecto al mecanismo de transducción del RNA viral para producir la poliproteína precursora, parece ser que se inicia siguiendo un mecanismo similar al de los picornavirus, uniéndose los ribosomas a secuencias internas de la región 5'.

1.2.2.- DIVERSIDAD Y MUTAGENIDAD VIRAL

Durante años se cuestionaba si la hepatitis vírica NoA NoB estaba causada por uno o más agentes víricos. Existían evidencias para sospechar que de inóculos de distinta procedencia se obtienen diferentes tiempos de incubación (entre 2 y 26 semanas) (Dienstag y cols., 1985). Además, si a un chimpancé con hepatitis crónica C se le inocula otro virus NoA NoB a veces se produce un nuevo cuadro de hepatitis. Por otra parte, existen diferentes alteraciones morfológicas en los hepatocitos de estos animales, dependiendo del inóculo utilizado (Boletín Epidemiológico Semanal, 1991).

Con la aparición de técnicas que permiten el estudio del genoma viral se ha generado enorme cantidad de información sobre la secuencia de nucleótidos de los diferentes virus de hepatitis aislados. Así por ejemplo, comparando el virus aislado en Japón (VHC-JI) con la secuencia del original en los Estados Unidos (VHC-I) se observan diferencias en la secuencia de las regiones NS3, NS4 y NS5 (Han JH, 1991). Al mismo tiempo se publicaron las secuencias (del extremo 5' terminal al 3') del VHC-I y de dos virus aislados en Japón (el VHC-J y el BK). Los virus japoneses tienen una secuencia de polipéptidos similares (>del 90%), pero no son tan homólogos con el VHC-I americano; esto confirmará la existencia de distintos tipos de virus de hepatitis C.

Posteriormente se han aislado otros diferentes tipos de virus. Analizándolos y comparándolos entre sí, se aprecian secuencias homólogas entre las proteínas de los diferentes virus aislados. Esto permitió clasificarlos en 3 grupos básicos, subtipos: VHC I, II y III que difieren en sus patrones de distribución geográfica,

posiblemente en su infectividad, historia natural de la enfermedad y por último, respuesta al tratamiento.

En 1992 Okamoto introdujo una pequeña variación y clasificó los genotipos del VHC en cuatro tipos (I,II,III y IV) (Okamoto H. et al, 1992). Posteriormente, en 1993 Simmonds analizando filogenéticamente los genomas de VHC que se han clonado y secuenciado en las distintas partes del mundo, indicó la existencia de, al menos, seis genotipos diferentes (Simmonds P. et al, 1993). No obstante ambas clasificaciones son superponibles como se observa en la tabla 1.3.

Tabla 1.3.

CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LOS GENOTIPOS DEL VHC

Okamoto	I	II	III	IV					
Simmonds	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4	5	6
VHC aislados	VHC I	VHC BK	HCJ6	HCJ8	Ebl	Ebl	EGI	SA3	HKI
	VHCH	VHCJ				Ta	Tb		
		VHC-T							
		VHC-JK							
		VHC-ES							

Pueden observarse secuencias similares entre proteínas del mismo grupo de virus o entre diferentes grupos. Por ejemplo existe un 99-100% de homologías entre las proteínas del grupo I en la región NS5 y un 95-100% de homologías

entre las proteínas del grupo II. El grado de homología para NS5 entre el grupo I y el grupo II es de sólo el 84 al 88%. Una excepción es la nucleocápside que está altamente conservada en todo el grupo I y II.

Merece la pena apuntar que la supuesta envuelta vírica codificada por los genes de EI, E2 y NSI presenta una sustancial variación en los aminoácidos del grupo I y grupo II, la región NS2 presenta mayor grado de heterogeneidad, las regiones C, NS3, NS4 y NS5 presentan mayor grado de conservación entre los grupos; la proteína GP72 (codificada por los genes de la región E2/NSI) contiene una región N-terminal hipervariable compuesta por 30 aminoácidos que es diferente en casi todos los virus aislados. Esta variabilidad en la envuelta proteica viral puede ser consecuencia de una gran selección para protegerse de los linfocitos B o T y puede ser un mecanismo de defensa similar al que ocurre con la envuelta proteica del virus I de la inmunodeficiencia humana (VIH); la importancia clínica de este descubrimiento es múltiple, por ejemplo, en cuanto a integraciones entre los diferentes grupos de virus, la evolución a la cronicidad, el desarrollo de vacunas y la posibilidad de múltiples infecciones producidas por diferentes agentes víricos.

Los virus de los grupos I, II y III pueden ser observados en Japón, mientras que hasta ahora prácticamente solo se han observado casos de hepatitis por virus del grupo I en Estados Unidos. En Europa han sido múltiples los genotipos identificados; recientemente, en 1995, en la Fundación Jimenez Díaz, Carreño y cols, han descrito una variante española del virus que difiere estructuralmente en un 20% del americano y un 10% del japonés. Pertenería al grupo I y dentro de éste al genotipo II o 1b de la clasificación de Simmonds (Bartolomé J. 1993a), aunque existe dentro de la población española una variante subtípica local (VHC-ES) (Carreño V. y cols, 1995).

Esta variabilidad genética no determina una gran variabilidad en la capacidad codificadora de las diferentes regiones del genoma; en la actualidad se piensa que este virus RNA va mutando de enfermo en enfermo e incluso estas mutaciones se producen también en el propio paciente a lo largo del tiempo, mecanismo que está posiblemente relacionado con la capacidad del VHC para

eludir la respuesta inmune del huésped y perpetuar la infección. La gran capacidad de mutación del RNA-VHC es inherente a todos los virus cuyo genoma es un RNA ya que, las enzimas encargadas de la replicación de los virus RNA (RNA polimerasas RNA dependientes y transcriptasas reversas) carecen de la actividad "correctora de pruebas" que tienen las DNA polimerasas DNA dependientes, esta actividad es capaz de reconocer a un nucleótido incorporado en un lugar erróneo del DNA y cambiarlo por el nucleótido correcto.

Haciendo estudios secuenciales del genoma del VHC, se ha establecido que la tasa de mutación del RNA viral es de $1,92 \times 1000$ cambios en cada posición del genoma y por año; sin embargo, se comprobó que no todas las regiones del VHC tienen la misma capacidad de mutar, así, la región del genoma con mayor tasa de mutación es la NS 1 mientras que la que tiene menor tasa es la 5' UTR. (Bartolomé J. 1993a)

Un problema importante derivado de la variabilidad genética del VHC es el desarrollo de vacunas efectivas frente al virus. En otros miembros de la familia Flaviviridae se ha comprobado que las proteínas E y NS1 inducen en ratones la producción de anticuerpos neutralizantes con actividad protectora. Sin embargo, en el VHC ésta es la región con mayor variabilidad genética y se desconoce si existen anticuerpos neutralizantes.

1.2.3.- MECANISMOS DE REPLICACIÓN VIRAL

Se piensa que el virus se replica a través de un RNA de polaridad negativa, complementario al RNA genómico o antígenómico (Rice C, 1985; Chambers T, 1987), al igual que los Flavivirus y Pestivirus sin que existan intermediarios replicativos de DNA. Así, en el hígado de pacientes con hepatitis crónica por virus C, en los que se detecta el RNA viral en suero, se encuentra mediante la PCR tanto el RNA-VHC de polaridad positiva como el RNA-VHC de polaridad negativa o antígenómico (Fong TL, 1991; Takehara T, 1992); confirmandose este hallazgo también mediante técnicas de hibridación "in situ" (Sherker AH, 1993, Nouri-Aria KT, 1993). Además no se ha encontrado actividad de transcriptasa inversa en hígados infectados por VHC, por lo que parece poco probable la integración viral

en el genoma de los hepatocitos del huésped (Sheila Sherlock, 1993).

Tras la entrada del VHC en el hepatocito, el RNA genómico sirve de molde tanto para la síntesis de RNA antigenómico como para la de las proteínas virales. En el proceso de ensamblaje las proteínas virales engloban el RNA genómico y forman la partícula viral que se libera de la célula. Se ha sugerido la posibilidad de que el RNA antigenómico sea también englobado para formar el virión. Esta hipótesis se basa en la detección de RNA-VHC antigenómico en suero de pacientes crónicamente infectados.

1.2.4.- VIRUS C DE LA HEPATITIS Y LOCALIZACIÓN EXTRAHEPÁTICA

Además de ser hepatotrópico el VHC es linfotrópico pues se ha comprobado, mediante la aplicación de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la existencia de RNA de polaridad genómica y antigenómica (signo de replicación activa) en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con hepatitis crónica C (Zignego AI, 1992) y en diferentes subpoblaciones de monocitos/macrófagos (Bouffard P, 1992), linfocitos B (Artini M, 1992; Müller HM, 1993) y linfocitos T (Ahmed R, 1991).

Sin embargo no existen evidencias que indiquen que los linfocitos infectados por VHC liberen partículas virales a la sangre periférica (Bartolomé J, y cols. 1993b). Esta colonización de CMSP podría ser utilizada por el virus para escapar de la destrucción por el sistema inmune y establecer infecciones crónicas.

En cuanto a la concentración del virus en esta localización se ha publicado que es significativamente menor en CMSP que en suero e hígado (Cotler SJ, y cols, 1996; Rabinovitz M, y cols, 1996). Este factor puede tener doble significación pues, si cuantitativamente se encuentra en menor concentración, supondría la desaparición precoz del virus de las CMSP en comparación con el hígado y suero. Pero, por otro lado, también podría considerarse que su erradicación en CMSP va a ser más difícil, puesto que, como ya se ha dicho, es en ellas donde escapa a la actuación del sistema inmune.

El tropismo del VHC por las CMSP presenta varias implicaciones. Así, por un lado las CMSP podrían actuar como reservorio del virus, por ejemplo, en

situaciones de recurrencia después de un trasplante hepático (Ahmed R, y cols, 1991), así como en la reactivación de la enfermedad que se observa en los pacientes sometidos a terapia antiviral tras la suspensión de la misma. Esto se relacionaría con la capacidad de replicación del VHC en células mononucleares (Davis GL, y cols, 1989; Di Bisceglie AM, y cols, 1989), así como con la disminución en la capacidad de síntesis de diversas citoquinas (factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón gamma) que están implicadas en la activación de la enzima 2',5'-oligoadenilato sintetasa que media la respuesta en una célula infectada por un virus (Wong K, y cols, 1987).

Por otro lado, la segunda implicación sería la selección de variantes del VHC durante el curso de la infección ya que el virus, para escapar de la presión del sistema inmune, sería capaz de presentar dichas variantes con diferente tropismo y capacidad de infectar CMSP u otros tejidos (Ahmed R, y cols, 1991).

Igualmente se ha encontrado el genoma viral VHC en saliva (Wang JT y cols 1991) aunque en menor concentración que en la sangre. Este hecho puede ser debido a la presencia de altas concentraciones de partículas virales circulantes en suero que de ahí son exportados a otros fluidos corporales, como es el caso de la saliva.

No se ha encontrado por técnicas de PCR el genoma viral VHC en muestras del líquido peritoneal, semen, orina, heces o secreciones vaginales de pacientes con hepatitis C crónica y con PCR positiva en suero (Alberda y cols, 1993; Hsu HH y cols, 1991; Fried MW, y cols, 1992, Demelia L, y cols, 1993). Tampoco se ha detectado mediante técnicas de PCR su presencia en la leche materna de madres infectadas (Navas S, 1993).

Recientemente se ha detectado mediante PCR la presencia del RNA-VHC en la piel de un paciente crónicamente infectado por el VHC, con vasculitis cutánea y crioglobulinemia (Durand JM, y cols, 1993).

Por último, una vía abierta a estudio es el tejido nervioso, puesto que en él se ha descrito la capacidad de infección por parte de determinados flavivirus (Chambers T, y cols, 1987).

1.3.- HISTORIA NATURAL DE LA HEPATITIS VÍRICA POR VHC

En general la hepatitis vírica presenta una gran variabilidad en cuanto a su presentación, evolución y pronóstico que viene determinada básicamente por el tipo de virus implicado y por factores dependientes del sujeto que sufre la infección.

Tras la llegada del virus al hígado de un sujeto susceptible, ocurre la replicación viral, la puesta en marcha de los mecanismos defensivos de la respuesta inmune, el daño hepatocelular, y la eliminación del virus o su persistencia. El hígado del paciente puede resultar dañado de forma residual, mantener un proceso inflamatorio más o menos activo, evolucionar a cirrosis hepática o incluso desarrollar una neoplasia hepática.

En una infección aguda se puede distinguir: un período de INCUBACIÓN que oscila entre 2 y 26 semanas para el virus C. El período de PRODROMOS es el que transcurre entre la incubación y la aparición de ictericia, el paciente presenta un cuadro "típico" de cansancio, inapetencia y malestar abdominal frecuentemente referido a hipocondrio derecho, este cuadro clínico puede no existir o presentarse de forma muy atenuada o inaparente. Durante este período, además, aparece la elevación de los enzimas celulares liberados tras la destrucción de los hepatocitos. Las transaminasas son enzimas de transferencia que catalizan el paso de un grupo amino de un aminoácido a un cetoácido dando lugar a aminoácidos distintos de los originales, se han identificado en el organismo más de 60 reacciones distintas de transaminación, con sus correspondientes enzimas específicas siendo las de más interés clínico la Glutámico-oxalacético (GOT) o aspartato-aminotransferasa, y la glutámico-pirúvico (GPT) o alanil-aminotransferasa. La GOT es una transaminasa citoplásmica y mitocondrial del hígado, cerebro, pulmón, músculo estriado, corazón, riñón, principalmente, y la GPT es más específica del citoplasma del hepatocito. Las transaminasas GOT

y GPT se elevan en grado variable, y en general más en el caso de la GPT; las enzimas de colostasis (fosfatasa alcalina y gamma glutamil transpeptidasa o GGT) se elevan débilmente aun cuando no existe un patrón constante (Farreras-Rozman, 1991). La aparición de la ICTERICIA, de duración variable, entre 2 y 12 semanas, coincide curiosamente con una mejoría subjetiva del paciente, la bilirrubina sérica, como es lógico, se eleva en forma proporcional al grado de ictericia visible. Durante la CONVALECENCIA, el paciente recupera el apetito, desaparece la ictericia y la astenia, y si la evolución es favorable el paciente puede quedar asintomático y sin signos de enfermedad, aunque este hecho, como veremos, puede no ser definitivo y no implica necesariamente curación.

1.3.1.- HEPATITIS AGUDA POR VHC

Existen varias formas evolutivas en la hepatitis aguda: la forma ANICTERICA es la más frecuente, probablemente más del 70% de las hepatitis agudas por VHC se presentan sin ictericia; la forma COLOSTATICA de hepatitis aguda cursa con ictericia marcada, orinas colúricas y prurito y su curso suele ser más prolongado que en la forma "clásica". En la hepatitis PROLONGADA o BIFASICA existe una mayor duración de algunos o varios de los períodos clínicos descritos, sin que este hecho determine necesariamente una evolución desfavorable; en otros casos, que se incluyen como hepatitis aguda prolongada, se asiste a una fluctuación en los niveles de transaminasas, incluso con varios picos tras su descenso o normalización.

La elevación de transaminasas puede seguir tres patrones evolutivos: monofásico, multifásico (fluctuante) o elevación en meseta. El menos frecuente es el curso monofásico "clásico", con descenso y normalización clínica y analítica en menos de 6 meses; en el tipo polifásico el pico enzimático puede durar semanas o incluso meses, siendo difícil determinar la evolución de la enfermedad hacia curación o cronicidad, pero parece relacionarse con la aparición de hepatitis crónica en cerca del 87%; en el tercer grupo, los niveles de GOT/GPT adoptan una morfología en "meseta" de elevación moderada. Estas evoluciones sí parecen

tener implicación pronóstica de forma que cronifican hasta el 95% de las infecciones agudas VHC con perfil en meseta, frente a 40% de las de curso monofásico.

En la hepatitis aguda GRAVE aparecen signos de afectación importante hepática desde el principio de la enfermedad o durante una hepatitis de curso aparentemente normal. El paciente presenta un aumento de la ictericia, afectación del estado general o incluso encefalopatía; la enfermedad puede regresar, pero frecuentemente evoluciona a cirrosis como resultado de la extensa necrosis hepática.

La hepatitis FULMINANTE reúne las características de un fracaso funcional hepático: ictericia, encefalopatía y signos de insuficiencia hepatocelular con caída de los factores de coagulación de síntesis hepática (marcado descenso de la actividad de protrombina), hipoglucemia, síndrome hepatorrenal, etc. Puede aparecer en infecciones por VHC y sobre todo en coinfección por virus B. Su pronóstico es nefasto con tasas de supervivencia inferiores al 10% y constituye una de las indicaciones del trasplante hepático si el paciente reúne los criterios adecuados.

1.3.1.1.- Características clínicas

Todos los virus causantes de hepatitis aguda provocan un cuadro clínico e histológico similar, debiendo ser distinguidos por estudios serológicos o por criterios epidemiológicos.

La hepatitis C es más frecuente a partir de la tercera década de la vida, incrementándose hasta los 40 años, descendiendo posteriormente; este hecho se podría explicar por una menor exposición al virus en edades avanzadas, mortalidad por enfermedad hepática o por desaparición de los anticuerpos; también se han descrito casos en la edad pediátrica. Es más frecuente en el sexo masculino, en España el 66.5% son varones. No existen diferencias en el cuadro clínico según la vía de contagio.

La hepatitis C tiene un período de incubación amplio, de 2 a 26 semanas, siendo más corto (4 a 7 días) en aquellos pacientes que recibieron factores de coagulación. Al principio de la enfermedad existe un período ventana en el que no se detecta antiVHC y que puede durar hasta 8 meses (Santiago Ruiz; 1992)

La mayoría de los pacientes afectados están asintomáticos, con un 75% de casos anictéricos. La hepatitis fulminante es infrecuente (1%) sobre todo en las formas asociadas a transfusiones sanguíneas; si se presenta aparece más tardíamente que en el caso de las hepatitis A y B y con mayor mortalidad, con frecuencia se asocia a hepatitis B, a VIH o a enfermedades terminales.

Los síntomas más frecuentes son la astenia y el dolor hipocondrio derecho. Se ha descrito la aparición de reacciones urticariformes y eritema multiforme coincidiendo con la seroconversión al VHC entre las 10 y 20 semanas de la inoculación; también eritema nodoso asociado a trombocitopenia. Las cifras de transaminasas se elevan con valores medios de 600 ± 550 U.I. especialmente para el caso de la GPT; con un patrón episódico y fluctuante y periodos de elevación que se intercalan con otros de cifras casi normales (Santiago G, y cols. 1992).

La BIOPSIA HEPATICA se utiliza poco en el diagnóstico de hepatitis aguda, ya que los datos clínicos suelen ser suficientes para hacerlo de modo correcto y las alteraciones de la coagulación que presentan los pacientes son una contraindicación (excepto si se obtiene la biopsia por vía transyugular).

Las características anatomopatológicas de las hepatitis agudas se describen en el capítulo de Histopatología de las hepatitis virales.

El DIAGNOSTICO de la enfermedad aguda requiere la exclusión de otras entidades al no disponer de marcadores serológicos de fase aguda. Es necesario descartar una hepatitis viral A, B, D, E, por Citomegalovirus o virus Epstein Barr, una hepatitis alcohólica o por fármacos hepatotóxicos, enfermedades del tracto biliar, desórdenes metabólicos o hepatitis de origen autoinmune. La oportunidad de la determinación de anticuerpos y del genoma del VHC será estudiada en el apartado de Diagnóstico de infección aguda.

1.3.2.- HEPATITIS CRÓNICA POR VHC

La identificación del virus C de la hepatitis y la disponibilidad de marcadores séricos de anticuerpos contra antígenos estructurales y no estructurales ha modificado nuestros conocimientos sobre las hepatitis crónicas de causa oscura; de hecho, el VHC es la causa más frecuente de hepatitis crónica (más del 70%). Esta hepatitis tiene muy poca tendencia a remitir de forma espontánea, aunque presenta un cuadro clínico con escasos síntomas o ausencia total de ellos, así la mayoría de los casos de hepatitis crónica por VHC son descubiertos de forma casual en el curso de una analítica de rutina, en base a valores de transaminasas moderadamente elevadas y que son el inicio de una investigación diagnóstica.

Alrededor del 40-50% de las hepatitis C agudas evolucionan a la cronicidad y casi siempre de forma asintomática o con escasa expresividad clínica. Esta evolución puede durar entre 10 y 30 años. Debe considerarse que una hepatitis aguda ha cronificado cuando la elevación de las transaminasas se prolonga más allá de 6 meses, tiempo a partir del cual deberá considerarse indicación de una biopsia para obtener diagnóstico anatomopatológico (Serra MA, 1992).

Analizando grupos de riesgo se observan diferencias importantes, ya que las hepatitis en los ADVP se cronifican con mayor frecuencia que en los enfermos postransfusionales o en las hepatitis C esporádicas. Sin embargo, el 20% evolucionan a la cirrosis hepática y un alto porcentaje a hepatocarcinoma (Tsukuma H, 1993), en el resto de los pacientes la enfermedad se mantiene aparentemente estable, si bien, el pronóstico es sumamente difícil de establecer. En los pacientes con cirrosis asintomática es común, aunque no constante, encontrar estigmas cutáneos de hepatopatía crónica, hepatomegalia de consistencia aumentada, muy a menudo causada por un crecimiento excesivo de lóbulo izquierdo hepático, así como un bazo aumentado moderadamente de tamaño. Ciertas alteraciones de las pruebas de laboratorio como la disminución de la tasa de protrombina, el aumento de gammaglobulina, el aumento discreto de la

bilirrubina, la leucopenia y la trombopenia, así como la inversión del cociente GOT/GPT son muy comunes en los pacientes con cirrosis y su constatación sugiere este diagnóstico.

La evolución a cirrosis se admite en un 20-30%, y parece ocurrir en pacientes con hepatitis crónica de muy larga evolución, en aquellos que presentan puentes de necrosis en la biopsia hepática y se relacionan, al parecer, con niveles altos de replicación del virus C.

La cronificación de la hepatitis por VHC parece determinada muy especialmente por los mecanismos de la respuesta inmune del paciente a la infección, y se basaría en una incapacidad del mismo para eliminar los hepatocitos infectados de una forma plenamente eficaz. La gran capacidad mutante del virus C podría relacionarse con la posibilidad de evadir la respuesta inmunológica del paciente o interferirla, independientemente de que factores intrínsecos al huésped hagan fracasar la eliminación total del virus y favorezcan el paso a la cronicidad.

Se han investigado factores que pudieran favorecer la evolución hacia la cronicidad de una hepatitis VHC aguda, destacando la edad (inferior a 39 años), el sexo masculino y anti VHC positivo; no se encontró relación con la evolución a la cronicidad en la ruta de infección, niveles máximos de transaminasas, de bilirrubina, nivel sérico de gammaglobulina o gravedad de la lesión histológica en la fase aguda (Rodríguez M, 1992).

1.3.2.1.- Características clínicas

La hepatitis C crónica suele ser asintomática, presentándose en algunos casos astenia y excepcionalmente ictericia. Se han descrito algunas alteraciones hematológicas como anemia transitoria, granulocitopenia, trombocitopenia, linfocitosis atípica o anemia aplásica. Alrededor del 50% de los pacientes muestran elevación persistente o fluctuante de las transaminasas. No hay que olvidar que se han practicado biopsias hepáticas en pacientes asintomáticos con

transaminasas normales, pero con anti VHC persistentemente positivo, mostrando un alto porcentaje de hepatitis crónicas a pesar de no tener evidencia de enfermedad. En estos casos, un marcador sensitivo para detectar enfermedad es la determinación del ARN-VHC en el suero (Alberti A, 1992). Este fenómeno podría cambiar la idea de la existencia de "verdaderos portadores asintomáticos" del VHC.

1.3.3.- HEPATITIS C Y HEPATOCARCINOMA

El virus de la hepatitis C es el principal agente causal de las hepatitis crónicas de origen vírico, generalmente con carácter grave y progresivo, y que se asocia frecuentemente con el desarrollo de cirrosis y/o hepatocarcinoma (Dienstag JL, 1983; Tsukuma H, 1993).

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la neoplasia hepática más frecuente. En España la prevalencia es intermedia si comparamos con áreas geográficas de alta prevalencia (Sudeste Asiático y África Subsahariana). Se ha documentado un aumento de la incidencia del CHC en los últimos años (Castells L y cols, 1993), siendo la incidencia estimada en Cataluña de 3.8 casos por cien mil en mujeres y de 6.7 por cien mil en varones (similar a las de Japón o Europa Mediterránea). La evolución de la hepatitis crónica a hepatocarcinoma ocurre entre los 7 a 25 años de instaurada la enfermedad, siendo para algunos autores el hepatocarcinoma la primera causa de muerte en estos pacientes (Carnicer F, y cols, 1993).

La relación etiopatogénica de los virus de hepatitis con el carcinoma hepatocelular (CHC) parece demostrada en base a datos epidemiológicos, estudios moleculares y modelos animales infectados por virus. Para el caso del VHC la alta prevalencia de anti VHC en los pacientes que padecen carcinoma hepático sugiere su implicación.

Se ha demostrado una asociación entre el virus de la hepatitis C y el carcinoma hepatocelular: el anti VHC se detectó en Italia en el 65% de los pacientes con hepatocarcinoma, en España en el 75%, en Francia en el 58.2% y en Japón en el 76.2%; en EEUU y Reino Unido la proporción es inferior (Sheila Sherlock, 1993). En general podemos decir que el anticuerpo contra el VHC

aparece en el 70% de los pacientes con cáncer primitivo de hígado, esto indica que el virus posee un marcado carácter oncogénico, por sí mismo, o en asociación como la coinfección por virus B. El anti VHC aparece en el 40-70% de los casos de carcinoma hepatocelular HBs Ag negativo.

El desarrollo del carcinoma hepatocelular ha sido perfectamente documentado en pacientes con hepatitis crónica por VHC tras muchos años de evolución. Se desconocen los mecanismos patogénicos íntimos que determinan la aparición de tumor, es posible que la regeneración hepatocelular continuada, como mecanismo reparador fisiológico de la necrosis hepatocelular ocasionada por muchos años de infección crónica vírica, determine en alteraciones carcinogénicas del genoma de los hepatocitos. Sin embargo, un pequeño número de pacientes (3%) anti VHC positivo con CHC no tienen cirrosis, lo que sugiere que puede haber algún efecto directo del VHC en el desarrollo de hepatocarcinoma.

El VHC podría tener un efecto oncogénico directo, la detección específica de la cadena genómica y antigenómica del VHC por PCR ha demostrado que ambas se encuentran tanto en el hígado como en el tejido tumoral en proporción y cantidades similares. Este dato sugiere que el VHC se replica en células cancerosas (Sherlock S, 1993).

La prevalencia del anti VHC en pacientes afectados de cirrosis alcohólica y carcinoma hepatocelular (76%) resulta significativamente mayor que la observada en la cirrosis alcohólica sin neoplasia (38,7%); por tanto, es posible que el VHC sea un factor clave determinante del desarrollo de cáncer celular hepático en pacientes con cirrosis alcohólica. Así autores japoneses estiman que más de la mitad de todos los casos de carcinoma hepatocelular estudiados están relacionados con infección por virus C; esta alta proporción es debida a que un gran número de pacientes con hepatitis crónica C han derivado a cirrosis. En un estudio epidemiológico realizado en el área mediterránea, la edad, el sexo masculino y la positividad al anti VHC, eran los únicos factores de riesgo que se correlacionaban de forma significativa con el desarrollo de CHC en la cirrosis.

El 50% de prevalencia de antiVHC en enfermos con carcinoma

hepatocelular y positividad del HBsAg indicarían el origen de la neoplasia a partir de una acción oncogénica combinada de ambos virus. Existe un riesgo mucho mayor de evolución desde la hepatitis crónica a la cirrosis al CHC cuando existía doble infección por VHB y VHC (Bruix J, 1989).

Se han descrito seis casos de Porfiria Cutánea Tarda (PCT) Anti VHC positivos complicados con hepatoma. Dado que la alteración hepática de la PCT evoluciona a hepatocarcinoma, tendríamos que considerar si a los factores de riesgo conocidos en la PCT (cirrosis, edad superior a 50 años y sexo masculino) para desarrollar esta neoplasia haya que añadir el VHC en el futuro (Santos J, y cols, 1992).

La tabla 1.4. muestra la prevalencia del antiVHC en los siguientes grupos de pacientes:

Tabla 1.4.

PREVALENCIA DEL ANTI-VHC

- Pacientes con hepatitis crónica o cirrosis e historia de transfusiones sanguíneas.....	62%
- Pacientes con hepatocarcinoma.....	65-75%
- Pacientes cirróticos-alcohólicos.....	55%
- Pacientes con cirrosis alcohólica y hepato- carcinoma.....	76%
- Asociación de hepatocarcinoma y HBsAg.....	50%

El mecanismo patogénico íntimo por el cual el VHC provoca la degeneración carcinomatosa del hepatocito no es conocido, el genoma del VHC es un RNA de polaridad positiva que no se replica a través de un intermediario de DNA, al carecer de transcriptasa inversa, es improbable que al contrario de lo que sucede con el VHB, pueda integrar su genoma en el del hepatocito infectado, por lo que se considera más plausible que sea la cirrosis quien ocasiona el factor

patogénico de mayor peso específico. Aunque no se descarta totalmente que el virus podría originar "per se" la activación de oncogenes que promuevan la transformación maligna (Sherlock S, 1993).

En resumen, los estudios con marcadores de VHC demuestran evidencias de infección en más del 70% de pacientes con CHC, y existen importantes diferencias geográficas. Esta proporción aumenta al considerar otras hepatopatías crónicas, como la alcohólica, o cuando coexiste infección por virus B y virus C. El mecanismo implicado no es conocido: el genoma del VHC es un RNA cuya integración en el genoma del hepatocito parece improbable pues no se ha demostrado actividad de transcriptasa inversa en el hígado de pacientes infectados por este virus. El VHC parece capaz de replicarse tanto en hepatocitos tumorales como no tumorales, y su papel en el CHC podría estar relacionado con una actividad oncogénica aún no conocida.

1.3.4.- HEPATITIS C Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Se demostró una prevalencia de anti VHC positivos de un 44% en la hepatitis crónica autoinmune (HCAi) tipo I y un 86% en la de tipo II (Esteban JI, y cols, 1989). Estudios posteriores indicaron que el suero de pacientes con HCAi podría contener un componente responsable de un resultado falsamente positivo para el antiVHC durante un brote activo de la enfermedad (Suarez A, y cols, 1992). En la cirrosis biliar primaria, también de patogenia autoinmune, se podría producir un fenómeno similar. También se ha comunicado asociación entre infección por VHC y ciertas formas de glomerulonefritis membrano-proliferativa (Carnicer F y cols, 1993).

La infección crónica por virus C se puede distinguir de la HCAi pues, en esta última, la respuesta a los corticoides es buena a diferencia de la afectación por virus C.

1.3.4.1.- Hepatitis C y Síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune debida al infiltrado

linfocitario crónico de las glándulas salivares y lacrimales, produciéndose su destrucción. Se comparó el aspecto histológico de las glándulas salivares de 28 pacientes con hepatitis o cirrosis con el de 20 controles fallecidos (Haddad J, cols, 1992). La presencia de cambios histológicos característicos del Síndrome de Sjögren fue significativamente más frecuente en pacientes con infección por VHC (57%) en comparación con los controles (5%).

Hay muchas formas por las que la infección VHC puede producir sialoadenitis, se ha comunicado la presencia de anticuerpo antimúsculo liso o antimicrosomales hígado-riñón durante la infección por VHC, lo cual se interpretó como secundario a fenómenos autoinmunes. También pueden detectarse anticuerpos frente a epítomos derivados del huésped en fases tempranas de la hepatitis por VHC. Por tanto, una reacción autoinmune podría explicar el infiltrado linfocitario incluso en órganos no afectados por el VHC si contienen un epítomo diana. Pueden detectarse también secuencias genómicas del VHC en células mononucleares en sangre de pacientes infectados que también podrían dar lugar a respuestas inmunes anómalas.

1.3.4.2.- Hepatitis C y anemia aplásica

Varias líneas de investigación han conseguido demostrar la asociación entre enfermedades virales, con niveles elevados de linfocitos T supresores circulantes, y la presencia de anemia aplásica. Este síndrome se presenta ante todo en varones jóvenes, con un cuadro clínico de hepatitis que precede en semanas o meses a los signos hematológicos. Se había sugerido la participación del VHC en la etiología de esta afección, basándose en las semejanzas estructurales de este agente con ciertos tipos de flavivirus como el de dengue, que provocan inmunosupresión e infección "in vitro" del tejido hematopoyético.

Se evaluaron 34 pacientes con anemia aplásica relacionada con hepatitis (Hibbs JR y cols, 1992a), a todos se les realizó la PCR, test de anticuerpos anti VHC e inmunotipificación de linfocitos citotóxicos activados, para detectar la presencia del virus de la hepatitis C en muestras de suero y médula ósea, (y de

hígado en el caso de los trasplantados). Los resultados del estudio señalan que el VHC muy raras veces puede hallarse en el plasma o en la médula ósea de los individuos que padecen hepatitis y aplasia, pero si se encuentra presente en los que recibieron múltiples transfusiones como tratamiento de esta última patología. Es importante seguir investigando hasta establecer cual es la principal etiología de este síndrome. Se sugiere que su origen puede estar relacionado con un modelo de mielosupresión como respuesta autoinmune a la infección viral o que el agente causal de este síndrome quizás sea un virus NoANoBNoC aún no descrito.

1.3.4.3.- Hepatitis C y Crioglobulinemias mixtas

EN 1991 se estudiaron 224 pacientes con crioglobulinemia mixta (Galli M, y cols, 1992). Se realizó la determinación del anti VHC por un ELISA de segunda generación, observándose una positividad de alrededor del 80%. Estos resultados fueron confirmados por RIBA en prácticamente todos los pacientes (99%). No existían diferencias significativas entre las formas esenciales y las secundarias, ni entre las crioglobulinemias tipo II y tipo III. Los resultados no fueron confirmados por PCR o biopsia hepática.

Sin embargo, un estudio posterior publicó que la infección por VHC se asocia a crioglobulinemia tipo II (Aguello V, y cols, 1992). El 42% de los enfermos fueron anti VHC positivos con test de segunda generación y en el 84% se detectó RNA-VHC en suero. Ambos, anti VHC y RNA VHC se demostraron a elevadas concentraciones en el crioprecipitado de dichos enfermos, sugiriendo un papel patogénico del VHC en la crioglobulinemia mixta.

1.4.- HISTOPATOLOGÍA DE LAS HEPATITIS VIRALES AGUDAS Y CRÓNICAS

Sabemos que la hepatitis viral es una infección primaria del hígado debida, en unos casos, a los ya conocidos agentes virales (hepatitis A, B o C), y a agentes desconocidos o en fase de caracterización en otros (tal es el caso de los virus GB-

A, GB-B y GB-C de reciente identificación). Estos agentes virales hepatotropos junto con los mencionados anteriormente (ver tabla 1.1) son capaces de producir inflamación hepática, favorecidos a veces por procesos que disminuyen la inmunidad, y dan lugar a hepatitis con características morfológicas bastante típicas.

Las lesiones básicas que producen en el hígado estos agentes virales actualmente están bien definidas:

A).- Inflamación: es una condición imprescindible para que se produzcan posteriormente lesiones más severas. Consiste en la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico linfo-plasmocitario que, virtualmente, queda limitado a los espacios porta.

B).- Necrosis: la infección del hepatocito por estos virus y su posterior desarrollo y multiplicación o replicación dentro de la célula hepática, incluye la presentación de antígenos virales a nivel de la membrana hepatocitaria por unas células llamadas Complejos de Histocompatibilidad tipo I. Los linfocitos T tipo K ("Killer" o asesinos) son atraídos por estos complejos que presentan los antígenos virales y son activados de tal modo que segregan unas sustancias llamadas "perforinas".

Las perforinas son unas proteínas que, una vez fijadas a la membrana del hepatocito, se acoplan formando microtúbulos que permiten el libre paso de agua e iones entre la célula y el medio, con la consiguiente hinchazón de la célula infectada y posterior ruptura.

Existen otros mecanismos que producen también necrosis celular, por lo que, en esquema, se puede hablar de tres tipos de necrosis: citolítica, picnótica y balonizante. Si bien el mecanismo por el que se produce la necrosis nos permite hablar de los tres tipos de necrosis mencionados, por la distribución de la misma dentro de la arquitectura hepática podemos hablar de:

* "Necrosis en sacabocados" o "piece meal necrosis", cuando la necrosis se produce en la zona periportal.-

* *“Necrosis lobulillar focal, cuando la necrosis se produce con distribución irregular dentro del lobulillo.*

* *“Necrosis centrozonal”, cuando la necrosis se produce alrededor de la vena central del lobulillo.*

C).- Fibrosis: *es una consecuencia posible aunque no siempre presente de la inflamación y la necrosis, ya que, algunas veces, se produce la restauración íntegra y no quedan secuelas.*

Sigue los mismos patrones de la inflamación y la necrosis. Así, la expansión fibrosa portal es la expresión de la fibrosis en su grado más leve, mientras que la formación de puentes es la expresión de la fibrosis en su grado más severo. Los puentes pueden ser de dos tipos: bien porto-portales, en el que la fibrosis une distintos espacios porta entre sí, bien porto-centrales, en que los puentes se extienden desde un espacio porta hasta la región centro-zonal del lobulillo hepático.

Las distintas distribuciones y combinaciones de las lesiones básicas descritas anteriormente, es decir, inflamación, necrosis y fibrosis, dan lugar a distintas entidades anatomoclínicas encuadrables en los siguientes diagnósticos:

1.4.1.- HEPATITIS SUBAGUDA

En la necropsia el hígado se encuentra disminuido de tamaño y, al corte, tiene un aspecto granular por la existencia de zonas de colapso. El hallazgo microscópico característico es la necrosis en puentes, ya sean porto-portales o porto-centrales. Junto a los septos de estroma colapsado por efecto de la necrosis hepatocelular, se pueden observar cordones de hepatocitos en regeneración.

La necrosis en puentes puede encontrarse en hepatitis agudas o subagudas que se recuperan totalmente sin secuelas, lo cual es especialmente frecuente en enfermos jóvenes.

1.4.2.- HEPATITIS FULMINANTE

Los cambios histológicos en la necrosis hepática masiva son similares, independientemente de la causa que los produzca, ya sea viral, tóxica o por hipersensibilidad. El aspecto del hígado en la necropsia varía según la duración de la supervivencia del enfermo; así, los enfermos que mueren en días presentan un hígado normal o muy escasamente reducido de tamaño, rojo oscuro, congestivo, y la cápsula puede ser lisa pero el parénquima es bando, no vital; con el transcurso de los días las áreas de necrosis pasan de amarillento-rojizas a verdosas, dependiendo del grado de hemorragia y de pigmento biliar. En los enfermos que sobreviven durante semanas se observa regeneración en forma de nódulos firmes, amarillento-verdosos, que protruyen en superficie, rodeados por zonas más blandas, de necrosis.

Histológicamente hay necrosis confluyente de hepatocitos, con destrucción de lóbulos enteros. La necrosis empieza centralmente y se extiende hacia la periferia del lóbulo, dejando algunas veces un anillo de hepatocitos viables alrededor del espacio porta.

Inicialmente la trama reticulínica se halla conservada. Los sinusoides están congestivos y son evidentes las células de Kupffer, conteniendo detritus celulares. Con el colapso de la trama reticulínica, los espacios porta tienden a confluir. A mediad que pasa el tiempo, se hace más evidente el infiltrado linfo-monocitario.

Las células que sobreviven alrededor del espacio porta muestran pigmento biliar.

1.4.3.- HEPATITIS AGUDA (HA)

Todos los virus causantes de hepatitis aguda provocan un cuadro clínico e histológico similar, debiendo ser distinguidos por estudios serológicos o por criterios epidemiológicos.

En la hepatitis aguda se produce la eliminación de las células infectadas por virus, generalmente por la intervención del sistema inmunitario, lo que conduce a la necrosis hepatocitaria y su posterior regeneración. En este tipo de hepatitis, por tanto, no se suelen detectar, componentes virales (antígenos) con

técnicas inmunohistoquímicas.

El cuadro morfológico observado habitualmente durante la hepatitis viral aguda consiste en hinchazón o balonización difusa, proliferación de células de Küpffer, aumento en el número de linfocitos y monocitos en el espacio porta y dentro de los sinusoides.

Así, durante la fase álgida de la enfermedad tienen lugar tres procesos simultáneos. El primero es el daño celular hepático reflejado en la degeneración hidrópica de los hepatocitos, cuyo citoplasma aparece ópticamente claro; este proceso es denominado como degeneración balonizante de los hepatocitos. La degeneración puede progresar a necrosis celular, siendo un patrón de necrosis típicamente focal en el lobulillo y más intenso alrededor de la vena central. La necrosis suele ser citolítica, observándose al microscopio óptico “desaparición” de hepatocitos individuales por técnicas especiales (técnica de la reticulina). También puede producirse otro tipo de necrosis, secundario a daño en la membrana celular, el citoplasma de la célula se condensa y se coagula, el núcleo se hace picnótico y desaparece y, finalmente, la célula es excretada al sinusoide como un cuerpo denso, eosinófilo, llamado “cuerpo de Councilman”.

El segundo fenómeno que se puede observar es el agrandamiento e hiperplasia de las células de Küpffer en los sinusoides, junto a la infiltración linfomonocitaria de los espacios porta. Los ductos biliares pueden proliferar y pueden acompañar el infiltrado linfomonocitario en los espacios porta algunos neutrófilos y eosinófilos.

El tercer componente del cuadro histológico de la hepatitis viral aguda es la regeneración. En parte debido a la balonización y en parte a la regeneración, la distribución trabecular de los hepatocitos desaparece y es substituida por cordones irregulares o por un “pavimento” de células, perdiéndose la relación habitual entre el hepatocito y el sinusoide.

El núcleo celular puede aparecer grande, con nucleolo evidente y puede evidenciarse binucleación ocasional en algunos hepatocitos. Raramente puede observarse alguna figura de mitosis.

Puede también existir colestasis intrahepática, ubicándose el pigmento

biliar tanto dentro del hepatocito como en las células de Kupffer o en el canalículo biliar. Aunque existen excepciones, la colestasis no suele ser prominente. Durante la fase de resolución se observa: a) regeneración hepatocelular (mitosis, multinucleación, etc.), y b) reacción inflamatoria de predominio macrofágico.

La clasificación histopatológica de las hepatitis agudas se basa en los patrones de necrosis, distinguiéndose 3 formas principales:

A).- Hepatitis aguda con focos de necrosis o HA lobulillar clásica: las lesiones histopatológicas de la HA son predominantemente lobulillares, produciéndose desorganización de las trabéculas de hepatocitos, y poca afectación de los espacios porta. **B).- Hepatitis aguda con puentes de necrosis:** las otras formas de hepatitis aguda se caracterizan por mostrar destrucción de grupos de células mas extensa. Si se produce necrosis confluyente que se extiende entre venas y espacios porta-zona 3 del acino de Reppaport se habla de HA con puentes de necrosis.

C).- Hepatitis aguda con necrosis panacinar: si la necrosis se extiende por todo el lobulillo (abarca también zonas 2 y 3) se habla de HA con necrosis panacinar; en este caso, cuando se afecta una parte considerable del hígado recibe el nombre de necrosis submasiva o masiva y se corresponde clínicamente con la hepatitis fulminante.

La evolución de la hepatitis aguda suele ser hacia la restitución, aunque puede complicarse con el desarrollo de una hepatitis crónica/cirrosis o hepatocarcinoma.

Cabe destacar el hecho de que en el estudio anatomopatológico de la biopsia hepática por virus C se describe, con más frecuencia que en otros tipos de hepatitis, la marcada presencia de cuerpos acidófilos, degeneración acidófila, infiltración de los sinusoides con células mononucleares, hipertrofia de las células de Küpffer, infiltración del área portal con linfocitos, daño de los conductos biliares y presencia de esteatosis microvesicular.

1.4.4.- HEPATITIS CRÓNICA (HC).

Se distinguen tres tipos de hepatitis crónica:

A).- Hepatitis crónica lobulillar: se designa así cuando se observan los cambios histológicos propios de la hepatitis aguda, osea, degeneración y necrosis hepatocelulares de máxima intensidad alrededor de las venas centrales, infiltración por células inflamatorias y proliferación de las células de Küpffer, en casos de hepatitis que no pueden considerarse agudos.

B).- Hepatitis crónica persistente: la característica histológica esencial es que la reacción inflamatoria (de predominio mononuclear) queda virtualmente limitada a los espacios porta. Estos pueden aparecer ensanchados, pero no existe rotura de su limitante externa. La arquitectura lobulillar permanece intacta y las alteraciones intralobulillares suelen ser mínimas, aunque pueden observarse pequeños focos de necrosis hepatocelular e inflamación, así como células de Küpffer hiperplásicas.

No existe necrosis erosiva ni extensión de los infiltrados inflamatorios desde el espacio porta al lobulillo.

C).- Hepatitis crónica activa: presenta los siguientes datos histológicos esenciales: necrosis erosiva, infiltración linfocítica y fibrosis.

La necrosis erosiva se considera como el mecanismo patogenético para la progresión de la hepatitis crónica activa (HCA) y su eventual evolución a cirrosis. Se define como la destrucción de hepatocitos en la interfase entre el parénquima hepático y el tejido conjuntivo, y suele asociarse a un infiltrado inflamatorio crónico linfoplasmocitario.

Pronto en el curso de la enfermedad los espacios porta se agrandan por la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico linfoplasmocitario. La necrosis erosiva da lugar a fibrosis que, a su vez, puede dar lugar a puentes porto-portales y, finalmente, a cirrosis.

La necrosis focal intralobulillar, típica de la hepatitis aguda, se observa de ocasionalmente en la hepatitis crónica activa, no siendo en este caso de distribución centro-zonal.

La necrosis hepática en puentes puede aparecer como resultado de la necrosis confluyente de hepatocitos. El hallazgo de este tipo de necrosis hepática en puentes no es diagnóstico de hepatitis crónica activa, ya que puede ocurrir también en las hepatitis aguda y subaguda; sin embargo, en el contexto de otros datos de hepatitis crónica activa indica rápida progresión a cirrosis.

La HCA puede evolucionar a cirrosis muy lentamente en algunos casos, mientras que en otros la enfermedad progresa poco durante años. También se ha señalado regresión a HCP de forma espontánea o inducida por tratamiento (Ej. inmunosupresores).

Dependiendo del grado de actividad de la hepatitis crónica activa se distinguen tres tipos, los cuales se denominan: hepatitis crónica activa leve (**HCA leve**), hepatitis crónica activa moderada (**HCA moderada**) y hepatitis crónica activa intensa (**HCA intensa**).

La HEPATITIS CRÓNICA C presenta un modelo histológico, aunque no es diagnóstico, es útil para diferenciarlo de la hepatitis autoinmune y de la hepatitis B (Gerber MA, y cols, 1992).

En la hepatitis crónica por VHC, al igual que en otras hepatitis víricas, la lesión histológica consiste en un infiltrado panlobulillar con células mononucleares, necrosis de hepatocitos, hiperplasia de células de Küpffer y grado variable de colestasis. El hallazgo histológico más llamativo es la presencia de agregados linfoides o folículos en el tracto portal, tanto aislados como formando parte del infiltrado inflamatorio general de los tractos (Schever PJ, y cols, 1992). Suele destacar una escasez de componente inflamatorio, sobre todo en las formas muy evolucionadas.

Existe una intensa activación de las células de revestimiento sinusoidal y presencia de inclusiones grasas y cuerpos acidófilos en el parénquima acinar. Ocasionalmente aparecen lesiones de los conductos biliares consistentes en que las células de su revestimiento epitelial aparecen apiladas, sin que haya interrupciones de la membrana basal.

Los infiltrados linfoides pueden representar la clave de un posible mecanismo inmunológico del daño hepático en la infección crónica por VHC. Se pueden detectar folículos linfoides similares en la cirrosis biliar primaria y en las biopsias hepáticas de pacientes con hepatitis crónica B aunque con menor frecuencia y en general menos estructuradas (Schever PJ, y cols, 1992).

La esteatosis es predominantemente macrovesicular y se observa en el 75% de los casos; la necrosis en puentes (centroportal) se asocia a una enfermedad progresiva y a un peor pronóstico (Bach N, y cols, 1992).

Resumiendo, consideramos que el patrón común de una hepatitis crónica por virus C es el de una hepatitis crónica moderada con folículos linfoides, actividad lobulillar, inclusiones grasas y cuerpos acidófilos. El conjunto de todas estas características apoyan fuertemente la existencia de infección por VHC, aunque, en sí mismas, no sean diagnósticas.

La hepatitis crónica activa (HCA) es común cuando la enfermedad está asociada a transfusiones, la hepatitis crónica persistente (HCP) en las formas esporádicas. Al igual que en la enfermedad aguda, los signos morfológicos de la crónica están a menudo asociados a lesión de los conductos biliares y a depósito de grasa, diferenciándose de la hepatitis crónica B en la ausencia de células en vidrio esmerilado. La inflamación lobulillar es menor que en la hepatitis crónica B, observándose inflamación portal y mayor infiltración por linfocitos y células plasmáticas en la hepatitis crónica C, siendo en ésta la actividad histológica, medida por el índice de Knodell (Knodell AJ, 1981), superior a la de la hepatitis crónica B. En las formas histológicas con cambios mínimos y en la HCP el daño hepático es relativamente pequeño y puede ser reversible; en cambio, en la HCA el daño hepático aumenta más rápidamente, es más extenso y con más frecuencia evoluciona a cirrosis.

La HCA se presenta en un 60% de las biopsias hepáticas de los portadores crónicos por virus C frente al 30% de hepatitis crónicas

persistentes (HCP) (Asociación Española para el Estudio de las Hepatitis, 1991). Los pacientes pueden progresar desde una HCP a una HCA, y desde cualquiera de estas formas a cirrosis. La enfermedad adquiere una especial agresividad en pacientes inmunodeprimidos y anti VIH positivos, incluso en ausencia de SIDA.

1.5.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA HEPATITIS POR VHC

El VHC es responsable de alrededor del 80% o más de los casos de enfermedad hepática crónica que no están ocasionados por el abuso del alcohol, por el virus de la hepatitis B o por alguno de los poco frecuentes trastornos metabólicos hereditarios que originan enfermedad hepática (Sánchez-Tapias JM, y cols, 1992). Estos datos sitúan a la infección crónica por VHC como una causa de enfermedad hepática tan importante como el alcoholismo crónico; además es frecuente encontrar asociación entre alcoholismo y hepatitis C.

Mucho era lo que se conocía desde el punto de vista epidemiológico del virus de la hepatitis C, cuando todavía formaba parte del conjunto de hepatitis NoANoB. El VHC era el responsable del 85-90% de las hepatitis postransfusionales antes de utilizar el despistaje de los donantes con anticuerpos anti VHC por ELISA II. Los estudios epidemiológicos, basados principalmente en la positividad del antiVHC, muestran aún un problema y es la presencia de falsos positivos en la determinación de dicho anticuerpo, así como su doble significado: infección actual, reciente o crónica, e infección pasada-curada (Alter HJ, y cols, 1989b).

Según la Organización Mundial de la Salud (O.M.S) en 1991 existían en el mundo alrededor de 100 millones de portadores del virus C, frente a 280 millones de portadores de hepatitis B o los 10 millones de afectados por el VIH. Se estima que alrededor de 1/2 millón de españoles pueden estar infectados por virus B y/o C de la hepatitis. Se afirma que la hepatitis C es un grave problema de salud

pública que debe ser abordado especialmente ya que un 50% de los pacientes infectados no tienen antecedentes de exposición al virus y sólo la cuarta parte de los casos tienen antecedentes de transfusión sanguínea.

1.5.1.- PREVALENCIA

La incidencia y prevalencia de la infección viral por VHC dependen esencialmente de dos factores: el tipo de reservorio del virus y, sobre todo, su forma de transmisión.

La mayoría de los estudios se han realizado sobre donantes de sangre a pesar de ser un grupo muy seleccionado de personas que no reflejan la realidad de la población general. Se estima que la prevalencia del antiVHC es mayor en el conjunto de la población. La distribución de esta infección es universal aunque de forma irregular. Tiene un patrón epidemiológico endémico de penetración variable (similar a los VHB y VHD). Así, es una infección poco prevalente en el Centro y Norte de Europa (0.3-0.7 %), algo más en Japón y área Mediterránea de Europa (0.9-1.2 %), aunque por la facilidad con que los antiVHC(+) del sur de Europa transmiten hepatitis postransfusionales a sus donantes (60-90 %) respecto a los del norte de Europa (25 %), cabe suponer que en ésta localización existan muchos falsos positivos. En Africa la cifra podría situarse alrededor del 3%. No existen diferencias significativas de seroprevalencia entre sexos, donantes voluntarios o remunerados, o entre donantes de áreas rurales o urbanas.

En España, se encuentra que el 0,57% de los donantes de sangre fueron positivos para el antiVHC (ELISA II). Se estima que en España tenemos en población general alrededor del 1-1,2% de personas infectadas por VHC, frente al 0,7-0,8% de infecciones por VHB (Resumen del IV Simposium Internacional sobre hepatitis virales, 1993).

El porcentaje de seropositivos aumenta con la edad. En Japón la prevalencia de anticuerpos antiVHC en la población general es del 0,3% en el grupo de menores de 18 años frente al 2,9% del grupo de 50-65 años; la mayor prevalencia se encuentra alrededor de los 40 años.

El 90% de los donantes de sangre con antiVHC(+) tienen virus C en sangre y son infecciosos. Antes de utilizar los marcadores de hepatitis C en donantes de sangre la incidencia de la enfermedad era superior en Japón y menor en Europa y Norteamérica. Sólo en EEUU de los 3 millones de personas que anualmente recibían transfusiones de sangre, un 5% desarrollaban hepatitis C aguda, cronificándose el 2.5%, de las cuales el 10% presentaron complicaciones cirróticas. Otros estudios estimaban el contagio entre el 6 y 38% de todos los enfermos transfundidos. En Reino Unido existía una baja prevalencia debido a la realización de una estricta historia clínica al donante para descartar poblaciones de riesgo.

1.5.2.- INCIDENCIA EN ESPAÑA

Según el Boletín Epidemiológico Semanal (enero 1996) existen 8776 nuevos casos de infección por VHC, con una menor incidencia que en años anteriores, lo que supone la tasa más baja desde 1982, año en que comenzó su notificación como enfermedad de declaración obligatoria.

En España entre el 15-35% de las hepatitis agudas son hepatitis tipo C; estos datos se correlacionan con los observados a escala mundial: entre el 20-40% de las hepatitis agudas en Europa y Norteamérica, y el 50% de las hepatitis agudas en Africa son producidas por VHC.

La tabla 1.5. muestra los datos de prevalencia de positividad para el anticuerpo antiVHC en la población de donantes de sangre, considerada la media mundial en alrededor del 1.2%.

Tabla 1.5.

**PREVALENCIA DEL ANTI VHC EN POBLACIÓN DE
DONANTES DE SANGRE**

- Egipto.....	9,2%
- Africa (población negra).....	3,8%
- Japón.....	1-2%
- Países Mediterráneos.....	1-2%
- E.E.U.U.....	1%
- España.....	0,7-0,8%
	0,57%
- Países Centroeuropeos.....	0,5-0,8%
- Países Escandinavos.....	0,2-0,4%
- Reino Unido (sesgado).....	0,06-0,18%

1.5.3.- VÍAS DE TRANSMISIÓN

Existen dos formas principales de transmisión aunque en más de la mitad de los pacientes no se puede detectar ninguna vía de transmisión de la enfermedad:

1.5.3.1.- Transmisión parenteral

Constituye la principal vía de entrada de la infección. Los politransfundidos, los ADVP (adictos a drogas por vía parenteral), los hemodializados y los tratados con hemoderivados, son los principales grupos de riesgo.

* Transmisión Postransfusional: entre un 2-16 % (media del 10 %) de los

pacientes que sufrían una transfusión de sangre desarrollaban una hepatitis postransfusional (HPT) que, tras eliminarse la opción del VHB por la exclusión de los portadores HBsAg+ como donantes, era calificada de NoANoB en el 90 % de los casos.

Desde la determinación de pruebas serológicas encaminadas a detectar el VHC (ELISA y RIBA de confirmación) este riesgo ha quedado reducido a casi un 3 % (comparable al riesgo de una población control: pacientes hospitalizados que no fueron transfundidos). Ello ha demostrado que el VHC era el responsable de casi la totalidad de las HPT NoANoB de otra época (antes de 1989). Datos adicionales y retrospectivos confirman este hallazgo, ya que entre el 70-90 % de los enfermos con HPT desarrollaban antiVHC durante su enfermedad y en el 100% si ésta se cronificaba. No todos los donantes antiVHC(+) transmiten una HPT, ello sucede entre el 17-90 % de los casos, ya que la sangre de estos donantes no siempre es infectante; la explicación puede ser variada: el receptor está previamente inmunizado frente al VHC y la reacción es expresión de unos anticuerpos residuales de una anterior infección ya curada o bien la reacción (ELISA) es falsamente positiva.

Un grupo bien caracterizado que sufre frecuentes transfusiones es el de los hemofílicos. Estos reciben factores de la coagulación extraídos de un importante volumen de donantes, lo cual les ha convertido en víctimas de diversas infecciones virales: VHB, VHC y VIH. La infección por VHC es la principal causa de hepatitis viral en estos enfermos, porcentajes que sólo guardan relación con la cantidad de concentrados recibidos. Cuando los concentrados reciben un tratamiento virucida (calor, pasteurización, detergentes, disolventes), la prevalencia de antiVHC(+) desciende a menos del 25 %. Por todo ello, la presencia de un antiVHC(+) en un hemofílico debe de confirmarse mediante RIBA que, en caso de ser positivo, indicará la presencia de una hepatitis crónica, con independencia de los valores de transaminasas. Entre tanto este tipo de tratamiento es sustituido por el aparentemente inocuo y eficaz factor VIII recombinante, los concentrados que reciban estos enfermos deberán examinarse mediante ELISA/RIBA o ser inactivados.

** Transmisión Percutánea (ADVP.): la prevalencia de antiVHC(+) en este colectivo es muy elevada: 50-90 %, sobre todo si muestran una hepatopatía crónica; en cuyo caso, también tienen marcadores de otras infecciones virales (VHB, VHD y VIH). Se encontró que en donantes de sangre la adición a las drogas por vía intravenosa (ADVP) es el factor de riesgo predominante de transmisión por VHC.*

El virus se encuentra en pequeñas cantidades en la sangre humana por lo que para ser infectivo necesitaría que el paso de sangre de una persona a otra sea considerable, la infectividad está en relación directa con la cantidad y duración de la exposición al agente; sin embargo se comunicó el caso de un paciente con infección por VHC transmitido por una aguja de tatuaje; se presume que las agujas de acupuntura sean otro vehículo de transmisión de VHC.

** Transmisión en Unidades de Hemodiálisis: los pacientes que utilizan estas unidades sufren frecuentes punciones venosas en las fístulas artificiales que presentan, así como transfusiones de sangre (hoy en gran parte obviado por la administración de eritropoyetina recombinante) por su insuficiencia renal crónica. Todo ello hace que sean sujetos muy susceptibles de padecer infecciones virales por vía percutánea. La prevalencia de antiVHC(+) en estos pacientes es de aproximadamente un 20 % y está en relación directa con el tiempo de tratamiento. A los factores ya referidos cabe añadir que la inmunodeficiencia de estos pacientes facilita la adquisición de estas enfermedades virales y además su cronificación.*

** Transmisión por hemoderivados: un estudio comprueba la transmisión de antiVHC a través de preparados de inmunoglobulinas anticitomegalovirus en pacientes trasplantados de médula ósea, al no detectarse el RNA-VHC en el suero de los pacientes no existe evidencia de que se produjese la infección por el virus; sin embargo son varios los trabajos que evidencian la transmisión de la hepatitis C por inmunoglobulinas comerciales contaminadas. Desde enero de 1993 es obligatorio en la CEE la detección de anti VHC en todos los preparados de inmunoglobulinas.*

1.5.3.2.- Transmisión no parenteral

Existe un elevado porcentaje de pacientes con hepatitis por VHC (más del 50 %) en los que no es posible definir, una forma de transmisión parenteral. Sucede algo parecido a lo que ocurre con el VHB y cabe suponer que, prácticas como la ya abandonada de las inyecciones i.m. de uso múltiple, puedan tener un importante papel en estos casos. Según los datos disponibles, las hepatitis por VHC adquiridas tras transfusión suelen ser más graves, más frecuente su paso a la cronicidad y más rápida su evolución que aquellas adquiridas "en la comunidad", sin causa aparente conocida. Se pueden sugerir las siguientes vías de transmisión:

- * *Transmisión Sexual:* existe baja prevalencia del anti VHC y parejas homo/heterosexuales; este tipo de transmisión parece posible pero con menor frecuencia que el VHB o el VIH, quizás por el bajo nivel de viremia del VHC ya que cuando coexisten el VHC y VIH, la inmunodeficiencia inducida por el VIH favorece la replicación e infectividad del VHC, lo que facilita su transmisión por esta vía.

Este bajo nivel de transmisión sexual se confirmó en parejas femeninas de varones hemofílicos infectados. Sin embargo, la vía heterosexual si ha de ser considerada, así la seropositividad en la pareja estable de pacientes con VHC es del 5-23% (López y cols, 1991; Riestra y cols, 1990; Shou.Doug Lee y cols, 1991). Otros estudios también han descrito esta vía como la causante de un pequeño número de hepatitis esporádicas (11%) (Alter y cols, 1989c).

Para demostrar la transmisión sexual es necesario conocer el genotipo de VHC que afecta tanto al caso índice como al familiar o al contacto sexual. Sólo si el tipo de virus C en ambos casos es el mismo, podría hablarse de transmisión sexual o familiar (Carreño y cols, 1993). Se podría concluir que está descrita una débil evidencia de la transmisión sexual por el VHC; sólo existe una excepción: cuando el portador o receptor estén coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana.

La infección es más frecuente en homosexuales masculinos (4-9%), esta cifra se puede disparar hasta el 23% en la asociación homosexualidad más VIH positivo.

** Transmisión Intrafamiliar NO Sexual: tampoco parece claro esta vía de transmisión para el VHC y existen datos contradictorios en ambos sentidos, cabría aceptar la posibilidad de la vía parenteral inadvertida. La escasa difusión familiar, junto con una prevalencia de anti VHC en el personal sanitario de las unidades de diálisis similar a la población general, nos indica la baja contagiosidad del virus C por otra vía que no sea la sanguínea.*

** Transmisión Vertical: la mayoría de los hijos que nacen de madres antiVHC(+) tienen este anticuerpo por transmisión pasiva, permaneciendo detectables hasta 6 meses tras el parto (Kuroki, T, y cols, 1992; Reinus JF, y cols, 1993). Sin embargo, aunque no es frecuente, se han descrito casos bien definidos (RNA-VHC positivo en los recién nacidos) de transmisión vertical, sobre todo en el caso de madres VIH+. Se debe admitir que esta vía es posible y representa una forma de transmitir y adquirir la infección por VHC a partir del reservorio de pacientes con hepatopatías crónicas asintomáticas y de adquisición desconocida.*

Sin embargo, se ha demostrado la transmisión madre a hijo: se detectó y secuenció el RNA-VHC del suero de una mujer infectada, de su hija y de su nieto, comprobaron que los tres tenían secuencias de nucleótidos casi idénticos en la región core/envuelta estudiada (Inove y cols, 1992). También se ha comprobado que los hijos de madre con VIH+ se infectan más por VHC que aquellos nacidos de madre sin VIH, esto se podría explicar por la afectación del sistema inmune de la madre que facilitaría la transmisión del virus.

Se concluye que en madres que no sean inmunodicientes la transmisión es muy difícil o prácticamente nula. La transmisión vertical sería una vía de transmisión esporádica, la infección se produciría cuando la madre tuviera una viremia importante (enfermedad activa), y sobre todo si sufre una inmunosupresión. Sería aconsejable realizar un estudio de anticuerpos cada 6 meses en todo recién nacido de madre portadora de antiVHC.

** Transmisión por saliva y otros fluidos corporales: se ha demostrado la*

transmisión de la hepatitis C a través de la saliva. Mediante PCR se detecta siempre el RNA-VHC en pacientes con hepatitis C crónica postransfusional aunque en concentraciones inferiores a la hallada en sangre (Wang JT y cols, 1991); también se detecta en enfermos sin hallazgos biológicos o bioquímicos que destacar pero en menor proporción. No se sabe todavía si este RNA del VHC encontrado en saliva tienen o no capacidad infectiva, si así fuese, sería conveniente investigar la importancia de esta vía de transmisión en la práctica odontológica.

Los deficientes mentales muestran una prevalencia de infección por el VHC entre el 2-7 %, superior a la de la población general, además, el RNA-VHC se ha detectado en saliva y se ha descrito un caso de infección por VHC transmitida por mordisco, por lo que esta vía puede ser importante en este colectivo (Dusheiko GM, y cols, 1990).

El mecanismo de aparición del VHC en la saliva podría relacionarse con la cantidad de partículas virales circulantes en suero. Concentraciones altas de virus en suero permitirían su exportación a determinados fluidos corporales, y su presencia en ellos no se debería por tanto a replicación viral en el órgano secretor.

El hallazgo de negatividad de PCR en el líquido peritoneal de pacientes en diálisis peritoneal con PCR positiva en suero indica que el virus, a pesar de estar infectando el hígado, es incapaz de alcanzar la cavidad peritoneal (Alberda y cols, 1993). En sujetos con hepatitis crónica por VHC y con PCR positiva en suero, no se detectó RNA viral en muestras de semen, orina, heces o secreciones vaginales. La mayoría de los autores no han encontrado RNA-VHC en el semen de pacientes antiVHC positivo.

Mediante técnicas de PCR no se ha demostrado el VHC en la leche materna de madres infectadas, por lo cual no se desaconseja la lactancia natural en madres portadoras.

* Transmisión por artrópodos: la semejanza del VHC con los flavivirus transmitidos por artrópodos, podría hacer pensar en la inoculación de la enfermedad por un vector. Así algunos autores explicarían la aparición en climas

tropicales de brotes epidémicos de hepatitis con antiVHC(+). Sin embargo no hay pruebas que confirmen la transmisión del VHC por artrópodos y sería lógico pensar que el antiVHC(+) encontrado es debido a una reacción cruzada, por similitud entre las proteínas del VHC y los flavivirus.

Existe un grupo importante de hepatitis C esporádicas en las que no es posible determinar la forma de contagio, pudiendo llegar en el caso de hepatitis crónicas NoANoB al 62%.

1.5.4. - POBLACIÓN DE RIESGO

Es posible definir poblaciones que presentan un mayor riesgo de padecimiento de la infección provocada por el VHC. Entre éstas es interesante destacar a pacientes con coagulopatías (Sherlock S. 1993); adictos a las drogas por vía parenteral (ADVP) (Llibre JM, y cols, 1992); Hemodializados (Garrigós E, y cols, 1991); receptores de órganos (Roth D, y cols, 1992); pacientes portadores del VHB (Fattovide G, y cols, 1991); pacientes portadores del VIH (Martín P, y cols, 1989); alcohólicos (Arima T, 1992). Igualmente existen otros grupos de riesgo como son los formados por los homosexuales (fundamentalmente masculinos) y prostitutas (Esteban JL, y cols, 1989) así como el personal sanitario (Vaglia A, y cols, 1990).

La tabla 1.6. tomada de Alter MJ, 1991, muestra los porcentajes de distribución de los grupos de riesgo para el padecimiento de hepatitis por VHC.

Tabla 1.6.

POBLACIÓN DE RIESGO Y POSITIVIDAD DEL ANTI VHC

<i>Afectación familiar</i>	8%
<i>Hemofílicos</i>	64-80%
<i>ADVP</i>	50-90%
<i>Donantes de sangre con anti HBc(+)</i>	44%
<i>Hemodializados</i>	10-43%
<i>Pacientes politransfundidos</i>	5-15%
<i>Prostitutas</i>	7-9%
<i>Varones homosexuales</i>	8-23% (más frecuente asociado a VIH +)
<i>Receptores de órganos</i>	6-18%
<i>Personal médico que manipula sangre</i>	2-3%
<i>Personal no médico que manipula sangre</i>	5-7%
<i>Pacientes con VIH</i>	70%
<i>Pacientes con hepatocarcinoma</i>	65-75%
<i>Alcohólicos</i>	20%
<i>Pacientes con hepatocarcinoma y cirrosis alcohólica</i>	76%
<i>Edad y sexo</i>	mayor prevalencia en hombre mayor de 50 años.
<i>Pacientes con hepatitis B crónica</i>	20%

1.6.- PATOGENIA DE LA HEPATITIS VIRAL POR VHC

El término hepatitis se utiliza en patología para referirse a los procesos que lesionan de forma difusa el parénquima hepático. Bajo este concepto se engloban las hepatitis virales junto a las hepatitis por tóxicos de patogenia diferente; entre los numerosos tipos de virus capaces de producir necrosis hepatocelular e inflamación se encuentra el virus de la hepatitis C que presenta tropismo predominante, pero no exclusivo, por los hepatocitos.

En síntesis, el material genético de este virus, una macromolécula de RNA, se replica en el interior de la célula efectuando numerosas copias de sí misma; la información del ácido nucleico permite la síntesis en los ribosomas celulares de un grupo de proteínas cuya principal función es recubrir a cada copia del material genético formando la cápside, protegiéndolas para que puedan salir de la célula permaneciendo viables e infectar a otras células (Pumarola A, 1980).

El desarrollo de la hepatitis viral y sus características depende de numerosos factores, unos dependientes del virus y otros del huésped. Aunque los virus de la hepatitis comparten un tropismo hepático bien definido, el tipo de virus en cuestión, su variabilidad genómica, vía de entrada, cantidad de inóculo, virulencia etc., condicionan junto con las características del paciente (edad, estado inmunitario, enfermedad hepática previa o concomitante) el desarrollo o no de un tipo individualizado de hepatitis, su curso y su evolución posterior.

1.6.1.- CONCEPTOS DE INMUNOLOGÍA GENERAL

Los mecanismos de defensa frente a los virus de la hepatitis son comunes a la defensa antiviral general. Dependen básicamente de la inmunidad humoral, inmunidad celular y proteínas solubles de fase aguda y de las sustancias intermediarias (linfoquinas e interferón, esencialmente).

La INMUNIDAD HUMORAL está basada en la elaboración de anticuerpos

(Ac) contra los antígenos (Ag) virales. Como en cualquier respuesta de este tipo, aparecen primero los de tipo IgM, que además son índice de infección reciente, y luego los IgG e IgA. La importancia cuantitativa y temporal de la respuesta de anticuerpos está relacionada con la forma de diseminación del virus, así esta respuesta es máxima en caso de viremia generalizada y cuanto mayor sea la estimulación antigénica.

Los anticuerpos actúan mediante varios mecanismos: son capaces de originar complejos Ag-Ac incapaces de unirse a los receptores de los hepatocitos, o bien, si la adherencia queda respetada, no pueden penetrar en la célula; en general existe una correlación positiva entre el título de Ac circulante y la protección contra la infección, por ello la medición de aquél se emplea en epidemiología para comprobar la eficacia de la vacunación. La curación de la infección aguda ya constituida depende fundamentalmente de la inmunidad celular.

La INMUNIDAD CELULAR pone en juego a las células de la respuesta inmune (RI), básicamente linfocitos y monocitos. Los linfocitos representan el 20-40% de los leucocitos circulantes, reconocen Ag, coordinan la RI, producen proteínas de comunicación intercelular (linfoquinas), tienen capacidad citotóxica y originan respuestas proliferativas. Existen tres tipos de poblaciones linfocitarias básicas: linfocitos T, B, y las llamadas células de la "tercera generación".

* Los linfocitos T se procesan en el timo neonatal y son reconocibles por fenotipos de membrana asociados a Ac monoclonales, denominados CD y un número según nomenclatura internacional (CD:"cluster designation"). Forman rosetas espontáneas con hematíes de carnero (CD2+) y se identifican con el monoclonal CD3. Existen dos subpoblaciones principales:

- CD4 (helper o cooperadoras) que reconocen Ag en asociación a moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-II). Representan el 65% de la población total; poseen actividad reguladora-cooperadora, inducen la diferenciación de los linfocitos B, la proliferación de linfocitos CD8 y producen linfoquinas.

- CD8 (citotóxicas/supresoras): representan el 35%, fundamentalmente

poseen actividad citotóxica. Su capacidad para reconocer Ag en asociación con HLA-I le permite destruir cualquier célula que se vea modificada en su membrana; también funciona como supresora de la síntesis de Ac en los linfocitos B.

Ambas poblaciones poseen un receptor rTc que es el receptor antígeno-específico de las células T, el cual se asocia siempre a CD3. El complejo CD3-rTc parece estar relacionado con la transmisión de la señal de activación al interior celular.

* Los linfocitos B son los precursores de los plasmocitos. Expresan en su superficie moléculas intramembrana de Ig (IgM o IgD) que funcionan como receptores antigénicos de células B, también expresan receptores de superficie para la región Fc de las IgG y componentes activados del complemento. Su función principal es producir anticuerpos: al contacto con el Ag los linfocitos B se diferencian en plasmocitos secretores de anticuerpos o proliferan para formar células B memoria. Transportan en su superficie Ag de HLA clase II y receptores de complemento. Se identifican con varios monoclonales (CD19, CD20, CD22).

* Los monocitos son macrófagos circulantes. Procesan los Ag mediante fagocitosis para "mostrarlos" a los linfocitos. Presentan receptores para fracción Fc de IgG y para los Ag del HLA.

* Las células de la "tercera generación" constituyen una particular estirpe de células mononucleares que carecen de receptores de superficie para Ag y se conocen también como LGL (Linfocitos Granulares Grandes). Tienen capacidad para anular ciertas células tumorales, infectadas por virus, o "marcadas" por Ac tipo IgG.

Unas presentan actividad natural de destruir dichas células, sin mediación de Ac y del HLA (células NK o "Natural Killer") y no poseen memoria inmunológica. Otras presentan actividad "asesina" (células K) dependiente de la unión previa con anticuerpos. Ambas células (K y NK) presentan características intermedias entre linfocitos y monocitos, aunque no fagocitan, producen Interferón proliferando como respuesta a éste, poseen receptores para la interleukina-2 (IL-2) y no expresan receptores de Ag T (TCR).

* Células presentadoras: originan la degradación del Ag ya que exponen en

su superficie los fragmentos peptídicos que se unen a los rTc. Producen linfoquinas y poseen HLA:

- HLA de clase II: se encuentra en los linfocitos B y en los monocitos-macrófagos.

- HLA de clase I: presente en todas las células excepto en los hematíes maduros.

* *Restricción por el HLA:* los linfocitos B poseen Ig en su superficie no necesitando que se les presente al Ag, en el caso de los linfocitos T es necesario que el Ag esté unido a una molécula HLA propia. A este fenómeno se le denomina *restricción por el HLA*.

Los linfocitos T CD4+ sólo pueden reconocer el Ag cuando éste le es presentado en asociación a una molécula de HLA-II en la membrana de las células presentadoras de antígenos. El receptor rTc se une al Ag presentado por las moléculas HLA-II y las moléculas CD4 actúan como adherentes al unirse a la molécula HLA-II y estabilizar la unión Ag-rTc. Los linfocitos T CD8+ estabilizan la interacción Ag-rTc mediante la unión de la molécula CD8 al HLA-I.

El interferón (IFN) constituye un grupo de sustancias de naturaleza proteica y glicoproteica formadas en los vertebrados superiores por inducción específica, que "interfieren" en la infección viral (Isaac y Lindemann, 1957). Constituyen la primera línea de defensa, pues las células infectadas por virus lo producen y "protegen" a las células no infectadas. Es producido por gran variedad de células ante situaciones muy diversas; sus efectos son numerosos.

Se han descrito tres tipos: IFN-alfa, producido principalmente, aunque no de forma exclusiva, por los leucocitos; IFN-beta o fibroblástico, producido en células epiteliales y fibroblastos; y el IFN-gamma de origen en los linfocitos T, células NK y células K, claramente distinto a los anteriores, con receptor celular independiente y ninguna similitud en la cadena glicoproteica (Gresser I, 1961; Días M y cols, 1993; Gray PM, y cols, 1982; Branca AA y cols, 1981).

Sus numerosos efectos biológicos pueden reunirse en cuatro: a) inhibición de la multiplicación viral; b) inhibición de la división celular de células normales y tumorales; c) cambios en la membrana plasmática y d) efectos

inmunomoduladores.

Todos estos protagonistas de la defensa contra la infección por virus en general y del VHC en particular actúan de forma coordinada y secuencial. El desarrollo de la hepatitis aguda, su curación, su posible evolución a la cronicidad y su curso posterior, vienen en parte determinados por estos mecanismos.

La hepatitis se inicia con la llegada del virus al organismo. La transmisión por vías parenteral, vertical y sexual está comprobada en mayor o menor grado para el caso del virus de la hepatitis C. El segundo paso es la adherencia del virus al hepatocito, dotado de receptores adecuados, la ausencia de tales receptores explica la inmunidad natural del hombre para otros virus capaces de infectar a otras especies.

Las células hepáticas se lesionan ya que la hepatitis supone inflamación y necrosis hepatocelular. Estos dos acontecimientos están determinados por el acumulo y actuación de las células responsables de la respuesta inmune y por la lisis de los hepatocitos. Los hepatocitos sufren ruptura mediante dos mecanismos básicos que con frecuencia se superponen: a) acción citopática directa del virus (Lan JYN, 1993) y b) actuación de la respuesta específica del huésped contra los hepatocitos infectados: debido al hecho de que existen portadores sanos del virus con viremia persistente demostrada por PCR y sin evidencia de lesión hepática (Alter JM, 1992a; Alberti A, 1992), así como las fluctuaciones en la evolución clínica de la enfermedad y la presencia de agregados linfocitos en el infiltrado inflamatorio detectado en biopsias hepáticas de pacientes infectados por VHC, se sugiere que el VHC no es directamente citopático y que la respuesta inmunocelular del huésped podría jugar un papel decisivo en la patogenia del daño celular (Scheuer PJ, 1992; Diener HP, 1987).

La lisis celular supone la liberación del contenido celular al medio, el hepatocito tiene una abundante dotación de enzimas metabólicas, como las transaminasas, que pueden ser detectadas en el suero en cantidades anormalmente altas, y cuya determinación es la base del diagnóstico de "hepatitis".

El virus en replicación origina en la célula parasitada un grado de alteración estructural variable, conduciendo a un fracaso de los sistemas de supervivencia del hepatocito y produciendo la muerte celular que coincide, en general, con la liberación de nuevas partículas víricas infectantes que ocupan nuevos hepatocitos. El virus A de la hepatitis es un caso característico de acción citopática directa sobre la célula hepática, existen datos que sugieren que el VHB y el VHC no son directamente citopáticos y que el daño celular se produce por una reacción de citotoxicidad específica mediada por linfocitos T. Los estudios microscópicos de la lesión por VHC parecen apoyar un efecto citopático directo, sin embargo numerosos aspectos recuerdan a la patogenia de la hepatitis por VHB; el hecho de que existan portadores sanos, asintomáticos, del VHC y viremia persistente sin lesión hepática sugiere que el mecanismo de lesión celular esté mediado por la propia respuesta inmune del paciente (Buey LG, 1993). Existe evidencia experimental que postula que la lesión hepatocelular está producida por una reacción de citotoxicidad específica mediada por linfocitos T y dirigida frente a antígenos expresados en la membrana de los hepatocitos infectados. En la cronificación de la hepatitis por VHC, de forma similar a la hepatitis crónica por VHB, se describen déficits de la activación inmune celular en monocitos, linfocitos T, expresión del sistema HLA, y disminución en la producción de interleuquinas e Interferón, entre otras alteraciones.

Existen al menos 3 variantes genéticas del VHC que difieren entre sí en alrededor de un 30% de los nucleótidos que integran el genoma. Una de las peculiaridades del VHC es su notable habilidad para presentar mutaciones con el tiempo; esta circunstancia podría también explicar la capacidad del virus C para eludir la respuesta inmunitaria del huésped y cronificar su infección. La cuestión se complica aún más si se considera la posible relación descrita en un número significativo de casos de hepatitis autoinmune, especialmente del tipo II, con la infección por VHC (Buti M, 1992).

Sea como fuere, parece evidente que la inmunología constituye el principal campo de investigación patogénica en la hepatitis viral y una esperanza real en el aspecto terapéutico.

1.6.2.- TEORIA INMUNOPATOGENICA. CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS T CITOTÓXICAS

Los mecanismos de daño hepatocelular y de cronificación en la infección por virus C son desconocidos. La patogenia de la hepatitis C en la actualidad es un tema en discusión; probablemente, como en cualquier infección, la hepatitis C se deba a una interacción entre el virus y la respuesta inmune del huésped.

La infección por VHC está frecuentemente asociada, al igual que ocurre en la infección por VHB, con una disminución transitoria en la actividad de la médula ósea, especulándose con la posible implicación en el desarrollo de casos de anemia aplásica (Hibbs JR, 1992b).

Los primeros estudios sobre la respuesta inmunológica del huésped a la infección por VHC se realizaron en chimpancés inmunosuprimidos con ciclofosfamida viéndose que no desarrollan daño hepatocelular al ser infectados por el virus, mientras que al cesar la inmunosupresión las transaminasas se elevaban reflejando el daño hepático (Krawczynski K, 1992a). Por otra parte, la coinfección con VIH en pacientes con hepatitis C conlleva un curso más severo de la enfermedad, por sus efectos sobre el sistema inmune del huésped, que permitiría un mayor nivel de replicación viral.

Estudios de microtoxicidad "in vitro" enfrentando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con hepatitis crónica C a hepatocitos autólogos, demostraron la existencia de un efecto citolítico mediado predominantemente por linfocitos T (Poralla T, 1984; Mondelli M, 1986). Por otra parte, en la biopsia hepática de estos pacientes se observa un gran aumento de células mononucleares que infiltran las áreas de lesión existiendo hepatocitos necróticos en íntimo contacto con los linfocitos, lo que sugiere que estas células pueden participar activamente en el daño hepatocelular. De hecho los linfocitos T citotóxicos tienen un importante papel funcional en la respuesta inmune celular frente a células infectadas por virus (Ashwell JD, 1988).

En sangre periférica de pacientes con hepatitis crónica por VHC no se han encontrado diferencias significativas en las subpoblaciones de células mononucleares cuando se compararon con controles sanos, sin embargo se ha comprobado que fenotípicamente la población linfoidea intrahepática está compuesta básicamente por linfocitos T CD4+ y T CD8+ en proporciones equivalentes (Hata Ky cols, 1992), lo que supone un evidente enriquecimiento de células T CD8+. También los linfocitos T CD8+ (citotóxicos/supresores) predominan en las áreas de lesión tisular y su presencia está relacionada con la expresión del antígeno C en el citoplasma del hepatocito infectado (Haruna Y, 1992). Otros autores observan un descenso de la población linfocitaria CD4 +, con o sin aumento de CD8+, lo que se traduce en un descenso del cociente CD4/CD8.

No obstante la simple presencia de los linfocitos T CD8+ no indica que necesariamente estas células están implicadas en una reacción inmune específica. Cuando determinados receptores de la membrana celular del linfocito T interaccionan con un antígeno específico se produce la "activación del linfocito", este proceso origina una dinámica de acontecimientos funcionales tales como la inducción de la síntesis de DNA, proliferación clonal, producción de citoquinas y adquisición de las funciones efectoras de cada subpoblación linfocitaria, y por último la lisis celular.

Por técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado que la mayoría de los linfocitos T CD8+ que infiltran el hígado son células activadas, suponiendo que por estar en contacto con los antígenos del virus. Con respecto a estos antígenos se ha publicado la detección sérica de un Ag de la nucleocápside en pacientes infectados (Takahashi K, 1992) y la presencia del Ag del VHC en el citoplasma de hepatocitos de pacientes infectados (Krawczynski K, 1992b).

Cuando el linfocito se activa expresa en su membrana una serie de moléculas de activación linfocitaria: receptor de interleukina-2 (rIL-2), receptor para transferrina (rTR), molécula inductora de activación (AIM), antígenos de HLA-II, complejo de activación VLA-1, etc. La expresión de estas moléculas de activación en los linfocitos T CD8+ intrahepáticos provoca la activación de estas células al entrar en contacto con los antígenos virales, este hallazgo sugiere que

la célula efectora implicada en la lisis celular de la hepatitis crónica por VHC es el linfocito T CD8+; sin embargo el antígeno diana del virus C frente al cual reaccionan los linfocitos T CD8+ se desconoce por ahora.

Un requisito imprescindible para la activación de la capacidad citotóxica del linfocito T CD8+ es su interacción con la molécula de HLA-I; parece ser que la expresión de HLA-I modula el daño hepático pues se ha demostrado un incremento en la expresión de las moléculas de HLA-I en los hepatocitos de pacientes con hepatitis crónica C (Diener HP, 1987).

Los linfocitos T circulantes son células en estado de reposo. Tras el reconocimiento específico de un Ag se unen entre sí formando agregados o bien se adhieren a otros tipos celulares como células endoteliales las cuales se activan debido a la inflamación y consiguiente liberación de IFN-gamma y otras citoquinas, aumentando la expresión de moléculas de adhesión en su membrana. Estas moléculas de adhesión parecen desempeñar un papel muy importante en el reclutamiento y posterior migración de los linfocitos hacia los tejidos extravasculares inflamados.

El desarrollo de la respuesta inmune citotóxica y posterior lisis celular implica una serie de procesos como la adhesión celular y el reconocimiento antigénico. En estos procesos participan unas moléculas de superficie celular que median interacciones celulares entre los linfocitos, por un lado, y las células diana y presentadoras de antígenos por otro. Uno de estos Ag es la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) que se comporta como el ligando natural de otra molécula de adhesión denominada LFA-1, cuya expresión está restringida a los leucocitos. La ICAM-1 puede expresarse sobre una amplia variedad de células y su inducción es importante en la regulación de las interacciones LFA-1/ICAM-1; en ausencia de inflamación ICAM-1 se expresa en escasas estirpes celulares. La adhesión de un linfocito T LFA-1+ a una célula diana ICAM-1(+) es un paso necesario y fundamental para que se genere una respuesta inmune celular. Existe también la molécula de adhesión LFA-3 expresada en la célula diana, la cual interacciona con la molécula CD2, expresada en todos los linfocitos T, pudiendo

mediatizar en la activación directa de los linfocitos antígeno-independientes.

Una vez adherida la célula diana con el linfocito T citotóxico se produce el reconocimiento por parte de éste y finalmente la lisis del hepatocito. En el proceso de reconocimiento antigénico participan las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad o HLA. Los linfocitos T responden únicamente al antígeno cuando éste es presentado como un péptido en la membrana de otra célula asociado a moléculas del complejo HLA. Dicho fenómeno se denomina "reconocimiento restrictivo" o "restricción HLA". Los linfocitos T CD8+ interaccionan con moléculas HLA-I y esto es un requisito para que la célula T citotóxica se active y produzca posteriormente la lisis de hepatocito. De todo esto se deduce que el grado de expresión de moléculas HLA-I así como de moléculas de adhesión, en la membrana del hepatocito, conjuntamente con el antígeno diana viral, podría ser uno de los mecanismos fundamentales implicados en la modulación del daño hepatocelular mediado por linfocitos T citotóxicos en la hepatitis crónica por virus C.

En cuanto al acceso y migración de los linfocitos T en el parénquima hepático se sabe que cuando los linfocitos T circulan por el torrente sanguíneo en estado de reposo son células independientes unas de otras, que tras el reconocimiento específico de un Ag se adhieren entre sí o a otros tipos celulares como las células del endotelio vascular. En condiciones normales hay una baja afinidad de las células endoteliales por los linfocitos circulantes, cuando hay inflamación y liberación de citoquinas (como el IFN) las células endoteliales se activan aumentando la expresión de moléculas de adhesión en su membrana. La molécula de adhesión VCAM-1 (vascular) juega un papel fundamental en la adhesión entre célula endotelial y linfocito al interaccionar con la molécula VLA-4, la cual se expresa constitutivamente en todos los linfocitos, y también en la migración de leucocitos hacia los tejidos extravasculares inflamados. En los pacientes con hepatitis crónica por virus C se ha encontrado que VCAM-1 se expresa claramente en las células endoteliales de los sinusoides y sobre todo en las zonas con mayor infiltración por linfocitos T VLA-4+.

Aproximadamente el 60% de los pacientes afectados por VHC se

convierten en portadores crónicos (Alter HJ, 1989a). Se estima que los mecanismos de cronificación son el resultado de una respuesta inmune insuficiente para eliminar el virus. El defecto o la alteración funcional en la respuesta inmune podría radicar en la célula procesadora y presentadora del Ag, en el linfocito T cooperador productor de IL-2 e IFN, en los mecanismos de producción de otras citoquinas y en el sistema citolítico efector.

Diversos autores han comunicado la existencia de defectos en el sistema de activación inmune celular en pacientes con hepatitis crónica por VHC, así se ha descrito una alteración de la función monocitaria, caracterizada por una actividad fagocítica disminuida, un déficit de la expresión de HLA II y por último una menor producción de IL-2. Estas alteraciones podrían deberse a una disfunción monocitaria "per se" o inducida por el VHC (se ha detectado VHC en los monocitos de pacientes infectados crónicamente por VHC). Igualmente existe una disminución de la producción "in vitro" de IFN por las células mononucleares. La gran variabilidad genómica debida a la capacidad mutante del VHC también podría estar implicada en el establecimiento de la infección crónica.

En definitiva, es posible que la acción patogénica de la hepatitis C se deba a una compleja interacción entre la infección vírica y la inmunorrespuesta del huésped. Además, existen múltiples factores que pueden alterar el mecanismo inmunopatogénico de esta enfermedad, así, la sobreinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana o el virus de la hepatitis B y la aparición de reacciones autoinmunes, son factores moduladores de la respuesta inmune que hay que sopesar, aunque es obvio que el linfocito T citotóxico juega un importante papel en el desarrollo de la hepatitis crónica producida por el virus.

1.6.3.- ASPECTOS AUTOINMUNES EN LA PATOGENIA DE LA HEPATITIS CRÓNICA POR VHC

Se fundamenta en la frecuente aparición de autoanticuerpos, particularmente de tipo anti LKM y anti GOR en las hepatitis crónicas por VHC. La aparición de anti GOR es especialmente elevada (78%) en los pacientes con anti

VHC(+). Además es frecuente observar la relación entre hepatitis C con otras enfermedades como la crioglobulinemia mixta, la anemia aplásica y el Síndrome de Sjögren de sialoadenitis linfocítica.

Con la penetración en el organismo de Ag externos se puede producir a veces una reacción cruzada con epitopos estructurales (parte específica del antígeno que reconoce el anticuerpo) de las células humanas. Se ha observado que varios virus DNA y RNA tienen secuencias de aminoácidos idénticas o similares a determinadas proteínas humanas; así se describen casos de autoanticuerpos anti GOR producidos por asociación de una proteína del VHC con una autoproteína, este complejo podría producir necrosis de las células hepáticas y desarrollar una hepatopatía autoinmune. Los anticuerpos anti GOR merecen nuevas investigaciones como posible medio para establecer la relación entre el VHC y la inducción de hepatopatía crónica.

La aparición de autoanticuerpos anti LKM y anti GOR van dirigidos a componentes de la célula hepática, por lo tanto, sería factible que en algunos casos, una vez eliminado el virus, se perpetúe la enfermedad por falta de reconocimiento de proteínas propias, alteradas por el virus y la producción de autoanticuerpos (Pardo M, 1993). Es importante destacar que muchos pacientes con hepatitis clasificada como autoinmune, por la presencia de autoanticuerpos circulantes y con antecedentes de haber recibido transfusiones en el pasado, pueden ser en realidad hepatitis por virus C transmitidas por esas transfusiones. Los anticuerpos, a títulos bajos, constituirían un epifenómeno de la enfermedad y no un indicador de la etiología autoinmune del proceso.

1.6.4.- APOPTOSIS Y HEPATITIS CRÓNICA POR VHC

En los últimos 15 años se ha podido determinar que las células tienen un mecanismo de autodestrucción que las conduce a la muerte; a este proceso biológico se le denomina apoptosis. La homeostasis de un tejido u órgano depende de la relación entre la proliferación y la muerte celular.

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de suicidio celular o muerte

programada (Steller H, 1995). Es diferente de la necrosis ya que ésta es el resultado de la acción de agentes externos nocivos sobre la célula, además la apoptosis no desencadena respuesta inflamatoria. Histológicamente se caracteriza por la disminución del tamaño celular y nuclear (picnosis), condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Desde el punto de vista molecular se distingue por la destrucción sistemática y progresiva del DNA debido a la acción de enzimas endo-nucleasas.

El control genético es muy complejo, se sabe que existen genes que promueven la apoptosis (ced-3 y 4) y otros que la inhiben (ced-9 o el Bcl-2); otros genes son reguladores del proceso (p-53, myc y ras).

Existe una multitud de agentes promotores de apoptosis, entre otros: a) agentes químicos: quimioterapéuticos, glucocorticoides y azidas; b) agentes físicos: radiación ionizante, radiación ultravioleta e hipertermia; c) macromoléculas generadoras de señales: factor de necrosis tumoral α (TNF α), factores de crecimiento, factores neurotróficos, factor de crecimiento tumoral β (TGF β); d) factores genéticos: p53, c-Myc y Ced 9 mutado; e) factores celulares: algunas células T citotóxicas; f) factores bioquímicos: Ca⁺⁺, glutamato, peróxido de hidrógeno, peróxidos lípidos y radicales libres; y por último g) factores biológicos: virus (Reed, 1994).

Hiramatsu N, (Hiramatsu N, y cols 1994), estudiaron la apoptosis en hepatitis C crónica y sugirieron la mediación del antígeno Fas en dicha apoptosis. El antígeno Fas es una proteína de superficie celular, de la que se desconoce su función fisiológica, que se encuentra en el citoplasma de un número limitado de células, entre ellas los hepatocitos. Además de expresarse en la apoptosis, es una molécula inducible y se expresa "de novo" en las células bajo circunstancias anormales.

Estos autores encontraron que el antígeno Fas juega un papel importante en la inflamación activa del hígado infectado por hepatitis crónica tipo C. La infección por VHC puede disparar la inducción del antígeno Fas directamente o a través del sistema inmune ya que se expresa en mayor proporción en los hepatocitos con mayor infiltrado linfocitario.

El control terapéutico de la apoptosis ofrecería nuevas líneas de tratamiento (Thompson CB, 1995).

1.6.5.- BIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VHC

La alteración bioquímica fundamental es el aumento de las aminotransferasas séricas (GPT y GOT) o transaminasas. Por lo que respecta a las enzimas en relación con el árbol biliar la actividad de la fosfatasa alcalina puede estar moderadamente aumentada, así como la de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) a excepción de las afectaciones colestásicas, en las que estas enzimas se encuentran más elevadas. La velocidad de sedimentación y el proteinograma son habitualmente normales, así como el hemograma y las pruebas de coagulación. La bilirrubina está elevada en los casos ictericos pero casi nunca falta la presencia de este pigmento en la orina acompañado de urobilinógeno. Las modificaciones de otros enzimas indicativas de necrosis, como la láctico deshidrogenasa (LDL), generalmente son más moderadas o inespecíficas. Las cifras de albúmina se ven modificadas en el curso de la hepatitis aguda cuando se prolonga más de lo habitual. Las cifras de gammaglobulinas suelen elevarse a expensas de IgG e IgM. Los factores de la coagulación pueden verse afectados determinando un descenso del índice de Quick y del factor V, en casos de hepatitis graves o fulminantes. También se ha descrito una elevación de hierro sérico como expresión de necrosis hepatocelular que aparece con posterioridad a la elevación de las transaminasas séricas.

En la mayoría de los pacientes con hipertransminasemia por hepatitis vírica los valores de la GPT son superiores a los de la GOT. Lo contrario suele ocurrir en algunos casos de hepatitis crónica, particularmente tras el desarrollo de cirrosis; en pacientes con cáncer primitivo de hígado avanzado y en las hepatopatías de origen alcohólico, en que el cociente GOT/GPT frecuentemente es superior a 2 (Sánchez Tapias J.M, 1992).

En los pacientes que desarrollan hepatitis crónica, los niveles séricos de transaminasas muestran un curso fluctuante a lo largo de muchos años. Los

niveles de transaminasas se encuentran discretamente elevados con una media de 112UI/l y sólo ocasionalmente exceden de 200UI/l (Patel A, y cols, 1991). La intensidad de la elevación no se relaciona con el grado de necrosis ni con la gravedad de la hepatitis.

Durante el seguimiento a largo plazo de hepatitis crónicas C no se observa relación entre el patrón del RNA-VHC y el perfil de las transaminasas (Patel A, y cols, 1991). Esta disparidad se explica porque la replicación del VHC no siempre se asocia a daño hepático importante, quizá como resultado de la escasa capacidad citopática de este virus, o posiblemente, por la existencia de replicación viral extrahepática.

El patrón de hipertransaminemia moderada y fluctuante a lo largo de varios años y en ausencia de un patrón de alcohol-dependencia, es casi con seguridad diagnóstico de infección por VHC. En algunas ocasiones la hipertransaminemia no se acompaña de datos clínicos, bioquímicos o serológicos orientadores, si la hipertansaminenia persiste y se han descartado otras patologías es recomendable practicar una biopsia hepática. En aquellos pacientes con hipertransaminemia y elevación de la fosfatasa alcalina y la GGT, debe examinarse la presencia de anticuerpos antimitocondriales, presentes en los pacientes con cirrosis biliar primaria.

La tabla 1.7. expresa las causas más frecuentes de elevación de transaminasas superior a diez veces el límite superior de normalidad.

Tabla 1.7.

Hepatitis vírica aguda	Hepatitis alcohólica
Hepatitis por fármacos	Hepatitis isquémica
Hepatitis por tóxicos	Colestasis extrahepática aguda
Brote de reagudización de hepatitis crónica	

Diferentes estudios realizados antes de 1987 demostraron la asociación entre la elevación de GPT y/o antiHBc en donantes de sangre con el desarrollo de hepatitis NoANoB en el receptor, recomendándose a partir de esta fecha la realización de estas pruebas, que se denominaron "marcadores indirectos de la hepatitis postransfusional" (Laguna del Estal P. 1993). Con ellos se pensaba reducir entre un 30% y un 50% la incidencia de las hepatitis postransfusionales. Con la identificación del VHC y el desarrollo del ELISA para detectar anticuerpos se demostró que la medida era acertada, ya que cuando ambos están presentes el anti VHC es positivo en el 55% de los casos (Stevens CE, 1990).

1.7.- PROFILAXIS

Para ejercer control sobre las enfermedades virales es necesario acceder a ellas desde una posición previa, es decir, su profilaxis. El desarrollo de programas profilácticos se basa en conocimientos adecuados epidemiológicos del virus C y en medidas profilácticas, que para el caso del VHC sólo se refieren a inmunización pasiva (gammaglobulinas).

Cabe suponer que, en un futuro no lejano, se pueda disponer también de una vacuna. La falta de conocimientos adecuados del genoma del VHC, unida a la capacidad mutante de las regiones del genoma que codifican la envoltura viral, hacen que actualmente el desarrollo de vacunas recombinantes o sintéticas frente al VHC sea muy difícil. Tampoco es posible el uso de vacunas con virus atenuados-inactivados-muertos al no haberse podido aún aislar y cultivar el VHC. Los conocimientos adquiridos a través de la biología molecular han permitido la síntesis de productos antigénicos inmunológicamente válidos.

La amenaza del SIDA ha incrementado los procedimientos de cribado en los donantes de sangre y permite establecer un perfil de donante que ofrezca mayor confianza, a la vez que se enfatiza la necesidad de limitar las transfusiones de sangre procedentes de personas de alto riesgo y se adoptan medidas de seguridad adicionales. Más recientemente se ha promovido la búsqueda de

procedimientos de inactivación para la sangre y sus componentes, extendiéndose el uso intraoperatorio de productos sanguíneos autólogos, práctica que reduce el riesgo de adquirir enfermedades postransfusionales; así, para evitar los posibles casos de hepatitis derivados de donantes antiVHC(-) y RNA-VHC(+), lo recomendable sería la "autotransfusión"; pero a pesar de las ventajas de las donaciones sanguíneas autólogas el procedimiento no se emplea universalmente.

Entre varias pruebas valoradas como marcadores útiles en los donantes de sangre potencialmente infecciosos, la elevación de la GPT o la presencia de antiHBc, o ambos, muestra una significación correlativa con el riesgo de HPT-NoANoB en los receptores de sangre. Excluyendo donantes sólo con elevación de GPT, la HPT-NoANoB se ha reducido en un 30% mientras que la exclusión de donantes con elevación de GPT y/o presencia de antiHBc se puede reducir la frecuencia de las HPT-NoANoB entre un 30-45%.

Para la prevención de la HPT-NoANoB se utilizan métodos de inactivación viral. Existen tres grandes procedimientos de inactivación viral de productos sanguíneos: calor, solventes lipídicos e inactivación fotoquímica. Recientemente, con la utilización de los concentrados de factor VIII de segunda generación, no se ha implicado al VHC en ningún caso de HPT; la eritropoyetina recombinante, utilizada en los pacientes con insuficiencia renal crónica, está paliando el número de transfusiones en este colectivo; en el caso de hemofílicos, los derivados a transfundir se tratan con calor (pasteurización), detergentes o métodos fotoquímicos que inactiven el virus. En el caso de los ADVP deben de conocer su estado y ser informados sobre las medidas higiénicas (material sanitario de un sólo uso... etc.) y posibles vías de adquirir una infección por VHC (esencialmente parenteral).

Pero sin duda alguna, el método más aconsejable hoy en día para disminuir la transmisión de la hepatitis vírica NoANoB a través de productos sanguíneos u órganos trasplantados es realizar un cribado de los donantes mediante métodos serológicos, investigando antiVHC. Estudios de seguimiento prospectivo y retrospectivo revelan que con este método se previenen del 60 al 85% de casos de hepatitis víricas NoANoB.

En 1993 se aprobó un Real Decreto, 478/93 de 2 de Abril, que regula, por primera vez en el ordenamiento jurídico español, los medicamentos derivados de la sangre y plasma humanos. Dicha reglamentación sobre hemoderivados viene a regular con carácter fundamental el registro y fabricación de este tipo particular de medicamentos. Se trata de extremar las pruebas de calidad, pureza y estabilidad de los hemoderivados por motivos obvios de salud pública. A finales de 1993 se aprobó el Real Decreto 1854/93, de 22 de Octubre, que regula los requisitos técnicos y las condiciones mínimas de la hemodonación y bancos de sangre; en él se apuntan las pruebas de detección de agentes infecciosos, incluido el VHC, que se deben realizar a todas las muestras.

Sin embargo, a pesar de la introducción de estas pruebas de cribado, aún no son identificados una pequeña proporción de portadores del VHC, deduciéndose la necesidad de desarrollar técnicas de detección de antígenos del VHC o rutinarias de amplificación genética para el cribado de donantes y pacientes. Poco es lo que se conoce respecto a las formas de transmisión de las formas esporádicas, lo más probable es que se trate de transmisiones "parenterales inadvertidas" o "sexuales promiscuas", siendo válidas las medidas higiénico sanitarias básicas.

Se puede concluir que la mejor forma de prevenir la infección por este virus es el desarrollo de una vacuna y la implantación de programas de vacunación en masa durante la infancia. El desarrollo de esta vacuna depende de la búsqueda de epítomos que induzcan anticuerpos neutralizantes y de su obtención por técnicas de recombinación genética.

1.8.- PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

1.8.1.- DIAGNÓSTICO DE LAS HEPATITIS VIRALES AGUDAS POR VHC

El diagnóstico de la hepatitis viral aguda suele establecerse por criterios clínicos y por la elevación de transaminasas. El paciente presenta alguno de los síntomas más característicos: ictericia, astenia, anorexia o náuseas, aunque existe gran variabilidad de formas clínicas al igual que son frecuentes las formas asintomáticas. La constatación de valores de transaminasas séricas (GOT/GPT) por encima de 500 U/L completan el diagnóstico; la elevación de enzimas de colostasis es circunstancial.

El diagnóstico etiológico exige la determinación de marcadores serológicos: IgM-antiVHA, HBsAg, IgM-HBcAc y anti-VHD para descartar la posible implicación de estos virus. La infección aguda por virus C es de diagnóstico complicado dado que los marcadores son de aparición tardía (Bruguera M, 1993); la exclusión de otros virus y causas no virales sugiere presumiblemente hepatitis aguda NoANoB por virus C. En este sentido, el diagnóstico diferencial debe contemplar la posible participación de otros virus hepatotropos (VEB, citomegalovirus, mononucleosis infecciosa, rubéola) para los que solicitaremos los correspondientes Ac séricos de la clase IgM. Además hay que considerar la etiología tóxica como posible causa de hepatitis aguda, sobre todo el alcohol y los medicamentos, cuya lista es especialmente extensa.

En caso de duda o de datos no suficientemente claros, una segunda determinación del perfil serológico global puede suministrar información de interés para el diagnóstico.

Se está realizando un gran esfuerzo en la búsqueda de anticuerpos para el diagnóstico de la fase aguda. Attard y cols. (1990) estudiaron la cinética de aparición de anticuerpos específicos en pacientes afectados por hepatitis C aguda, los anti VHC los determinaron por la técnica de ELISA 1 en muestras de

sangre obtenidas en los meses 1, 3, 6 y 12 después del diagnóstico clínico, detectando anti VHC en el 50% de los pacientes en el primer reconocimiento, en el 82% un mes después y en el 96% a los tres meses. En un solo paciente de los 28 estudiados se detectaron los anticuerpos a los 6 meses del inicio de la enfermedad. No encontraron diferencias en cuanto a la aparición de los anticuerpos antiVHC dependiendo de las rutas de transmisión, ni tampoco hallaron correlación entre la cinética de aparición de dichos anticuerpos y la evolución de la hepatitis.

Con el desarrollo de las técnicas de ELISA y RIBA de segunda generación, Chemello y cols, (1991) estudiaron la prevalencia y la cinética de los anticuerpos contra epítomos estructurales y no estructurales del VHC en 28 pacientes con hepatitis aguda NoANoB, en análisis semanales durante la fase aguda y posteriormente de forma mensual. Los anti-C100, 5.1.1, C33c y C22 fueron detectados por ELISA I y RIBA II y los anticuerpos contra NS1, NS5 y S2 fueron analizados: el anti-C33c apareció en primer lugar en el 50% de los casos seguido del anti-C22 y anti-C100. El anti-S2 fue un anticuerpo tardío, a menudo apareció después de un año del inicio de la enfermedad; el anti-C100 fue el primero en desaparecer en pacientes con evolución hacia la curación, y en conjunto, en los casos postransfusionales tuvo un porcentaje de positividad superior (100%) en comparación con los casos esporádicos (66,6%). Sin embargo, no encontraron diferencias en la cinética de aparición de los anticuerpos en función de las rutas de infección, concluyendo que los anti-C33c y anti-C22 son los marcadores más precoces y sensibles de infección aguda por el VHC.

La seroconversión en la infección por VHC en la fase aguda puede retrasarse hasta un año. El ELISA II reduce significativamente el aparente intervalo de seroconversión (periodo ventana), presentando la mayoría de los pacientes positividad para el IgG anti VHC en la fase aguda de la infección, aunque esta técnica no aumenta el porcentaje de seropositividades en dicha fase con respecto al ELISA 1. La IgM anti VHC se puede determinar por ELISA utilizando como fuente de antígeno la proteína C100-3; este anticuerpo aparece en alrededor del 93% de los pacientes con infección aguda, coincidiendo con el

pico de transaminasas y permaneciendo positivo durante 4-48 semanas en las formas agudas y hasta 18 meses en las formas de evolución crónica. En la hepatitis C crónica la IgM anti VHC es positiva en el 51% de los casos y su detección es útil para valorar si una hepatitis aguda va a ser autolimitada o va a evolucionar hacia la cronicidad.

Aunque la aproximación diagnóstica se ha realizado durante mucho tiempo gracias a la detección de anticuerpos antivirales, el método ideal se basa en técnicas de determinación de antígenos virales en suero. De esta forma el hallazgo de secuencias genómicas (RNA-VHC) por técnicas de PCR puede ayudar al diagnóstico de la fase aguda, ya que el RNA-VHC es mejor predictor de infectividad que el anti VHC. En la hepatitis aguda se demostró en suero que la viremia es, a menudo, precoz, coincidiendo en la mayoría de los casos con la elevación de transaminasas. En algunos sujetos con evolución crónica, la viremia persistió o fue intermitente, mientras que en aquellos que evolucionaron favorablemente, la viremia no fue detectable (Van der Poel CL, y cols, 1993).

1.8.2.- DIAGNÓSTICO DE LAS HEPATITIS VIRALES CRÓNICAS POR VHC

El diagnóstico de la hepatitis crónica viral se basa en la constatación de una elevación persistente de transaminasas, el estudio de marcadores serológicos virales y en la evidencia del daño hepático obtenida mediante biopsia.

El hallazgo de una **elevación de transaminasas** en un sujeto asintomático constituye un problema cada vez más frecuente puesto que su determinación es habitual en cualquier examen médico. Las transaminasas son enzimas de transferencia que catalizan el paso de un grupo amino de un aminoácido a un cetoácido dando lugar a aminoácidos distintos de los originales, se han identificado en el organismo más de 60 reacciones distintas de transaminación, con sus correspondientes enzimas específicas, siendo las de mayor interés clínico la Glutámico-oxalacético (GOT) o aspartato-aminotransferasa, y la glutámico-pirúvico (GPT) o alanil-aminotransferasa. La GOT es una transaminasa citoplásmica y mitocondrial del hígado, cerebro, pulmón, músculo estriado,

corazón, riñón, principalmente, y la GPT es más específica del citoplasma del hepatocito.

Es por ello que aunque la mayor parte de las ocasiones la elevación de sus niveles séricos son el reflejo de la ruptura de los hepatocitos y de su liberación al torrente circulatorio, la lisis de otros tipos celulares de forma más o menos masiva también pueden elevarlas (infarto agudo de miocardio, miocardiopatías y miopatías, enfermedades tiroideas, pancreatitis, procesos pulmonares, diabetes mellitus, etc).

Se realizará una historia clínica completa, con especial atención en la anamnesis a la historia de ingesta alcohólica, fármacos, drogadicción, tatuajes, intervenciones quirúrgicas o manipulación odontológica, hábitos sexuales, antecedentes de transfusiones o de exposición con personas sospechosas de hepatopatías; también la existencia de otras enfermedades son indicativas: hiperlipemias, enf. tiroideas, enf. de Addison, diabetes, miocardiopatías, enfermedad musculares (miastenia gravis), así como la historia familiar de hepatopatías o diabetes.

Algunos datos analíticos iniciales pueden ser orientativos: el bebedor excesivo suele presentar alteraciones analíticas indicativas tales como elevación de la GGT y una relación de GOT/GPT mayor de 1. En las enfermedades hepatobiliares y algunas pancreáticas suele existir un importante movimiento de las enzimas de colostasis, y las hiperlipemias con/sin obesidad (causa de esteatosis hepática), a veces asociadas con diabetes, presentan datos analíticos fáciles de evidenciar. Un primer paso aconsejable sería la suspensión de fármacos o en su caso su sustitución por otros menos sospechosos, control de diabetes, dieta hipocalórica, etc, y repetir analítica pasadas 4-6 semanas ya que en la práctica, la ingesta alcohólica excesiva, el uso y abuso de fármacos, la obesidad y la diabetes, son causas relativamente frecuentes de hipertransaminasemia. En el control se puede incluir la ecografía hepatobiliar y gammagrafía hepática.

La **serología viral** proporciona información de máximo interés dado que en nuestro medio la mayor parte de las hepatopatías crónicas son de origen viral. Se

solicita de rutina HBsAg para descartar las infecciones crónicas por VHB y antiVHC cuya positividad se considera en la práctica como infección por el virus C, particularmente si la detección se ha realizado con las modernas técnicas de RIBA frente a antígenos de proteínas estructurales y no estructurales del virus. La PCR aplicada al virus C permite detectar el virión circulante.

La detección de secuencias genómicas (RNA-VHC) por PCR se realizó en pacientes con hepatitis C crónica por Artini y cols. (1991), observando que el RNA-VHC podía ser positivo en ausencia de anti-VHC determinado por ELISA I y II, siendo un marcador útil para valorar el estado de replicación del VHC y para monitorizar la eficacia del tratamiento antiviral. De igual forma, Castillo y cols, (1991a) detectaron RNA-VHC por PCR a partir de "primers" (secuencias conocidas de nucleótidos) de diferentes regiones en pacientes con enfermedad crónica, concluyendo que la determinación en suero de RNA en estos enfermos alcanza una sensibilidad del 80% para detectar replicación vírica. El RNA-VHC se estudió también en hígado, con resultados que sugieren que las secuencias del genoma del VHC en biopsias hepáticas de infecciones crónicas pueden ser un marcador más sensible y fiable que el RNA en suero.

En el transcurso de la investigación de la hipertransaminasemia, descartados otros procesos y sugerido el diagnóstico de hepatitis crónica viral, se realizará una **biopsia hepática**. La biopsia confirma la hepatitis crónica, su actividad y su patrón histológico; además las técnicas de inmunohistoquímica y de marcadores virales en tejido hepático, proporcionan información adicional sobre el estado del virus y del sistema inmune en el propio hígado; también el posible tratamiento y su monitorización hacen aconsejable el conocimiento de las lesiones basales a tratar.

1.8.3.- DETECCIÓN DE Ac IgG SÉRICOS FRENTE AL VHC

En el diagnóstico de la hepatitis C la principal dificultad radica en la no disponibilidad en general de pruebas para detectar el antígeno viral, por ello el diagnóstico se basa en la presencia de anticuerpos antiVHC en sangre periférica fundamentalmente, que aparecen entre los 15 días y los 8 meses de iniciarse la

enfermedad con una media de 1 a 2 meses; para el caso de la hepatitis crónica postransfusional la seroconversión no ocurre hasta años después de la transfusión (Laguna del Estal P, 1993) persistiendo los anticuerpos durante un período de seguimiento medio de 6,9 años (Alter HJ, 1989b).

El VHC se encuentra en sangre en concentraciones pequeñas, por este motivo la identificación del virus o del complejo antígeno-anticuerpo fue muy difícil de reproducir. En 1989 Kuo G, (Kuo G, y cols, 1989) determinaron los antiVHC mediante una prueba de inmunoabsorbancia enzimática (Ortho-VHC), este ELISA de 1ª generación es un análisis directo que emplea el péptido de antígeno recombinante del VHC (C-100-3) codificado en la región NS4 y parte de la NS3; estas regiones NS3 y NS4 contienen los genes de proteínas que son homólogas para los virus del grupo I y II de la hepatitis C. Los antiVHC séricos se fijan al antígeno del VHC en fase sólida, luego se identifica mediante un complejo anticuerpo-enzima, que consta de anticuerpo monoclonal murino frente a IgG humana y el enzima, conjugados con peroxidasa.

Los mayores inconvenientes de esta tecnología se resumen a continuación:

- * Los test serológicos no guardan relación directa con la replicación viral y simplemente evidencian el contacto del sujeto con el virus, lo que provoca la síntesis de anticuerpos específicos. Teniendo en cuenta la alta tasa de cronificación de la infección, su presencia está consiguientemente asociada a la de los marcadores de replicación; sin embargo, existen individuos que parecen haberse recuperado de una infección antigua y que son simplemente portadores de una secuela serológica.

- * Período ventana largo: la seroconversión es a menudo tardía en el curso de la hepatitis aguda, la aparición del antiVHC puede llegar a tardar desde unos días a varios meses después del episodio agudo (ictericia, citolisis, etc); por ello no sirve para detectar la fase aguda, pudiendo los individuos expuestos al virus contagiar antes de su detección (Prince AM, y cols, 1992; Prince AM, y cols, 1993).

- * Existencia de hepatitis crónicas C seronegativas: son relativamente frecuentes en el caso de individuos inmunodeprimidos y en pacientes

hemodializados. La no detección de anticuerpos en estos casos podría estar unida a una producción insuficiente de los mismos dentro del contexto de la inmunosupresión (Pawlotsky JM, y cols, 1996).

* Las discrepancias existentes entre los tests de cribaje (ELISA) o entre un test de cribaje y otro de confirmación (inmunoblot) conducen a una interpretación difícil. Igualmente, la interpretación de los tests de confirmación puede ser conflictiva si el perfil es "indeterminado", es decir, si solamente resulta positivo uno de los anticuerpos investigados independientemente de su título (Pawlotsky JM, 1994).

* Además, el antiVHC detectado por ELISA se pierde aproximadamente al año no pudiendo precisar si la pérdida se asocia a curación o a la ausencia de replicación viral.

Por estos motivos la detección de antiVHC no se estableció como obligatoria en la mayor parte del mundo. Los falsos positivos se producen por la similitud de las secuencias de proteínas C-100-3 con otras proteínas del cuerpo humano, también se producen en casos de gammaglobulinemias (como ocurre en la hepatitis crónica autoinmune), por reacción cruzada a flavivirus y en la cirrosis biliar primaria (Wong y cols, 1991). Los falsos negativos son debidos a concentraciones bajas de Ac en suero y al periodo ventana al principio de la enfermedad donde no se detecta antiVHC.

Posteriormente se comercializaron otros enzimoimmunoensayos (EIA) más sensibles y específicos como el ELISA de 2ª generación que fue desarrollado para detectar anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales del VHC. En él se han incorporado dos nuevos antígenos: el C22-3, codificado por la región estructural C (de la que también dependen las proteínas de la nucleocápside) y el antígeno C33C, codificado por la región NS3. Los antígenos C33C y C100-3 se han reunido en uno sólo: el C-200. La incorporación de estas moléculas aumenta la capacidad de estas técnicas para detectar anticuerpos contra el VHC puesto que algunas personas infectadas por el VHC no presentan anticuerpos anti-C100 y sí anti-C22-3 y el C33C. Los anticuerpos contra estos dos antígenos son los que

aparecen más precozmente en el curso de la infección por VHC, por lo que la utilización de test de 2ª generación hace posible adelantar en varias semanas el diagnóstico de la infección por VHC en pacientes con hepatitis aguda (Sánchez-Tapias JM, y col, 1992).

La presencia de anticuerpos indicaría infección por el VHC pero un resultado negativo del test no excluye la posibilidad de exposición o de infección por el VHC, pues los anticuerpos circulantes aparecen varias semanas después de la exposición al agente.

La sensibilidad de los tests de 2ª generación en pacientes con hepatitis C aguda es del 55,64-81,62% (intervalo de confianza del 95%) (Laguna del Estal P. 1993) diagnosticando un 14% más de casos de hepatitis postransfusionales que los de 1ª generación. En hepatitis crónica el test de 2ª generación tiene una sensibilidad del 94-100% (intervalo de confianza del 95%) y una especificidad del 99,35-99,77% (intervalo de confianza del 95%) (Inove Y, y cols, 1992).

La interpretación de una reacción antiVHC positiva por ELISA en una persona sin evidencia clínica de enfermedad hepática y con transaminasas normales es considerablemente más difícil. Puede tratarse de un portador crónico asintomático, con o sin alteraciones hepáticas detectable por biopsia hepática, o de un falso positivo. La distinción entre uno y otro caso no es sencilla. Es importante investigar cada caso y seguir su evolución en el tiempo (antiVHC, transaminasas y clínica) y sobre todo, estudiar mediante la técnica de PCR como veremos posteriormente.

Sintetizando podemos decir que los test de 2ª generación han permitido relacionar etiológicamente al VHC con un mayor número de casos de hepatitis aguda, de hepatitis crónica y de cirrosis hepática, reducir el riesgo de hepatitis postransfusional al incrementar la detección de donantes portadores del VHC, y detectar los falsos positivos en poblaciones de bajo riesgo (Alter HJ, 1992b). Además las pruebas de 2ª generación son más útiles en el diagnóstico de hepatitis C aguda, ya que la seroconversión frente a antígenos estructurales ocurre antes en el tiempo, cuando aún no se ha desarrollado anticuerpos frente al antígeno C100-3.

Se comercializó un EIA indirecto de 2ª generación (MONOLISA antiVHC) para la detección de antiVHC, incluye proteínas recombinantes derivadas de la región estructural y no estructural del genoma vírico (García L, y cols, 1993). El test usa la proteína recombinante derivada de la región de la cápside, dando tres veces mayor sensibilidad al "screening" si lo comparamos a los test de 1ª generación; también usa la proteína recombinante 409-I-I, derivada de la región inmunodominante no estructural NS3, obteniéndose una mayor sensibilidad y especificidad. Esta región está muy conservada en el VHC y difiere a su equivalente en el flavivirus, por lo que es de suponer que con este EIA desaparecerán los falsos positivos relacionados con reacciones cruzadas a flavivirus.

Existe un ELISA de 3ª generación que lleva un nuevo antígeno: el HC43, que combina Core y NS3 sin fusión de la proteína huésped, permitiendo mantener la sensibilidad del core equivalente al de la 2ª generación, además incorpora el NS5; con este nuevo EIA se abarcan las zonas C+NS3+NS5 alcanzando una sensibilidad del 100% en pacientes con hepatitis aguda y del 99% en pacientes con hepatitis crónica. La especificidad es del 99,6%.

Algunos laboratorios han comercializado otras pruebas diagnósticas (Recombinant Immunoblot Assay - RIA-) basadas en la detección de anticuerpos frente a los antígenos del VHC, C100-3 y C5-I-I obtenidos por técnicas de recombinación genética, que se han inmovilizado sobre tiras de papel en forma de bandas individualizadas para cada antígeno, a esta prueba se le denomina RIBA I. Las muestras reactivas con los dos antígenos virales se consideran positivas, indeterminadas las que reaccionan con sólo uno y negativas las que no reaccionan con ninguno. Esta prueba confirma el 79,5% de los ELISA positivos con hepatitis NoANoB, siendo indeterminados el 8%, mientras que sólo confirmaría el 51,5-70% de los ELISA positivos de donantes de sangre sin antecedentes o presencia de hepatitis (Brillanti S, 1992).

Posteriormente se ha desarrollado un test de RIBA de 2ª generación (RIBA II) que incluye otros dos antígenos recombinantes además de los incluidos en el de 1ª generación. Estos antígenos corresponden a la región no estructural (C33C)

y a la región del core (C22) del virus. Los sueros que reaccionan con dos o más antígenos se consideran positivos, indeterminados los que reaccionan con uno y negativos los que no lo hacen con ninguno de los cuatro antígenos víricos. Este ensayo ha permitido confirmar el significado infeccioso de los test con resultado indeterminado en el RIBA de 1ª generación, al encontrar que la mayoría de éstas resultan positivas con el RIBA II (Leon A, 1991). Estas técnicas de inmunoblot RIBA I de dos antígenos y RIBA II de cuatro antígenos constituyen pruebas suplementarias aunque no auténticamente confirmatorias de los test de ELISA.

Existe otra prueba confirmatoria de EIA (Campagne E, 1992) denominada DECISAN VHC que es un enzimoimmunoblot que utiliza las enzimas recombinantes usadas en Monolisa, es decir, la NC-450 y la 409-I-I junto con dos péptidos sintéticos seleccionados de epítomos inmunodominantes, uno de la cápside (C2) y otro de la región NS4. Cada tira del Inmunoblot lleva seis bandas: dos bandas controles, dos bandas correspondientes a antígenos estructurales C1 (NC450) y C2 (péptido sintético) y dos bandas correspondientes a antígenos no estructurales: NS3 (409-I-I) y el NS4 (péptido sintético).

El ELISA Monolisa antiVHC tiene una especificidad del 99,84% y los métodos "confirmatorios" RIBA II y DECISCAN VHC confirmarían del 61-69,5% de los resultados obtenidos por un ELISA de 2ª generación (Monolisa).

1.8.4.- MARCADORES DE INFECTIVIDAD

Los ensayos descritos en el apartado anterior tienen por objetivo el detectar anticuerpos frente a una o varias fracciones del VHC, pero sus limitaciones hacen indispensable la utilización de tests virológicos directos, marcadores en suero e hígado, que proporcionaran información sobre la infectividad o el estado replicativo del virus.

1.8.4.1.- Antígeno del virus C de la hepatitis

Hasta la fecha no se ha desarrollado ningún test comercial para la

identificación del antígeno VHC en suero de pacientes pero sí se ha publicado la detección del antígeno de la nucleocápside del virus C en suero de pacientes antiVHC positivo (Takahashi K, 1992). Se trata de un ELISA cuya fase sólida consiste en un anticuerpo monoclonal dirigido frente a 35 aa de la proteína de la nucleocápside. La presencia en sueros del antígeno de la nucleocápside del virus C se detecta en un 83% de los casos estudiados, existiendo una correlación directa entre los niveles de antígeno y los del genoma viral en suero o nivel de viremia.

La aplicación al diagnóstico rutinario de esta técnica es difícil debido a la gran cantidad de suero requerido (30 ml) y a la necesidad de disponer de grandes medios técnicos de laboratorio. La dificultad para determinar la presencia del antígeno del VHC se debe a las bajas concentraciones de virus circulante y a que estos antígenos se hallan enmascarados por anticuerpos, formando inmunocomplejos.

Además de en suero se detecta el VHC Ag en biopsias hepáticas tanto fijadas como congeladas (Hosoda K, 1991) siendo de gran importancia en el diagnóstico de la infección por virus C. La determinación del Ag en el hígado se realiza por técnicas de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales frente a diversos antígenos del VHC (anti core, anti NS3 y antienvuelta viral) o con la fracción IgG purificada de sueros de chimpancés y humanos con hepatitis C crónica. Los VHC Ag se localizan exclusivamente en el citoplasma de los hepatocitos, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad y en la mayoría de los casos, el número de hepatocitos infectados es menor al 5% (Hiramatsu N, 1992) y la intensidad de la tinción no se relaciona ni con el nivel de transaminasas ni con la presencia del RNA viral en el suero. Sin embargo, aún se desconoce la interrelación entre la presencia de Ag virales y el genoma del VHC en hígado.

En el 71% de los pacientes con antiVHC positivo se detecta el VHC Ag en biopsia hepática, mientras que se detecta el RNA vírico en hígado en el 63% de los pacientes con hepatitis crónica NoANoB (Hiramatsu N, 1992).

1.8.4.2.- IgM sérica frente al VHC

No cabe esperar la detección de anticuerpos contra antígenos de la cápside viral de clase IgM (IgM antiVHC) en la fase aguda de la infección ya que la proteína C-100-3 es una proteína no estructural en lugar de un antígeno de la cápside viral, pero se considera que puede ser un marcador útil de actividad de la enfermedad en la hepatitis crónica (Kikuchi T, y cols, 1993).

Existe una correlación positiva entre la presencia en suero de anticuerpos del tipo IgM frente al antígeno C100 y la actividad de la enfermedad en hígado causada por el VHC. Se detecta en pacientes positivos, tipo IgG para el VHC, anticuerpos IgM en el 82% de los enfermos con hepatitis crónica clínica e histológicamente probada, pero no lo encuentran en ninguno de los pacientes asintomáticos con niveles normales de GOT. Esto contrasta con los resultados, falsos negativos, que encontramos cuando detectamos anticuerpos antiVHC del tipo IgG (Brillanti S, y cols, 1992).

Se ha desarrollado un enzoinmunoanálisis en fase sólida específico para IgM para el diagnóstico de la infección por el VHC (Kuo G, y cols, 1989). Este análisis emplea la combinación de un antígeno estructural codificado en el extremo 5' del genoma del VHC (región core) y también antígenos no estructurales (NS) codificados por las regiones NS3 (C33) y NS4 (C100-3) del genoma del VHC.

La IgM anti core del VHC se detecta más frecuentemente que la IgM anti C100-3 o la anti C33. Las IgM comienzan a elevarse al mismo tiempo que se elevan las IgG antiVHC. Sin embargo los antiVHC de tipo IgM desaparecen a los 6 meses en las hepatitis agudas autolimitadas, cosa que no ocurre con los anticuerpos IgG. En los pacientes que evolucionan hacia la hepatitis C crónica, los IgM persisten en suero.

Los picos de IgM suelen coincidir con los de GPT o se encuentran en valores cercanos, disminuyendo ambos cuando la hepatitis se autolimita. Parece pues que existe una correlación positiva entre la presencia de anticuerpos séricos IgM frente al VHC y la actividad de la hepatopatía inducida. Además se ha comprobado que

los anticuerpos IgM frente al VHC se hacen indetectables en los pacientes sometidos a terapia con interferón que tienen una respuesta positiva mantenida en el tiempo. (Krawaczynski K, 1992B; Brillanti S, 1992; Pucci DL.).

En resumen, la persistencia de los anticuerpos IgM antiVHC después de la infección aguda indicaría evolución a la cronicidad y se podría utilizar como un marcador precoz para identificar los pacientes más adecuados a un tratamiento antivírico. Además la desaparición de los anticuerpos IgM frente al VHC en los pacientes con hepatitis C crónica que mostraran respuesta al tratamiento con IFN alfa, indica que la respuesta será mantenida, sirviendo como marcador de gran importancia ya que hasta el momento la eficiencia de los tratamientos contra la hepatitis C sólo puede estimarse mediante la desaparición del RNA viral mediante PCR y/o por los cambios histológicos del hígado mediante biopsias repetidas, requiriendo ambos procedimientos personal altamente cualificado y elevados costes.

1.8.4.3.- Detección del genoma viral del VHC. Diagnóstico por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Tanto en suero como en tejido, el virus C de la hepatitis se encuentra a muy baja concentración, por ello las técnicas de hibridación molecular convencionales no presentan la sensibilidad suficiente para determinar la presencia del genoma del VHC (RNA-VHC). Por este motivo la tecnología que se usa para la detección de este marcador viral es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La prueba se basa en “crear” sucesivas copias de ácidos nucleicos mediante el enzima DNA Polimerasa que es capaz de replicar una cadena de DNA tomando otra como molde. El conjunto de nuevas copias de DNA es identificado mediante electroforesis. Como paso previo se ha obtenido DNA complementario (cDNA) a partir del RNA viral mediante el uso de la transcriptasa inversa.

El RNA que se detecta mediante esta prueba es el marcador más sensible para el diagnóstico de la hepatitis por el virus C. También es el marcador más

temprano en positivizarse, es posible detectar RNA-VHC en pacientes a los que se transfunde sangre infectada de 1 a 4 semanas después de la transfusión, cuando aún no se ha desarrollado el cuadro clínico ni ha aparecido antiVHC en el suero (Laguna del Estal P, 1993). Una de las principales ventajas de este método para el diagnóstico es que permite la amplificación de cualquier secuencia de DNA, incluso en casos en los que este se encuentre degradado (Estivill X, 1991).

Los primeros trabajos realizados detectaban el RNA-VHC en suero mediante PCR entre el 40-80% de los pacientes antiVHC positivos en el test ELISA (Kawasaki ES, 1989; Kaneko S, 1990); sin embargo, los resultados obtenidos por diferentes autores eran heterogéneos debido principalmente a la elevada heterogeneidad viral, utilización de "primers" o cebadores de diferentes regiones genómicas, cantidades de muestra variable y diferentes métodos de extracción de ácidos nucleicos.

La inconstancia de la secuencia de nucleótidos de algunas regiones hipervariables del genoma viral puede hacer ineficaz el intento de detectar RNA vírico en el suero o en los tejidos mediante reacciones de PCR. Por este motivo la detección del RNA-VHC se basa en la amplificación de la región 5' terminal no codificante o 5' UTR cuya secuencia de nucleótidos es la más constante y conservada en todos los VHC aislados (Takehasa T., 1992). El uso de cebadores localizados en esta región para realizar la PCR ha aumentado significativamente el porcentaje de detección del RNA-VHC en suero (hasta un 90%) en pacientes con hepatitis crónica (Buch J, 1992)

Hay que considerar que esta región también está altamente conservada y es similar en un 45-49% a la de los pestivirus; éstos sólo producen infecciones en los animales pero podría existir algún tipo que afectara al hombre. Por consiguiente la elección de los "primers" que se utilizan en esta técnica es fundamental, deberán estar bien conservados entre las distintas variantes del VHC para asegurar una buena sensibilidad, a la vez que no deben estar presentes en otros virus, evitándose así la inespecificidad. En definitiva, es aconsejable utilizar la región 5' no codificante para la obtención de los "primers".

Hecha la descripción inicial, la técnica de detección de genomas virales mediante PCR ha experimentado variaciones significativas. A continuación se expone, de forma resumida, el método de análisis y algunas observaciones que conducen al estado actual del tema.

La técnica consiste en la amplificación exponencial "in vitro" mediante métodos enzimáticos de segmentos específicos de DNA; el resultado final es la generación de numerosas copias de DNA originales, incluso, a partir de una sola unidad de molde. El método incluye la repetición cíclica de tres reacciones similares en las que se modifica exclusivamente la temperatura a la que se llevan a cabo (Mullis K, 1987; Curso de PCR. Teoría y Practica, 1993).

La amplificación es específica y es función de los oligonucleótidos o "primers" empleados, que reconocen los extremos del fragmento a amplificar y actúan como cebadores de la reacción. Además, se requiere la presencia de una mezcla de desoxirribonucleótidos que permiten generar las nuevas cadenas de DNA. La amplificación del DNA es posible gracias a la enzima polimerasa de DNA termoestable, resistente y activa a fluctuaciones alternantes de temperaturas comprendidas entre 4°C, 45°C, 72°C y 95°C.

En este caso concreto del VHC el genoma a amplificar es RNA de cadena simple por lo que se requiere el tratamiento previo con una transcriptasa inversa (Polimerasa RNA dependiente) con objeto de generar un fragmento de DNA (cDNA) equivalente que se amplifique.

La sensibilidad de la reacción de PCR radica en las características propias de los componentes del sistema: DNA diana, los cebadores o "primers", el tampón, el $MgCl_2$, los desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP y la Polimerasa de DNA termorresistente.

*** El DNA diana:**

DNA y RNA son macromoléculas que almacenan y transfieren la información genética. Una cadena de ácido nucleico está compuesta por unidades o monómeros denominados nucleótidos, los cuales, a su vez, están formados por un azúcar -ribosa en el caso del RNA y desoxirribosa en el caso del DNA-, al que

están unidos una molécula de ácido fosfórico en la posición 5' y una base nitrogenada en la posición 3'. Estas bases nitrogenadas son de dos tipos: púricas (adenina -A- y guanina -G-), y pirimidínicas (citocina -C-, timina -T- y uracilo -U- en el RNA en lugar de timina).

Cada nucleótido se une al adyacente mediante enlaces denominados fosfodiester, que consisten en la unión del fosfato en la posición 5' con un grupo hidroxilo que queda libre en la posición 3' del azúcar del otro nucleótido, formándose de esta manera el esqueleto de la cadena del ácido nucleico, y quedando las bases nitrogenadas expuestas al exterior. De este modo la diferencia entre cadenas de DNA o RNA de la misma longitud vendría determinada por la composición de bases de las mismas, además de por el orden que ocupan a lo largo de la cadena, es decir, por la secuencia de posición.

En una molécula de DNA bicatenario, las dos cadenas se mantienen unidas formando una estructura en doble hélice, gracias a enlaces por puentes de hidrógeno formados entre bases complementarias de una y otra cadena, de modo que la A es complementaria a la T y la G a la C. La estructura en doble hélice de una molécula de DNA bicatenario da lugar a la formación de un surco mayor entre una vuelta de doble hélice y la adyacente, y un surco menor entre las dos cadenas de la doble hélice.

El DNA es una molécula muy estable, de naturaleza hidrofílica (exterior) e hidrofóbica (interior). Los puentes de H mantienen las dos cadenas unidas pudiéndose romper estos enlaces y volverse a unir, lo que provoca la desnaturalización y renaturalización del DNA. El pH del medio, la presencia de iones Ca^{++} y Na^+ y la temperatura influyen en su estabilidad. Otra característica del DNA es que puede formar híbridos, bien con su cadena complementaria bien con cebadores.

*** Los “primers” o cebadores:**

Son secuencias conocidas de 15-30 pares de bases, de cadena simple, complementarias a secuencias del DNA problema, que reconocen los extremos del fragmento a amplificar y actúan hibridándose al DNA diana. Son los

responsables de la especificidad de la reacción.

Su unión al DNA molde es función de la temperatura de hibridación y ésta es proporcional a la cantidad de nucleótidos que contenga el cebador. A esta temperatura se aparean las bases complementarias hibridando sus enlaces por puentes de hidrógeno. Para oligos de menos de 25 pares de bases la temperatura de hibridación viene definida por:

$$T_H : 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

Los cebadores que estarán presentes en exceso, compiten con la otra cadena durante el enrollamiento de las cadenas y no limitan la tasa de polimerización; una pareja de cebadores delimita la región por amplificar en el molde de DNA ya que determina la longitud del segmento amplificado.

La síntesis a partir de un cebador se caracteriza por el hecho de que no es de novo, los cebadores se hibridan con secuencias complementarias en la diana. La hibridación se ve afectada por las condiciones físico químicas del ambiente. La fidelidad de la reacción es función del enzima.

*** Solución tampón, $MgCl_2$ y stocks de dNTPs**

Sus características y concentraciones a las cuales se utilizan quedan descritos en el apartado correspondiente de Material.

*** Polimerasas de DNA termorresistentes:**

La amplificación del DNA es posible gracias a las enzimas polimerasas de DNA termoestables, resistentes y activas en rangos de temperaturas muy precisos. Inicialmente se usó el fragmento Kenow de la DNA polimerasa de E. Coli para producir la síntesis de DNA, pero esta enzima se inactivaba a la temperatura necesaria para desnaturalizar las dos hebras de DNA.

Se buscó una enzima que no se desactivara por el calor como la DNA polimerasa de "Thermus aquaticus" (YT1), bacteria que vive a altas temperaturas; actualmente se trabaja con la Taq-polimerasa recombinante. Posee un peso molecular de unos 94KD; su temperatura óptima de actuación está comprendida entre 72-80°C. Es estable en más del 50% a 95°C durante 40 minutos. Tiene una

fidelidad de 1.1×10^{-4} sustituciones por ciclo. Necesita para su actuación una concentración de iones Mg^{++} entre 0.5 mM y 10 mM. Posee actividad exonucleasa (corrige errores) en dirección $5' \rightarrow 3'$ y no $3' \rightarrow 5'$, y actividad transferasa: $5'$ --dATP.

Todo el proceso de PCR tiene lugar gracias a la mecanización de la técnica. Parte fundamental del protocolo es un sistema de control de la temperatura. Para ello se emplean termocicladores que mantienen la temperatura uniforme en todas las muestras a testar y con capacidad de reproducibilidad ciclo a ciclo.

Existe una limitación a la amplificación, la producción de amplificados no es infinita; se produce un efecto "plateau" o meseta cuando decrece la eficiencia de la reacción con el incremento del número de ciclos. Probablemente sea debida a varias causas como son: a) una inactivación térmica de la enzima, b) consecuencia de una concentración limitante de la misma, c) una reducción de la eficacia de desnaturalización, d) la ineficacia en el paso de hibridación o finalmente e) una destrucción del producto por exonucleasas existentes en el medio. Este efecto ocurre aproximadamente a partir de 35 ciclos.

Los primeros ciclos de la PCR son extremadamente importantes, así es más "difícil" para los cebadores "encontrar" secuencias complementarias inicialmente y poder hibridarlas. El hecho de que se trate de una hibridación bajo la regulación de la temperatura de enrollamiento de los cebadores también influye, así como el incremento exponencial de los moldes a amplificar se va a ver alterado si la selección inicial es pobre ya que los productos también lo serán.

Para el caso concreto de la utilización de la técnica de PCR en la identificación del VHC se ha seguido el protocolo descrito en el apartado Material y Métodos.

El método elegido para el análisis de los productos amplificados ha sido la electroforesis del DNA en geles de agarosa. Este método permite separar las moléculas de DNA de acuerdo con su tamaño. Los resultados de la electroforesis están condicionados por una serie de parámetros tales como el gradiente de

voltaje aplicado, la dimensión de los poros del gel, la conformación del ácido nucleico y su tamaño, la concentración de sal en el tampón, etc.

La corriente aplicada a los extremos de un gel de agarosa genera un campo eléctrico con una fuerza que está definida por la longitud del gel y la diferencia de potencial en ambos extremos (V/cm). Las moléculas de DNA expuestas a este campo eléctrico migran hacia el ánodo debido a la carga eléctrica negativa de los fosfatos presentes en la doble hélice, estando limitada la velocidad de migración por la fricción del DNA con la matriz del gel. En general, las moléculas de DNA migran a través del gel a una velocidad proporcional a la intensidad de la corriente aplicada.

El grado de separación de las moléculas de DNA depende del tamaño de los poros del gel, que es proporcional a la concentración de la agarosa en el mismo. Cuanto mayor es el tamaño de los poros (menor concentración de agarosa) mejor se separan los fragmentos de mayor peso molecular, mientras que al existir un menor tamaño de los poros (mayor concentración de agarosa) se separan mejor los fragmentos de bajo peso molecular. En general concentraciones de agarosa entre 0.5 y 1% permiten separar fragmentos entre 0,5 y 30 Kb.

1.8.4.3.1.- VENTAJAS DE LA PCR

Una característica fundamental de la PCR empleada en protocolos diagnósticos es que permite la amplificación de cualquier secuencia de DNA, incluso en casos en los que este se encuentre parcialmente degradado. Además las dos grandes ventajas de la PCR son la elevada especificidad y gran sensibilidad.

La especificidad está definida por la secuencia de los “primers” empleados ya que los cebadores se hibridarán exclusivamente con la secuencia de ácidos nucleicos buscada. La sensibilidad responde a que con una sola molécula de ácido nucleico diana es suficiente para obtener miles de copias; no obstante, esta alta sensibilidad implica al mismo tiempo uno de los mayores problemas derivados

del uso de la PCR: se detectan con frecuencia falsos positivos a partir de contaminaciones por amplificados previos. La sensibilidad y especificidad de la PCR se puede incrementar mediante la aplicación de la llamada "nested" PCR (PCR en forma de nido o anidada), descrita con anterioridad.

Otras ventajas de la metodología son el que no requiere ningún tipo de respuesta por parte del huésped, los microorganismos no tienen que estar multiplicándose, las secuencias a detectar pueden ser DNA o RNA, las muestras pueden corresponder a cualquier líquido o tejido del organismo; al poseer una sensibilidad muy alta no se requiere el uso de técnicas con limitaciones concretas como es el uso de isótopos radioactivos. Todos estos puntos permiten predecir que el cociente costo/beneficio de la aplicación de esta tecnología al diagnóstico de enfermedades infecciosas disminuirá drásticamente, por lo que podrá en muchos casos sustituir a algunas técnicas tradicionales.

1.8.4.3.2.- Inconvenientes de la PCR

La contaminación con fragmentos de DNA amplificados anteriormente es el principal problema de esta prueba; puede existir un alto grado de contaminaciones cruzadas entre los tubos donde se encuentran las muestras ya amplificadas y los tubos donde se preparan nuevas muestras. La contaminación es la principal causa de que aparezcan falsos positivos en las muestras analizadas, los falsos negativos se producirán por error en la técnica o cuando los cebadores no encuentren la secuencia específica a amplificar.

Esta posibilidad de contaminación obliga a definir controles rigurosos: positivo débil, se trata de una muestra que garantiza la amplificación con seguridad pero con bajo número de copias; negativo, muestra sin DNA molde y control múltiple de reactivos usados. Es importante controlar las condiciones óptimas de cada componente de la reacción de amplificación ya que son al menos ocho variables las que intervienen y vigilar el proceso de amplificación, prestando especial atención a temperatura y tiempo. El ensayo deberá ser realizado, al menos, por triplicado.

Puede existir una amplificación inespecífica debida a la presencia de un DNA extraño al espécimen problema, ésta se obvia mediante un aumento de la temperatura de hibridación, reduciendo la cantidad de DNA diana, adecuando la concentración de Mg^{++} o bien usando dimethylsulphoxido (DMSO) al 10% o formamida al 1.25 - 5%.

Para poder realizar la PCR, debe contarse con un personal que posea una adecuada preparación en técnicas de biología molecular.

1.8.4.3.3.- Utilidad de la PCR en muestras séricas de hepatitis por VHC

La técnica de PCR se ha aplicado rutinariamente al diagnóstico de las hepatitis que son atribuidas a infección por VHC. La experiencia acumulada permite identificar situaciones clínicas en las que esta metodología puede ser especialmente útil. A continuación se describen algunos casos concretos de aplicación del test, de forma complementaria a otras pautas diagnósticas.

1) Diagnóstico de la hepatitis C aguda. Debido a que en muchos casos la positividad de los anticuerpos antiVHC no ocurre hasta los 4-6 meses de la infección y entre la 5 y 20 semanas después del comienzo de los síntomas, el test antiVHC no es eficaz para diagnosticar la hepatitis en estadíos iniciales. La precocidad de la técnica de PCR es una ventaja en tal situación.

2) Seguimiento de pacientes antiVHC (-) con hepatitis crónica, sobre todo si la función hepática es normal.

3) Evaluación de la respuesta al tratamiento de la enfermedad con los diferentes fármacos empleados como interferón o ribavarina.

4) Detección específica del virus en sangre circulante especialmente en el caso de los donantes con niveles normales de transaminasas, o en cualquier biopsia tisular.

5) Determinación del estado replicativo del virus (detección del RNA antigenómico).

6) Establecimiento de la transmisión vertical madre-hijo, en madres infectadas por VHC de forma crónica.

7) Evaluación de la persistencia de viremia en ausencia de seroconversión en recién nacidos de madres portadoras.

8) Como prueba confirmatoria de los "screening" realizados (por su sensibilidad y especificidad). La positividad de la prueba siempre indica infectividad

9) En el diagnóstico de la hepatitis C en pacientes donde no ha sido reactivo el test de los anticuerpos por inmunidad alterada o error en la técnica.

10) Evaluación de las infecciones por VHC después del trasplante de hígado o de cualquier otro tipo de trasplante.

11) Evaluación del posible contagio del virus tras exposición accidental a sangre contaminada, por un pinchazo en el medio laboral, etc, ya que se puede detectar la viremia a los pocos días de la exposición al virus, algunas semanas antes de que aparezca la elevación de la GPT o de los anticuerpos circulantes.

12) Confirmación de los resultados indeterminados obtenidos por RIBA particularmente en pacientes con antiVHC(+) y con hepatitis autoinmune tipo 2, pues sabemos que es característico en estos sujetos la presencia de anticuerpos antimicrosomales (hígado y riñón), que son confirmados por inmunoblot de antiVHC en alrededor del 75% de los casos, resultando posteriormente falsos positivos.

13) Detección simultánea de HVB y HVC mediante una técnica de PCR combinada.

14) Decisión para una terapia con Interferón en el caso de una hepatitis crónica C antiVHC (+) con autoanticuerpos anti-LKM1.

1.8.4.3.4.- Detección del RNA-VHC por PCR en hígado

Además de en suero y aplicando técnicas de PCR, se ha demostrado la presencia del genoma viral RNA-VHC en hígado (Takehasa T, 1992). Las aplicaciones de la técnica de PCR a la detección del VHC admite ciertas adaptaciones metodológicas que pueden ser de utilidad para procesos muy concretos. Así por ejemplo, ya que es sabido que en su ciclo de replicación viral

origina intermediarios de cadena antigenómica (de polaridad negativa), la detección de este RNA antigenómico generará información sobre el estado replicativo del virus en el tejido o medio en el que se encuentre. Así se ha comprobado que la positividad al RNA-VHC en suero de pacientes con hepatitis crónica por virus C (indicativo de una viremia activa) se asocia siempre a la presencia del RNA viral de cadena antigenómica en los hepatocitos de dichos pacientes (Castillo I, y cols, 1991b).

No sólo se detecta el genoma viral en los hepatocitos, sino que demuestran la existencia de RNA viral de cadena antigenómica. Su detección se realiza sustituyendo en el paso de transcripción inversa el "primer" antigenómico (complementario al RNA genómico) por el "primer" genómico (complementario a la cadena antigenómica del RNA). Si en la muestra existe RNA-VHC de polaridad antigenómica se sintetizará el cDNA y luego esto se amplificará por la técnica de la PCR. Si embargo, ya que para el proceso de amplificación hay que añadir el "primer" antigenómico, se debe inactivar la enzima transcriptasa inversa antes de iniciar la PCR, para evitar falsos positivos en la detección de RNA-VHC antigenómico. La inactivación se realizará calentando la mezcla de reacción a 95°C, durante un mínimo de 40 minutos y transfundiéndola inmediatamente a 4°C hasta el momento de iniciar la PCR.

1.8.4.3.5.- Detección del genoma VHC por PCR en otras localizaciones

Igualmente se ha comprobado mediante PCR que el VHC puede infectar tejidos extrahepáticos como células mononucleares de sangre periférica (CMSP), piel y tejido nervioso. (Zignego A, y cols, 1992).

En las CMSP se ha detectado tanto la cadena genómica viral como la antigenómica (intermediario replicativo), especulándose que estas células pueden servir como reservorio viral y, por tanto, podrían estar implicadas en la recurrencia de la infección por virus C tras el trasplante hepático o tras la suspensión del tratamiento antiviral. En la colonización de estas células se desconoce si esto es un reflejo de la fagocitosis del virus circulante o por el contrario refleja una

infección real de esta subpoblación de células mononucleares. Diferentes estudios han detectado RNA-VHC en poblaciones de monocitos, macrófagos y linfocitos B y T de pacientes infectados (Navas S, 1993; Müller HM, 1993; Jin- Town Wang, 1992; Bartolomé J, 1993B; Zignego AL, 1992; T'Sang-T'Sang MD, 1992; Bouffard P, 1992).

En resumen, la PCR es una magnífica herramienta para el diagnóstico de la viremia por VHC, pero requiere instalaciones y aparataje adecuado, personal especializado y tiempo.

Antes de comenzar a utilizar la PCR, deben definirse claramente los criterios que debe cumplir la aplicación concreta que se quiere desarrollar. Los parámetros a considerar son los siguientes:

- Incidencia y prevalencia en el medio de la enfermedad infecciosa que se diagnostica.
- Beneficios que el diagnóstico aportará al paciente y/o a la sociedad.
- Infraestructura requerida del laboratorio y coste de adaptación.
- Coste del material fungible y tiempo de trabajo en comparación con las técnicas tradicionales aplicadas al mismo diagnóstico, valorando también la rapidez y ganancia en sensibilidad y especificidad.
- Formación técnica y capacidad de aprendizaje del personal que desarrollará la tarea.
- Tiempo empleado para diseñar el protocolo y su optimización.

Para que se acepte la PCR como método que sustituya a otros anteriores, se requiere que los trabajos comparativos demuestren una clara superioridad sobre ellos en tiempo, eficacia y costo/beneficio.

En caso contrario la utilización de esta técnica solo debería considerarse como técnica complementaria o confirmatoria para casos de resultados ambiguos.

Para analizar la fiabilidad en la detección del RNA-VHC mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa se ha realizado un estudio multicéntrico europeo, coordinado por el EUROHEP (grupo europeo de expertos en hepatitis virales). En el trabajo participaron 31 laboratorios europeos y solamente un 16%

de los laboratorios participantes obtuvo los resultados correctos con respecto a la presencia o ausencia de RNA-VHC, el 61% obtuvo falsos resultados (positivos o negativos) y el 23% no detectó las pruebas que eran débiles positivas pero si la de sueros positivos fuertes (Zaaije HL, y cols, 1993). Estos datos indican que es imprescindible conseguir la antes posible estandarizar la técnica de PCR para detectar el RNA-VHC.

1.9.- TRATAMIENTO

1.9.1.- TRATAMIENTO DE LAS HEPATITIS AGUDAS POR VHC

En los últimos años no se han producido adelantos en el tratamiento de las hepatitis agudas y los escasos avances realizados consisten en la demostración de que los métodos de tratamiento antes recomendados no son eficaces para mejorar la evolución o desenlace de las hepatitis agudas. Las recomendaciones en el tratamiento, consistentes en medidas inespecíficas, sirven por igual para todos los tipos de hepatitis.

Las medidas generales son en realidad de escaso valor. Salvo en los casos avanzados de enfermedad hepática el paciente puede llevar una vida completamente normal, cuando el cuadro clínico así lo aconseja se debe adoptar una aptitud más intervencionista mediante la cual se controla la función renal, se instaura una dieta hiposódica o suplementos vitamínicos (tipo vitamina K), y se evitan los tratamientos crónicos con AINEs. Eliminadas las bebidas alcohólicas y los medicamentos con comprobada o supuesta acción hepatotóxica, el resto de los medicamentos llamados hepatoprotectores y otras medidas heroicas (dietas severas, inactividad rigurosa, etc) no tienen ninguna utilidad y, con frecuencia, disminuyen la calidad de vida del paciente.

1.9.2.- TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C.

La hepatitis crónica por virus C representa el 70% del total de las HC, siendo un serio problema de salud mundial. La intervención terapéutica en este proceso

está justificada por la elevada prevalencia de la enfermedad, el potencial infeccioso de los portadores, su curso progresivo insidioso, tendente a la cirrosis hepática, y el posible desarrollo de hepatocarcinoma cifrado alrededor de un 20% (Dienstag JL, 1983; Hoofnagle JH. 1990; Tsukuma H,1993).

Los **objetivos** de la terapéutica persiguen la eliminación de la reacción inflamatoria, la negativización o disminución de los títulos de Ac circulantes y la desaparición del RNA viral.

Los **criterios** de respuesta al tratamiento son: la normalización de las cifras de transaminasas, mejoría histológica y desaparición o descenso de antiVHC con desaparición del RNA viral circulante. De todos ellos el objetivo más importante es la erradicación del virus hecho que en la actualidad aún no se ha conseguido.

En la historia natural de la enfermedad las oscilaciones del nivel de GOT/GPT son habituales, incluso se asiste a períodos de normalización total, independientemente de los datos histológicos. Tampoco conocemos el significado e importancia de la respuesta "incompleta", denominando así el descenso de los niveles de transaminasas de forma importante (más del 50% sobre valores basales) pero sin alcanzar el nivel de la normalidad. Por otro lado, la mejoría histológica puede no ser evidente a corto plazo.

Otros estudios sobre los marcadores virales en tratamientos con IFN indican que la normalización de las transaminasas se acompaña en un alto porcentaje de casos (90%) del descenso de títulos de antiVHC con desaparición de la fracción IgM y negativización del RNA viral, hecho que ocurre escasamente (12%) en los pacientes que no responden (Brillanti S, y cols, 1992).

1.9.3.- LOS INTERFERONES Y SUS IMPLICACIONES BIOLÓGICAS

En 1.957 Isaacs y Lindenmann (Isaacs A, 1957) descubrieron una proteína secretada por células infectadas por virus capaz de inducir en las células no infectadas previamente resistencia a la infección viral; a tal proteína la denominaron interferón (IFN). Durante los años siguientes numerosos descubrimientos se han realizado en la caracterización molecular y biológica de

esta y otras proteínas pertenecientes a la familia de las citoquinas.

Las proteínas IFNs se clasificaron inicialmente según las células que las producen, sus propiedades químicas y características antigénicas. Así se describió el IFN leucocitario, fibroblástico y el inmuno-interferón. Actualmente se acepta la existencia de tres clases de IFNs, denominados alfa, beta y gamma (Díaz M, y cols, 1993). El alfa y beta constituyen el anteriormente llamado tipo 1 y son producidos preferentemente por los linfocitos B y monocitos el IFN alfa, y por fibroblastos, el IFN beta; el IFN gamma, secretado por los linfocitos T y por las células natural killer (NK), es el antiguo tipo 2 o inmunoferón. Los IFNs alfa y beta tienen una similitud de al menos un 30% en su estructura primaria proteica, no siendo así para la secuencia de aminoácidos del IFN gamma.

Es importante resaltar que los IFNs son un componente natural de la defensa del organismo, formándose rápidamente en las diferentes infecciones, con un papel reforzante de la cascada de mecanismos de defensa que se ponen en marcha cuando el organismo lo precisa. Isaacs y Lindenmann (Isaacs A, 1957) demostraron que estas sustancias poseen especificidad de especie, es decir, que el IFN producido por células humanas presenta actividad en cultivos de células homólogas y es escasa entre células de otros organismos.

El **IFN alfa** constituye una familia molecular de al menos veinticuatro especies diferentes codificados por los correspondientes genes localizados en el cromosoma 9 (Shocos TB, y cols, 1982). El peso molecular varía entre 16-27.000 daltons y los distintos subtipos presentan una similitud del 50% en la secuencia de a.a., con reiterada conservación de la región comprendida entre los a.a. 139 y 157. Estos IFNs no están glicosilados y son estables a pH 2. La especificidad de especie es válida con limitaciones, ya que, por ejemplo, ciertos IFNs alfa humanos muestran una alta actividad antivírica en células bovinas y murinas.

El **IFN beta** se obtiene de cultivos de fibroblastos estimulados con RNA bicatenario y comprende dos especies proteicas diferentes codificadas por sendos genes situados en el cromosoma 9 (Shocos TB, y cols, 1982). El IFN beta 1 tiene un peso molecular de 20.000 daltons y el beta 2 de 26.000. Este tipo de IFN está glicosilado y muestra una alta especificidad de especie. Los inductores biológicos

de los IFNs alfa y beta en el organismo son virus o productos bacterianos, tales como lipopolisacáridos. *In vitro*, pueden ser inducidos por diversas sustancias sintéticas, como el RNA bicatenario y derivados de la acridina (Gresser I, 1961).

El **IFN gamma** es una glicoproteína de 143 a.a. cuya síntesis está codificada por un gen localizado en el cromosoma 12 (Weissmann C, y col, 1986). Hasta la actualidad, se han caracterizado dos formas moleculares diferentes de 20.000 y 25.000 daltons de peso molecular, diferenciándose entre sí por el grado de glicosilación. Se obtiene preferentemente a partir de linfocitos T y no presenta ninguna similitud con el resto de los IFNs en lo referente a la estructura del gen o de la proteína, siendo lábil en medio ácido, a diferencia del IFN alfa y beta (Díaz M, y cols, 1993).

Con respecto a la **regulación de la expresión de los genes** del IFN alfa, se ha identificado una región dentro del promotor denominada "elemento respondedor a virus" (VRE) y una región no bien definida que tendría una función de regulación negativa (Weidle U, y col, 1985; Ryals J, y cols, 1985). Las proteínas que se unirían a estas regiones reguladoras no son bien conocidas al igual que se desconoce cual sería su función exacta en la regulación. En el promotor del gen del IFN beta también se ha determinado la existencia de un VRE y solapado con él se ha determinado la existencia de tres dominios reguladores positivos (PRDI, PRDII y PRDIII) (Goodbourn S, y col, 1988).

En el caso del promotor del IFN beta son mejor conocidas las proteínas que se unen a las regiones reguladoras. Así, a la región PRDI se unen una serie de dos proteínas denominadas "Interferon Regulatory Factors" (IRF1, IRF2) (Miyamoto M, y cols, 1988; Harada H, y cols, 1989), la denominada "Interferon Consensus Sequence Binding Protein" (ICSBP) (Driggers PH, y cols, 1990) y otra proteína con estructura de "dedos de zinc" (PDRI-BFI) (Keller AD, y col. 1991). IRF1 es un factor activador, mientras que el IRF2 es un regulador negativo que se produce en ausencia de inducción por IFN beta. ICSBP es un factor constitutivo en determinados tipos celulares y es altamente inducible por el IFN gamma y finalmente PRD-BFI es un regulador negativo que se produce después de la inducción viral del IFN beta. A la región PRD II se une el factor de transcripción

NFKB, mientras que a la región PRD III se unen los factores IRF1 (con menor afinidad que a la región PRDI) e IRF2.

La acción antiviral de los INFs es desencadenada tras la unión de la molécula a los **receptores específicos** de la membrana de la célula diana, este mensaje debe llegar al núcleo celular para activar/reprimir la expresión de los genes que en última instancia dan lugar a la respuesta biológica. Tanto el IFN alfa como el beta reconocen el mismo receptor, aunque éste no está bien caracterizado; se piensa que está compuesto de al menos tres subunidades, las cuales parecen estar codificadas por genes localizados en la especie humana en el brazo largo del cromosoma 21 (Langer JA, y cols, 1990; Branca AA, y cols, 1981).

El mecanismo de la transducción de la señal en el caso del IFN alfa es el más estudiado. Tras la unión del IFN alfa a su receptor, se produce un aumento en la concentración intracelular de diacilglicerol (Pfeffer LM, y cols, 1991), éste es un activador de las diferentes isoformas de la protein-quinasa C (PKC), en concreto el IFN alfa activa a la PKC-E. Además el IFN alfa activa otras dos proteín-quinazas denominadas TYK2 y JAK1; estas quinazas fosforilan un factor de transcripción denominado ISGF3 que se encuentra de forma inactiva en el citoplasma de las células diana. El factor ISGF3 está formado por dos componentes denominados ISGF3 alfa e ISGF3 gamma, el primero está compuesto por tres subunidades, dos de ellas codificadas por el mismo gen y producidas por un proceso alternativo del mRNA, mientras que la proteína restante está codificada por otro gen diferente pero relacionado con el anterior. El ISGF3 gamma está compuesto por un sólo polipéptido de 48 KDa.

El ISGF3 alfa es el substrato de las protein-quinazas activadas por el IFN alfa. Una vez fosforilados los componentes del ISGF3 alfa éstos se asocian con el ISGF3 gamma en el citoplasma celular y el complejo ISGF3 se transloca al núcleo celular donde se une a la región reguladora de los genes activados por el IFN.

Actualmente, gracias a la clonación y secuenciación de los genes de los distintos INFs, se ha promovido su producción por técnicas de ingeniería genética, permitiendo obtener, no sólo grandes cantidades de IFN por procedimientos

microbiológicos, sino también subtipos puros. El desarrollo de la ingeniería genética se combinó con la euforia que rodeaba el potencial clínico del IFN, tentando a muchos científicos a considerar el uso de la tecnología del DNA recombinante como medio para sintetizarlo. Varios grupos de trabajo lograron introducir los genes que codifican el IFN humano en bacterias que producen las correspondientes proteínas del IFN. Hoy en día, es posible producir subtipos individuales de IFN alfa o beta a través de fermentación bacteriana. Otra posible fuente de obtención es el subcultivo de fibroblastos embrionarios humanos, pero estas células son difícil de obtener.

El IFN beta natural deriva de fibroblastos humanos diploides procedentes de tejidos neonatales; cuando el número de fibroblastos es adecuado, la producción de IFN se estimula con RNA bicatenario sintético.

El IFN gamma se obtiene habitualmente utilizando como mitógenos la enterotóxina A del estafilococo.

1.9.4.- MECANISMOS DE LA ACCIÓN ANTIVIRAL DE LOS INTERFERONES

De las diferentes acciones biológicas mediadas por los IFNs la primera que se observó fué la de su efecto antiviral (Isaac A, y cols, 1957). Para este efecto las principales proteínas inducidas por los IFNs son: la proteína Mx, el sistema 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5'OAS), una proteína-quinasa RNA dependiente (PKR) y los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA).

- Se han descrito dos subtipos de la proteína Mx, las denominadas MxA y MxB. La proteína MxA posee actividad antiviral y se acumula en el citoplasma celular, la proteína MxB no posee actividad antiviral. Ambas son inducidas por los IFNs alfa y beta y no por el IFN gamma aunque si aumenta de forma sinérgica la producción de las proteínas Mx cuando se asocian los IFNs alfa y gamma.

La proteína MxA parece tener un efecto antiviral intrínseco; una característica especial es que posee actividad GPT-asa imprescindible para su acción antiviral. Se desconoce el papel que podría jugar en las hepatitis crónicas por virus C. En las hepatitis agudas por virus C se ha detectado poca concentración de proteína MxA debido a un bajo nivel de la producción de IFN y

no a un déficit intrínseco de la proteína (Jakschis D, y cols, 1994).

- El sistema de la 2'-5' oligoadenilato sintetasa está constituido por tres complejos enzimáticos: a) 2'-5' fosfodiesterasa que es una enzima constitutivo de las células y, por lo tanto, no inducible por los IFNs; b) 2'-5' oligoadenilato sintetasa dependiente de RNA (2'-5' OAS), del cual en humanos existen al menos cuatro formas de distinto peso molecular. Son proteínas inducibles por IFN y necesitan distintos requerimientos de RNA bicatenario como cofactor, este RNA puede provenir, por ejemplo, de los intermediarios replicativos de los virus cuyos genomas sean de tipo RNA como en el caso del virus C de la hepatitis; y, por último, c) endorribonucleasa (Rnasa L) dependiente de 2'-5' oligoadenilatos. Se trata de una endorribonucleasa cuya concentración intracelular aumenta de 2 a 10 veces tras la exposición de las células al IFN; su activación conlleva la degradación de los RNAs tanto virales como celulares; produce un aumento de la ribonucleasa con la consiguiente disminución del mRNA, lo que determina una reducción de la síntesis proteica viral (Hovanessian AG. 1991; Zhou A, y cols, 1993).

- La proteína-quinasa RNA dependiente es una proteína inducible por los IFNs alfa y beta. Posee dos dominios fundamentales uno regulador y otro catalítico. Para que el enzima sea activo debe autofosforilarse y esta autofosforilación es RNA dependiente, esta fosforilación implica la inhibición de la síntesis proteica y la muerte celular (Samuel CE. 1993).

- Los IFNs alfa, beta y gamma inducen la expresión de HLA-I mientras que el HLA-II sólo es inducible por el IFN gamma. El mecanismo antiviral subyacente en la inducción de los antígenos HLA radica en el hecho de que estas proteínas son las que presentan, en la membrana de las células infectadas, los péptidos derivados de los antígenos virales, que posteriormente son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (Pestka S, y cols, 1997). Además, la destrucción del hepatocito mediada por células T citotóxicas responde favorablemente al interferón alfa. Se produce un aumento del cociente T CD4/T CD8.

Los **mecanismos de evasión del virus C** de la hepatitis del efecto antiviral del IFN no se conocen en la actualidad pero el hecho de que la hepatitis aguda por virus C evolucione a una infección crónica en un porcentaje de casos relativamente elevado y la existencia de pacientes no respondedores, sugiere que el virus es capaz de evitar el efecto antiviral de estas citoquinas.

Al tratarse de un virus RNA y producirse, durante su replicación, intermediarios de RNA de doble cadena (híbridos de moléculas de genoma y antígeno) se puede pensar que hipotéticamente el virus es susceptible al IFN ya que activaría a la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (PKR); sin embargo los pacientes con hepatitis C crónica son los que peor responden al tratamiento con IFN. Una explicación posible sería pensar que el genoma viral, o fragmentos derivados de él, en vez de activar a las enzimas mencionadas las inhibiesen como hacen otros virus (Kitajewski J, y cols, 1986). Tampoco se puede descartar que alguna proteína viral interfiera en alguno de los pasos de la respuesta provocada por los IFNs.

1.9.4.1.- Efectos biológicos del IFN

Las diferentes acciones biológicas del IFN se desencadenan a partir de su unión con los receptores de la superficie celular con su posterior "internalización". Esta interacción IFN-receptor tiene tres características: especificidad, saturabilidad y alta afinidad, determinando el comienzo de una serie de fenómenos bioquímicos con activación y/o inhibición de diversos sistemas enzimáticos que provocan modificaciones en la síntesis del DNA, RNA y de proteínas, así como de diversas vías metabólicas. Estos efectos bioquímicos constituyen la base de las acciones biológicas asociadas a los IFNs en sus diferentes vertientes, inhibición de la proliferación e inducción de la diferenciación celular, supresión de la replicación viral, regulación de la hematopoyesis, acción inmunomoduladora, etc. (De Maeyer-Cruignard J, et al 1985; Rossi GB. 1985; Bancheran J. 1986; Jonak GJ et al, 1986; Kimmchi A. 1987).

A.- Efecto antiproliferativo: El IFN ejerce este efecto tanto en células normales como malignas, demostrándose en distintas líneas celulares que conduce a una prolongación de la fase G1 y S+G2, sin que llegue a detenerse el ciclo en una determinada fase. El efecto antiproliferativo requiere dosis más altas de IFN que el antivírico, y es reversible.

La unión IFN-receptor provoca la estimulación de enzimas celulares como la 2'-5'OAS, proteín quinasa, proteína Mx, proteínas de superficie celular como la HLA de clase I y II, que originan inhibición de la síntesis proteica y un control del grado de división celular. La 2'-5'OAS activa las ribonucleasas que degradan el mRNA, provocando inhibición de la síntesis proteica y del DNA. La proteín-quinasa fosforila un cofactor esencial en la síntesis proteica: eif-2 (factor de iniciación peptídica eucariótica). El IFN también parece actuar inhibiendo la expresión oncogénica inapropiada y por tanto la proliferación celular "no controlada", de ahí su aplicación en Oncología.

B.- Efectos del IFN sobre el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA): el HLA es una familia multigénica, situada en el cromosoma 6 en el hombre, que controla el rechazo de trasplantes en los mamíferos. Esta familia se divide en tres clases de genes: los genes de la clase III codifican proteínas del complemento; los genes de clase I y II codifican glicoproteínas de la superficie celular. En el hombre los genes de clase I se denominan HLA-A, B, C y los de clase II, HLA-DR, DP y DQ.

El tratamiento de células humanas, tanto "in vitro" como "in vivo", con IFN humano produce un incremento de la expresión de los antígenos HLA-A, B y C en la superficie celular. Los resultados obtenidos con el IFN en clínica humana se explican en parte por sus efectos sobre el HLA. Esta explicación hipotética se ha propuesto en los tumores sólidos y en la hepatitis B, el IFN actuaría aumentando la expresión de estos antígenos y facilitando el aclaramiento de los hepatocitos infectados por los linfocitos T citotóxicos (Staeheli P. 1990).

C.- Efecto inmunomodulador: el sistema inmune se caracteriza por su capacidad de reconocimiento específico; su base celular la forman los linfocitos T y B, las células citotóxicas espontáneas y las células accesorias (como los macrófagos); el componente molecular está constituido por los anticuerpos, sistema del complemento y por un amplio número de moléculas o citoquinas (monocinas y linfocinas), encontrándose entre ellas el IFN.

La capacidad de reconocimiento específico del sistema inmune está determinado fundamentalmente por las inmunoglobulinas y los receptores de los linfocitos T. La activación de los linfocitos se produce por la interacción con un determinado antígeno; en cambio, la proliferación y diferenciación celular están reguladas por las citoquinas. De esta forma, el procesamiento antigénico por el macrófago y su subsiguiente presentación e interacción con el linfocito T cooperador, determinan la activación de aquel, produciendo la secreción al medio de Interleuquina 1, factor de necrosis tumoral (TNF), IFN alfa y beta, etc. En el desencadenamiento de los diferentes procesos de activación, proliferación y diferenciación de los elementos del sistema inmune, los IFN ejercen una importante función reguladora, bien por efecto directo sobre la célula diana, o indirecto a través de variaciones en la secreción de diferentes monoquinas y citoquinas.

Los IFNs alfa y beta pueden incrementar la liberación de Interleuquina 1 y del TNF, interaccionando con los linfocitos T cooperadores, aumentando la lisis de células neoplásicas y activando los linfocitos T y B; el IFN también incrementa la capacidad citotóxica de los macrófagos frente a células tumorales, la lisis de microorganismos intercelulares y de células infectadas por virus e induce la actividad lítica de las células NK implicadas en la destrucción de células infectadas por virus y de células neoplásicas.

La diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas está estimulada fundamentalmente por el IFN beta 1. El IFN gamma activa el macrófago, aumenta la producción de monoquinas e incrementa su actividad lítica, aumenta la expresión de las moléculas HLA I en todas las células y las HLA II en las células accesorias; regula la capacidad citotóxica de los linfocitos T y de

las células NK, además de estimular la secreción de inmunoglobulinas por los linfocitos B.

D.- Efecto antiviral: los IFNs constituyen la primera línea de defensa del organismo contra la agresión viral; el IFN formado puede conferir a los tejidos vecinos e incluso a células de órganos más distantes una resistencia a la propagación vírica. Su mecanismo parece ejercerlo al bloquear la transcripción y la transducción de la información genética intracelular, impidiendo la multiplicación vírica. También ejerce una acción antivírica indirecta al poner en marcha, en el metabolismo celular, numerosos procesos individuales, como por ejemplo activando enzimas como la 2'-5'OAS que interfiere en los procesos celulares.

1.9.4.2.- Aplicaciones clínicas del Interferón

El IFN está indicado fundamentalmente en las infecciones víricas y en el campo de la Oncología. La aplicación antineoplásica actual más importante es en la leucemia de células peludas, aunque se ha ensayado también en otros tipos de procesos cancerosos.

En el campo de las infecciones víricas la aplicación del IFN se ha centrado en las infecciones producidas por los herpesvirus, papilomavirus, citomegalovirus y los virus de las hepatitis. En las hepatitis víricas se está ensayando en las formas fulminantes, en las formas agudas por virus C y en la hepatitis crónica por VHB, VHD y VHC.

Actualmente la única sustancia con actividad biológica aceptada para el tratamiento de la hepatitis crónica por VHC es el IFN alfa, en sus variantes linfoblástica (varios subtipos obtenidos por cultivo de una línea de células linfoblásticas denominadas Namalwa) y recombinantes 2b y 2a (obtenido de bacterias que contienen el gen del IFN humano, con un solo subtipo) (Davis GL., y cols, 1995). Los datos relativos a la actividad clínica del IFN beta son escasos, fue utilizado inicialmente por vía i.m. y a dosis equivalentes a las del IFN alfa, obteniéndose resultados inferiores; no obstante, estudios recientes que han

empleado dosis más elevadas y han cambiado la vía de administración a subcutánea sugieren una eficacia comparable al INF alfa (Habersetzer F y cols, 1995).

1.9.4.3.- Eventualidades en el tratamiento con IFN

El tratamiento con Interferón no está exento de efectos indeseables que en general son dosis dependientes, y especialmente evidentes en las primeras fases del tratamiento. No obstante al avanzar el tiempo de tratamiento aparece una cierta tolerancia manteniendo sus efectos terapéuticos. Estos efectos secundarios y colaterales son más frecuentes con el IFN alfa que con el beta, aunque en algún caso se aconseja la reducción de la dosis.

Los efectos indeseables más destacables pueden ser de aparición precoz, en forma de un cuadro pseudogripal, o de presentación tardía, después de 2-3 semanas de tratamiento con pérdida de peso, insomnio, alopecia e irritabilidad. También destacan las alteraciones hematológicas y alteraciones autoinmunitarias, como la aparición de autoanticuerpos organoespecíficos, que se positivizan a bajo título hasta en un 15% de los pacientes. Más del 50% de los pacientes con hepatitis crónica C tratados con IFN desarrollan una retinopatía durante el tratamiento. También es frecuente la aparición de una tiroiditis autoinmune aunque la frecuencia de este tipo de enfermedad es relativamente baja, siendo, no obstante recomendable. determinar basalmente la presencia de anticuerpos antiperoxidasa de tiroides y así poder predecir el posible desarrollo de enfermedad tiroidea y controlar de forma más exhaustiva a aquellos pacientes que resulten positivos (Lindsay y cols, 1994).

1.9.4.4.- Interacciones farmacológicas del Interferón

Durante el tratamiento con IFN debe evitarse la administración simultánea de fármacos capaces de bloquear la síntesis proteica, por inhibir la acción del IFN. Tampoco deben administrarse fármacos cardiotóxicos, hepatotóxicos o nefrotóxicos, por el riesgo de un efecto sinérgico de toxicidad. Los medicamentos

neuroactivos pueden ocasionar fenómenos de sinergismo o de actividad neurotóxica, y los antipiréticos o antineurálgicos, como la indometacina o el ácido acetil-salicílico pueden actuar sobre mecanismos relacionados con la coagulación y producir efectos sinérgicos con la trombocitopenia inducida por el IFN.

1.9.4.5.- Anticuerpos antiinterferón

El IFN más utilizado en la clínica es el IFN alfa 2b y a pesar de ser una proteína homóloga, se comporta como agente inmunogénico. Es difícil establecer el porcentaje de pacientes que desarrollan anticuerpos anti-IFN situándose en torno al 0,5 y el 40%. El porcentaje de positividad para estos anticuerpos parece más alto en pacientes con enfermedades infecciosas que en los de procesos oncológicos. También se han encontrado diferencias significativas según la técnica empleada para su determinación: radioinmunoensayo (RIA), ELISA, o bien por ensayo biológico. Los dos primeros ponen de manifiesto los anticuerpos anti-IFN producidos *in vivo* y dirigidos contra cualquier epítipo de la molécula; por el contrario, el ensayo biológico permite detectar los anticuerpos que pueden neutralizar la actividad del IFN, dirigidos contra epítopos implicados en la actividad biológica.

Otro aspecto importante es el hecho de que los preparados de IFN natural, que en términos de actividad son análogos a los recombinantes, pueden ser menos inmunogénicos. Datos preliminares parecen indicar que alrededor del 1,1% de pacientes tratados con IFN natural alfa desarrollan anticuerpos al final del tratamiento, mientras que este porcentaje se eleva al 6,3% en pacientes que reciben IFN alfa 2b recombinante. Además en algunos grupos de trabajo, los pacientes que no respondieron a IFN recombinante se trataron con IFN natural, observándose aumento de las respuestas (Kishihara Y, y cols, 1996).

Así, se ha visto que algunos pacientes han dejado de responder a la terapia con IFN alfa recombinante al desarrollar anticuerpos anti-IFN *in vivo*, a pesar de que hay pacientes que son seropositivos y presentan respuesta terapéutica. Este

fenómeno quizás se podría explicar por el título de anticuerpos desarrollado, suponiendo que los pacientes seropositivos necesiten títulos de anticuerpos suficientemente elevados para poder neutralizar el IFN.

Otro problema referente al desarrollo de anticuerpos anti-IFN "in vivo" se relaciona con el hecho de que la presencia de anticuerpos podría favorecer la formación de inmunocomplejos, los cuales a su vez, podrían desencadenar fenómenos de hipersensibilidad.

En conclusión, el significado biológico y clínico de la aparición de autoanticuerpos anti-IFN no se ha precisado aún completamente. Es previsible que las investigaciones puedan aportar en breve plazo determinadas ideas sobre algunos aspectos vinculados con la eficacia terapéutica del IFN.

1.9.4.6.- Tratamientos propuestos: papel del Interferón

El primer estudio utilizando IFN alfa en la hepatitis crónica por VHC data de 1986, (Hoofnagle y cols.) cuando aún no se disponía de marcadores del VHC pusieron de manifiesto que los resultados del tratamiento pueden clasificarse según los niveles de GPT (único parámetro de respuesta disponible por entonces en: a) respuesta completa y sostenida cuando los niveles de GPT permanecen normales hasta 6 meses al menos después de la supresión del ciclo de tratamiento; b) respuesta transitoria o recidiva, cuando los niveles de GPT están normales al finalizar el tratamiento pero se elevan en los 6 meses posteriores; y c) no respuesta, cuando los niveles del GPT permanecen anormales al final del tratamiento. Este estudio piloto fue el pionero de un gran número de ensayos clínicos basados en el empleo de IFN, con dosis y tiempo variables.

Estudios posteriores de Shindo y cols (1992) confirmaron que la respuesta completa y sostenida se asocia a una negativización prolongada de la viremia, y la recidiva a una reaparición de títulos detectables de RNA viral tras la supresión del ciclo terapéutico.

La mayoría de los ensayos utiliza el IFN-alfa, linfoblástico o recombinante, con resultados similares. Un metaanálisis de algunos estudios concluye en los

siguientes resultados (Malaguarnera M y cols, 1995).

** La eficacia del tratamiento es dependiente de la dosis.*

La respuesta completa, determinada por la normalización de transaminasas, es baja (menor del 20%) a dosis de 1 ó 2 MU, 3 veces por semana. Para dosis superiores (de 3 a 6 MU), la tasa de respuesta oscila entre un 38 y 68%, según las series. Esto parece lógico pues se obtiene un mejor resultado antiviral a mayores dosis.

El descenso de transaminasas aparece antes del 2º mes de tratamiento. La elevación de dosis a los pacientes no respondedores no aumenta significativamente el índice de respuestas, sobre todo a largo plazo.

** La respuesta completa precisa al menos 6 meses de tratamiento. Aunque se consiguen mejores resultados con períodos de 9, 12 e incluso 18 meses, el porcentaje de "ganancia de respuestas" no parece significativamente mayor al conseguido con 6 meses. Probablemente este aumento de eficacia incluye los pacientes que recidivan al suspender el tratamiento a los 6 meses, y que no lo hacen al haberse prolongado durante más tiempo.*

** La recidiva es más frecuente a dosis bajas y con tratamientos cortos. La recidiva global se produce aproximadamente en el 50% de los respondedores, siendo esta tasa mayor para respuestas completas conseguidas con dosis bajas, de 1 MU, 3 veces por semana durante 6 meses (91%) que en diseños de dosis más altas (69%, para 3 MU, e veces en semana durante 6 m). La prolongación del tiempo de tratamiento consigue un menor número de recidivas para tratamientos de 12 meses (42%) frente a 6 meses (69%).*

** El retratamiento es eficaz en las recaídas. La mayoría de los pacientes que tras una respuesta completa y suspensión del tratamiento presentan una reelevación de los niveles de transaminasas vuelven a presentar respuesta completa al reiniciar el tratamiento, aún a dosis bajas.*

Otros estudios han investigado el papel del interferón en hepatitis C asociada a diversas entidades morbosas. Así por ejemplo, Ratziu y cols, (1994) estudiaron el efecto del IFN alfa en la hepatitis crónica C asociada a crioglobulinemia. En su trabajo incluyen a 15 pacientes con hepatitis crónica C demostrada

histológicamente con crioglobulinemia sintomática (artralgias, vasculitis cutánea, síndrome Sicca, nefropatía y neuropatía); concluyen que en se observó una mejoría de la enfermedad hepática aunque el IFN alfa no parece que se deba indicar como terapia opcional de los síntomas de la crioglobulinemia asociada al VHC.

En otros casos es la patogenia a nivel del hígado el objetivo de la investigación durante el tratamiento con IFN. Hayashi y cols, (1994) estudian el efecto en la apoptosis hepática y comprobaron que tras el tratamiento con IFN disminuye la actividad apoptótica.

1.9.4.7.- Factores predictivos de respuesta

Un aspecto que debe ser considerado en el momento de la toma de decisión del protocolo terapéutico a aplicar a un paciente afecto de hepatitis C y susceptible de tratamiento es su adecuación a los factores predictivos de probabilidad de respuesta a tal tratamiento. Por ello es importante conocer los elementos que hasta el momento se han definido con tal fin.

A continuación se define el perfil de respuesta más favorable en orden a la mayor tasa de respuesta al tratamiento con interferón (Camps J. 1991).

- La presencia de cirrosis establecida y descubierta en la biopsia hepática, aun en fases iniciales, es un factor de pronóstico desfavorable respecto a respuesta al Interferón. La determinación de los niveles de ác. hialurónico puede reflejar indirectamente el grado de fibrosis hepática, por lo que sería interesante efectuar determinaciones seriadas de ác. hialurónico (Guéchet y cols, 1995).

- Edad: parece que los pacientes más jóvenes responden mejor, aunque probablemente se deba a que la enfermedad presenta menor tiempo de evolución, lo que está en relación con lesiones menos avanzadas.

- Sexo: está en estudio la aparente mejor respuesta de las mujeres, de los pacientes con niveles bajos de transaminasas, o los que presentan antecedentes de contacto por drogadicción respecto a los postransfusionales.

- Genotipo viral: se ha comprobado que las distintas variantes genotípicas

del VHC parecen presentar respuestas distintas al IFN (Takada N, 1992; Yoshioka K 1992). Así el genotipo 1b se asocia a mala respuesta mientras que los genotipos III y IV parecen responder mejor a la terapia. Los pacientes con infección mixta (presencia simultánea de varios subtipos) responden peor al tratamiento (Grottola A y cols, 1994).

- Concentración de RNA-VHC en biopsia hepática post tratamiento: se ha propuesto que la negatividad del RNA-VHC a los 3 meses de tratamiento puede ser utilizada como valor predictivo de respuesta. Un nivel alto de viremia previo al tratamiento con IFN es un factor predictivo desfavorable (Portal I, y cols, 1994; Marcellin P, y cols, 1994).

- Niveles de nitratos y nitritos en plasma antes y después del tratamiento aumentan en pacientes respondedores (Hassanein y cols, 1994).

- Niveles de CD4, cuando con anterioridad a la instauración del tratamiento son adecuados se ven favorecidos por éste en casos de infección conjunta con VIH (García Samaniego y cols, 1994).

- Adecuada activación del sistema inmune mediante la valoración de los niveles en el infiltrado inflamatorio de células T citotóxicas CD8+ específicas del VHC; se ha observado que los pacientes que responden al tratamiento con IFN alfa tienen niveles de CD8 soluble (sCD8) significativamente superiores a los no respondedores. La liberación de sCD8 es un marcador de activación de las células T CD8+ (Nishavian y cols, 1994).

- Presencia de inmunocomplejos: Kanto y cols, en 1994 determinaron la presencia de inmunocomplejos del virus C por ultracentrifugación del suero en gradiente de sacarosa, detectando la presencia de RNA-VHC en las fracciones superior e inferior del gradiente, de tal forma que la primera correspondería al RNA-VHC libre presente en viriones y la segunda a viriones en inmunocomplejos. Se pudo comprobar que basalmente todos los pacientes tienen un cociente precipitado/sobrenadante de 1:1 independientemente de la respuesta; sin embargo, al terminar el tratamiento los pacientes con respuesta sostenida tienen un cociente precipitado/sobrenadante de 10-100:1 y los no respondedores o con

respuesta transitoria tienen un cociente de 1:1. Así se ha concluido que la prevalencia de inmunocomplejos de VHC es la consecuencia de la neutralización inmunológica del virus C y puede ser de utilidad para predecir la recaída.

- *Lesión del ducto biliar:* se ha encontrado que los pacientes no respondedores mantienen las lesiones del ducto biliar (vacuolización, eosinofilia e infiltrado de células linfoides en la pared ductal) en un 100% y sólo permanecen en un 19% en los pacientes que tienen respuesta completa ($p < 0.001$) (Costa y cols, 1994).

- *Índice de Knodell:* el análisis de variables como el índice de Knodell en la biopsia hepática demuestra que su descenso medio es mayor en aquellos pacientes que responden al tratamiento (Camps y cols. 1995).

- *Hierro y ferritina séricas:* valores elevados de ambos marcadores se corresponden con una peor respuesta al tratamiento con IFN (Olynyk J, y cols, 1993).

1.9.4.8.- Ensayos clínicos con otros interferones

El **IFN beta** ha sido poco ensayado hasta el momento y los resultados disponibles son contradictorios. Tan sólo administrado por vía intravenosa parece equipararse a los resultados obtenidos con el IFN alfa, normalizándose las transaminasas, comprobándose mejoría histológica y con fluctuaciones y elevación de la GPT sérica después de suspender el tratamiento (Habersetzer F, y cols, 1995). Se ha empleado IFN beta sólo o combinado con IFN gamma y se ha observado que el IFN beta en monoterapia y por vía subcutánea presenta una respuesta superior frente al IFN alfa y frente a la combinación de IFN beta y gamma. Es interesante considerar que no hay buenos resultados tras tratamiento de la hepatitis C con otras terapias conjuntas (IFN beta y ác. deoxicólico), aunque si parece demostrada la escasa eficacia del **IFN gamma** en este tipo de hepatitis. Lo cierto es que existen pocos estudios respecto al IFN gamma, cuyo efecto es predominantemente inmunoestimulante.

1.9.5.- OTROS ANTIVIRALES

Estamos asistiendo a un importante esfuerzo para desarrollar drogas capaces de controlar la hepatitis crónica asociada a virus C; no obstante, el problema de la terapéutica de la hepatitis crónica está lejos de su objetivo final. Durante años, antes de que se reconociera la naturaleza vírica de la enfermedad, los pacientes con hepatitis crónica NoANoB no recibían tratamiento específico, o bien, se les administraba, con poco éxito, fármacos con acción inmunosupresora, fundamentalmente corticosteroides y azatioprina. Aunque algunos estudios de largo seguimiento de hepatitis crónicas postransfusionales mostraron algún beneficio con el uso de **esteroides** otras investigaciones apoyan que la prednisona incluso puede ser perjudicial en esta enfermedad.

Con el fin de comprobar si los esteroides, administrados antes de iniciar el tratamiento con IFN alfa, aumentan el porcentaje de respuesta con respecto al grupo de pacientes tratados con IFN alfa solamente, se realizó un estudio controlado, tratando a pacientes con HC por virus C con IFN o con terapia conjunta prednisolona seguido de IFN. La respuesta al tratamiento fue similar en ambos, aunque se observó que las recaídas fueron menores en el grupo tratado con Prednisolona más IFN (11%) que en el tratado exclusivamente con IFN (46%) (Carreño V. 1995).

Antivirales como el **aciclovir** (nucleótido acíclico de guanosina) no muestra ninguna eficacia en la reducción de los niveles de transaminasas séricas. El fármaco sufre una serie de transformaciones dentro de la célula, cuyo resultado es un metabolito que compite con la polimerasa de DNA vírico bloqueando la síntesis de DNA y por consiguiente la replicación viral; no es de extrañar que el aciclovir no sea efectivo, ya que el VHC es un virus RNA.

Actualmente se están ensayando sustancias antivíricas, como la **ribavirina** (1-beta-ribo/uranosil 1,2,4-triazol-3-carboxanuda) que es análoga a los nucleótidos, no induce la formación de IFN y tiene una amplia actividad frente a virus RNA y DNA.

Se han realizado ensayos con ribavirina oral en pacientes infectados con VIH, VHB y el virus de la fiebre de Lassa. Los efectos secundarios de la ribavirina

son leves y totalmente reversibles cuando cesa el tratamiento; las alteraciones bioquímicas detectadas son fundamentalmente descenso de la hemoglobina y elevación leve del ácido úrico.

La ribavirina también se está utilizando en ensayos clínicos como alternativa en pacientes que no han respondido al tratamiento con Interferón alfa, observándose que un 50% de los pacientes con hepatitis crónica C refractaria al IFN han normalizado las transaminasas con el fármaco, pero en cambio, no han detectado cambios en la viremia durante la terapia, por lo que es necesario evaluar la eficacia de este tratamiento, solo o en combinación con otros antivíricos a largo plazo (Di Bisceglie AM, y cols, 1992).

Se piensa que la ribavirina podría actuar inhibiendo la replicación viral pero no erradicaría el virus ya que detectan la cadena genómica en todos los pacientes y en algunos de ellos desaparece la cadena antigenómica en hígado. La ribavirina puede ser útil en un grupo concreto de pacientes ya que normaliza la GPT y mejora el índice de actividad histológico por lo que podría ayudar a mantener la enfermedad en remisión (Koskinas y cols, 1995). Pero la ribavirina no actúa como agente antiviral ya que no negativiza el RNA-VHC. Su mecanismo de acción no está claro, podría ser actuando como agente antiinflamatorio.

Otros fármacos ensayados en la HC por VHC son el **Acido ursodeoxicolico** y **n-acetilcisteína**, sin resultados positivos.

Entre los **inmunomoduladores** ensayados cabe destacar las experiencias favorables con Levamisole a largo plazo, que están por confirmar, y algunos resultados con Interleuquina-2, de carácter transitorio, o los obtenidos, sin éxito, con el Factor de Necrosis Tumoral. En un estudio de tratamiento de HCC con **Interleuquina-2** (IL-2), se obtuvo un 28% de normalización de GPT, siendo la dosis de 1.8 MU la más eficaz en relación con la tolerancia; los efectos secundarios consistieron en reacción local con prurito, edema, eritema y rash (Carreño V, y cols, 1994).

Para el caso de la infección conjunta del VHC y el VIH existe un efecto sinérgico en la asociación de IFN alfa y el **AZT** (azatiopirina). El AZT está

diseñado para "engañar" al retrovirus. El compuesto está formado por deoxitimidina (análogo de la timina), se comporta como nucleótido fraudulento cuando el virus lo incorpora en su maquinaria genética como normal pero que en el momento de la transcripción al incorporarse a la cadena de DNA, ésta queda bloqueada con lo que el virus pierde su capacidad de replicación.

Para contrarrestar la disminución de leucocitos en pacientes con HCC se combina la administración de **G-CSF** (factor estimulador de colonias tipo G) e IFN alfa, determinando la neutropenia basal y comprobando que no se produce leucopenia durante la administración simultánea (Kitis G, y cols, 1994).

También se ha estudiado la combinación de IFN alfa y **Timosina alfa-1**, demostrando que esta asociación es más eficaz en la reducción de la concentración del RNA viral, sobre todo en las fases precoces de tratamiento (Sherman KE, y cols, 1994).

El **Ofloxacino** es un derivado de quinolina que ha demostrado poseer una actividad antiviral en la infección por VIH. Tras el tratamiento combinado de IFN alfa y ofloxacino disminuye la GPT, se pueden mejorar los resultados obtenidos con IFN sólo ya que la tolerancia a la combinación es buena y no existen complicaciones importantes (Takada y cols. 1994).

El **Ursochol** en administración conjunta con IFN puede prolongar el tiempo de normalización bioquímica pero poco se sabe acerca del seguimiento post-tratamiento por lo que habría que continuar el estudio (Boucher y cols. 1994).

Una alternativa para el tratamiento de las enfermedades crónicas causadas por los virus de la hepatitis puede ser el uso de **técnicas de biología molecular**. Entre estas nuevas estrategias cabe destacar el empleo de ribozimas y de sondas antisense.

Las ribozimas son fragmentos de RNA con capacidad catalítica y que tienen por tanto la propiedad de degradar un ácido nucleico diana con el cual se unen de manera específica; las sondas antisense son fragmentos de DNA o RNA complementarios a un ácido nucleico diana al cual se unen específicamente, bloqueando la expresión del mismo. Ambas poseen elevada especificidad ya que

se unen exclusivamente a los ácidos nucleicos contra los cuales están diseñadas y no a los ácidos nucleicos celulares (Murray JAH, 1992; Bischofberger N, y cols, 1992).

Habría que realizar estudios más profundos y determinar cual es el tipo de sonda más efectivo y la región del RNA del VHC más susceptible de ser atacada mediante terapia antisense. Posteriormente habría que desarrollar un buen sistema de transporte de la sonda, específico para el hígado, y probar la sonda en un sistema animal, determinando por último los comportamientos farmacocinéticos y toxicológicos.

1.9.6.- RECOMENDACIONES ACTUALES EN EL TRATAMIENTO CON IFN

La experiencia acumulada parece aconsejar el tratamiento de todos los pacientes sintomáticos y con enfermedad activa. Los pacientes con cirrosis establecida parecen beneficiarse muy poco de la terapia y, en principio, no parece estar indicada. La predicción del éxito terapéutico es hoy todavía imposible.

Dada la evolución imprevisible de la enfermedad, incluso en los casos de hepatitis crónica de baja actividad, y la posibilidad de respuesta favorable y permanente, parece aconsejable también el tratamiento de los pacientes con HC persistente aun asintomáticos. Algunos autores sugieren que, dado el reducido número de pacientes que presentan respuesta completa permanente al finalizar el tratamiento (25% aproximadamente), el elevado coste del IFN, y la no despreciable frecuencia de aparición de efectos indeseables con su utilización, la indicación del IFN debería ser reconsiderada en pacientes asintomáticos o con enfermedad leve, y el control de los mismos debería decidir su inclusión en programas de tratamiento.

Un enfoque alternativo y complementario es seleccionar para tratamiento únicamente a aquellos pacientes con un perfil de respuesta más favorable. Así se tendrán en cuenta las variables que predicen una escasa respuesta como son la edad avanzada, tiempo prolongado de infección, presencia de cirrosis, GGT basal elevada, niveles muy elevados de GPT, concentración intrahepática de hierro elevada, etc. (Conjeevaram HS, y cols, 1995).

En el tratamiento se ha ensayado una amplia variedad de esquemas terapéuticos, el esquema más utilizado ha sido la pauta de 3 ó 5 MU tres veces por semana durante 3 meses. Una respuesta favorable aconseja mantener tratamiento con 3 MU al menos hasta 6 meses. Sobre este esquema se ha testado el aumento de las dosis consiguiéndose beneficios marginales a costa de un incremento de los efectos adversos; en cambio, prolongando a 12-18 meses el tratamiento se consiguen porcentajes más consistentes de respuesta mantenida con mejoría de la inflamación hepática. La no respuesta no se beneficia de dosis más altas y probablemente sería indicación de intentar otros tratamientos como la ribavirina.

Una recidiva tras respuesta completa aconsejaría reiniciar el tratamiento con IFN- alfa a la dosis más baja con la que se consiga respuesta de nuevo.

1.9.7.- TRASPLANTE HEPÁTICO

El trasplante hepático es una opción terapéutica para los pacientes infectados por el VHC y con una hepatopatía avanzada. Como en el caso de otras hepatitis víricas la indicación más evidente sería en la insuficiencia hepática aguda grave; sin embargo, el VHC rara vez origina un fallo hepático grave o agudo.

El problema del trasplante hepático es la posibilidad de infección del injerto, incluso se puede incrementar el número de infectados después del trasplante debido a las transfusiones en el periodo peritrasplante y porque el injerto puede ser anti-VHC positivo. Las posibilidades de desarrollar en el injerto una hepatitis son altas: 30% una hepatitis aguda, el 44% una hepatitis crónica y el 1% una cirrosis (Belli LS, y cols, 1993).

En resumen, la infección por VHC es la etiología prevalente de la hepatitis crónica en los pacientes receptores de trasplante hepático; la mayoría de las veces es asintomática sin alteraciones de la bioquímica hepática. Sin embargo, algunos evolucionan muy rápidamente a una enfermedad hepática terminal, requiriendo un nuevo trasplante. El mecanismo predominante de transmisión del virus C parece ser la reinfección del hígado trasplantado por la cepa presente

antes del trasplante. Otros mecanismos de transmisión incluyen la transfusión de sangre o de productos sanguíneos así como que el nuevo hígado estuviera ya infectado; esta última fuente de infección será menos prevalente con el tiempo debido a la política actual de determinación del antiVHC en sangre y en donantes de órganos

1.10.- OBJETIVOS

El estudio de los antecedentes recogidos en la Introducción junto al análisis bibliográfico nos ha llevado a diseñar este trabajo clínico-experimental, el cual se ha realizado sobre una serie de pacientes afectos de hepatitis C crónica sometidos a tratamiento con inteferón alfa 2b recombinante. Se ha planteado en este estudio la posibilidad de monitorizar a los pacientes y a predecir la respuesta al tratamiento con un nuevo instrumento: la determinación del virus VHC antes de instaurado el tratamiento y durante el curso del tratamiento. En este trabajo se definen los siguientes objetivos:

1.- *La puesta a punto y estandarización de la técnica de determinación del virus de la hepatitis C en muestras de sangre mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

2.- *El seguimiento y la evaluación de la respuesta al tratamiento de los enfermos afectos de hepatitis C tratados con interferón alfa 2b recombinante, mediante controles clínicos y analíticos y determinación concomitante del virus VHC mediante PCR.*

3.- *El estudio de la presencia del genoma viral en células hemáticas antes, durante y tras el tratamiento con interferón alfa 2b recombinante, así como el análisis del genotipo viral.*

TESIS DOCTORAL

2.- PACIENTES. MATERIAL Y MÉTODOS

2.- PACIENTES. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- PACIENTES

2.1.1.- DESCRIPCIÓN DE LA SERIE CLÍNICA

En el presente estudio se han incluido un total de 143 pacientes diagnosticados de hepatitis crónica por virus C en el Hospital Clínico de Granada y Ciudad sanitaria Virgen del las Nieves de Granada, en el Servicio de Digestivo perteneciente al Departamento de Medicina Interna. El criterio clínico considerado para ser incluidos en el protocolo es el haber resultado positivo en el test antiVHC. Del total de pacientes, 91 han sido tratados con Interferón alfa 2b recombinante a dosis 3 MU, administrada por vía intramuscular 3 días en semana durante 6 meses; otros 6 pacientes se sometieron al mismo esquema terapéutico pero solo durante 4 meses y a un paciente se le aplicó el tratamiento durante 12 meses. Ocho enfermos de la serie fueron tratados con INF beta, recibiendo una dosis vía intramuscular de 6 MU administrada 3 días en semana durante 6 meses.

Otro grupo de 25 pacientes antiVHC(+) no se trataron. Finalmente 12 pacientes estudiados por sospecha de hepatitis crónica C y que no fueron positivos ante el test antiVHC se incluyeron también en el presente estudio analítico, e igualmente no se sometieron a tratamiento con interferón.

2.1.2.- CRITERIOS DE SELECCIÓN

La selección de los enfermos para entrar en el protocolo terapéutico se hizo teniendo en cuenta los siguientes criterios:

2.1.2.1- Población base

Pacientes diagnosticados en los Centros incluídos en el estudio: Hospital Universitario de Granada y Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves de Granada,

con indicación de tratamiento con interferón.

2.1.2.2.- Criterios de inclusión

- 1.-** *Pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 16 y 60 años.*
- 2.-** *Hepatopatía crónica NoANoB/C persistente o activa, incluyendo la hepatitis crónica activa en fase cirrótica grado A de Child-Pugh.*
- 3.-** *Biopsia hepática realizada dentro del año anterior al inicio del protocolo.*
- 4.-** *Niveles de GPT aumentados en más de una ocasión en el año anterior a la biopsia hepática, y después de esta, con valores superiores a dos veces las cifras normales.*
- 5.-** *Posibilidad real de seguir el tratamiento y seguimiento.*
- 6.-** *Consentimiento por escrito de entrada en el protocolo, tras información detallada por parte de los investigadores. El modelo original de este escrito está reflejado en el Anexo III.*

2.1.2.3.- Criterios de exclusión

- 1.-** *Presencia de signos de hepatopatía alcohólica en la biopsia hepática.*
- 2.-** *Anti-VIH positivo.*
- 3.-** *Ig M positivo a citomegalovirus, VEB, herpes virus o VHA.*
- 4.-** *Drogadicción parenteral activa durante el último año.*
- 5.-** *Actividad de protrombina < 50%. Hematocrito < 30%.*
- 6.-** *Plaquetas < 100.000/mm³.*
- 7.-** *Creatinina sérica > 1.7 mg%.*
- 8.-** *Leucocitos < 3000/mm³.*
- 9.-** *Cirrosis hepática grados B o C de Child-Pugh. Hemocromatosis. Déficit de α 1- antitripsina. Enfermedad de Wilson. Cirrosis Biliar Primaria.*
- 10.-** *Mujeres embarazadas, en lactancia o en riesgo de embarazo.*
- 11.-** *Pacientes en tratamiento ineludible con hormonas inmunosupresoras, corticoides, o drogas potencialmente hepatotóxicas.*

12.- *Pacientes que hubieran recibido alguno de los tratamientos anteriores en los seis meses previos al inicio del estudio.*

13.- *Terapia anterior con Interferón.*

2.2.- MÉTODOS CLÍNICOS

Los pacientes incluidos en el estudio pertenecen al protocolo descrito. El desarrollo del protocolo incluye instrucciones referidas al paciente, consentimiento por parte del paciente, médico de cabecera e inspección sanitaria de zona (ver anexos II, III, IV, y V), en un cuaderno individualizado, que se incluye dentro de las historias clínicas de cada paciente, las cuales se han confeccionado de acuerdo con un modelo de encuesta normalizado (ver anexo VI). Dicho protocolo siempre estuvo de acuerdo con los criterios habituales fijados en la declaración de Helsinki y recomendaciones del Comité de Ensayos Clínicos del Hospital. En él se disponen:

- Calendario de seguimiento clínico y analítico (ver anexo VII)*
- Control de efectos colaterales.*
- Información sobre medicación complementaria*
- Evaluación de la respuesta al tratamiento.*
- Indicación del tratamiento alternativo según respuesta.*
- Instrucciones sobre abandono del protocolo.*
- Previsión y control de incidencias*
- Fin del tratamiento y biopsia hepática de control*

El control clínico se realizó mensualmente mediante visitas ambulatorias programadas en Consultas Externas del Servicio Andaluz de Salud del Hospital Clínico Universitario por el mismo equipo médico.

2.2.1.- BIOPSIA HEPÁTICA

Tras consentimiento informado, se realizó biopsia hepática percutánea bajo control ecográfico, con aguja de Menghini según método estandar, con sedación a

base de Midazolona (vía I.V.) 2mg y Atropina (vía I.M.) 1 mg. Posteriormente al paciente se le mantuvo en observación rutinaria en el hospital, siendo dados de alta a las 12 horas al no haber complicaciones.

2.2.2.1.- Estudio histopatológico

El cilindro hepático fue conservado en formol tamponado y remitido al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario. El estudio anatomopatológico se efectuó sobre las biopsias hepáticas previamente al tratamiento, mediante lectura, por el mismo observador y utilizando criterios previamente establecidos (I. de Knodell, 1981).

2.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1.- CONTROL DE LABORATORIO

Se realiza según calendario mediante:

- Determinaciones analíticas de rutina (hemograma, tests de coagulación sanguínea, bioquímica renal y hepática, proteinograma, lipidograma, etc.).
- Determinaciones especiales: Ig séricas, subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y tejido hepático, Péptido terminal del procolágeno III (P-III-P), anticuerpos virales.

Todas estas determinaciones se realizan en el Laboratorio General y en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario.

- Determinación del RNA del virus C por técnicas de PCR. La recepción y procesamiento de las muestras de sangre a analizar se realiza en el Laboratorio de Investigaciones médicas y Biología Tumoral Mora Lara, laboratorio éste especializado en técnicas de biología molecular.

Todas las extracciones sanguíneas se realizan en el Servicio de hematología del Hospital Clínico Universitario de Granada.

- Obtención y congelación de alícuotas de suero para futuras determinaciones

2.3.2.- ESTUDIOS DE LA SEROLOGÍA VIRAL

Se determinan los marcadores serológicos que se describen a continuación:

* HBsAg, antiHBs, antiHBc, antiHBc IgM, HBeAg y antiHBe correspondientes al virus de la hepatitis B.

* AntiVHI, correspondiente al virus de la inmunodeficiencia humana; y por último

* AntiVHC, determinado por la metodología RIBA III que detecta la presencia de las proteínas C100, NS5, C22 y C33.

Todas estas determinaciones se realizan en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico.

2.3.3.- ESTUDIO DE AUTOANTICUERPOS

Se estudia la presencia de autoanticuerpos tipo anti-nucleares, anti-músculo liso, anti-mitocondriales y anti-LKM. Igualmente estas determinaciones se realizan en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico.

2.3.4.- ESTUDIO DEL GENOTIPO VIRAL DE VHC

Se pretende detectar la presencia de los genotipos más frecuentes en Europa, es decir los subtipos 1a, 1b, 2, 2a, 2b, y 3a; y los genotipos 4, 5, y 6, según la clasificación de Simmonds P, (1993). El método se basa en la combinación de una nested-RT-PCR con una posterior hibridación con sondas específicas de cada genotipo, correspondiendo la secuencia que se amplifica a la región del core del VHC altamente conservada en estos genotipos.

La técnica empleada consiste en una detección mediante enzimoimmunoanálisis con la sonda DEIA-hibridación que realiza la hibridación del producto amplificado con una sonda interna 5' biotinilada de DNA que recubre las paredes de una microplaca mediante una unión biotina-estreptavidina. El híbrido formado por la sonda y el producto amplificado se detecta mediante el uso de

anticuerpos monoclonales anti-DNA de doble cadena (ANTI-DSDNA).

Las muestras son desnaturalizadas, se dispensan en los pocillos y se produce la hibridación de la sonda con su cadena complementaria en caso de estar presente, formando un híbrido específico. La adición posterior de anticuerpos IgG anti-DNA de doble cadena identifica los pocillos donde la hibridación ha tenido lugar. A continuación se añade un antíduerpo anti-IgG marcado con peroxidasa de rábano picante que detecta la unión DNA-IgG, y se revelará positivo con la adición de un sustrato adecuado, por la presencia de color.

2.3.4.1.- Determinación de la concentración óptima de sonda 5' biotinilada

Los pasos seguidos han sido:

A).- Preparar un rango de diluciones de la sonda biotinilada (1 ng/μl a 20 pg/μl) en tampón TE pH= 8± 0,1.

B).- A continuación sensibilizar la microplaca de estreptavidina con 100 μl de cada dilución de sonda al menos en dos pocillos (4 °C/18h).

C).- Realiza la técnica de DEIA-hibridación utilizando controles positivos y negativos específicos.

D).- La concentración óptima se corresponde con el máximo valor de la D.O. de controles positivos / D.O. de controles negativos, ($r = pc/nc$) siempre que el valor del control negativo no sea superior a 0.080.

En este estudio la concentración óptima de sonda para VHC fue de 25 pg/μl con una razón superior a 18, y la temperatura de hibridación de las sondas ha sido de 55°C.

2.3.4.2.- Protocolo

1.- Inmovilización de la sonda:

- Se dispensan 100 μl de solución de sonda biotinilada a una concentración óptima de 25 ng por pocillo.*
- Seguidamente se cubre la microplaca y se incuba durante 18-22 horas a*

2-8⁰C.

- Al final de la incubación se lava la placa 5 veces con 300 µl de solución de lavado.

2.- Desnaturalización de muestras:

- Se incuba durante 15 minutos a 95-100⁰C y posteriormente se lleva a un baño de hielo durante 10 minutos.

- El ensayo se realiza inmediatamente después de desnaturalizar la muestra.

3.- Hibridación:

Se han analizado dos controles negativos y uno positivo junto con las muestras y controles de la reacción de amplificación, cada vez que se realiza el ensayo.

- Se añaden 100 µl de solución de lavado a cada pocillo.
- Se dispensan 20 µl de controles y de muestras desnaturalizadas a sus pocillos correspondientes.
- Se cubre la microplaca con papel adhesivo y se incuba a la temperatura óptima de hibridación durante 1h.
- Al final de la primera incubación se lava la microplaca en idénticas condiciones a las anteriores.

4.- Detección del híbrido:

- Se dispensan 100 µl de solución de anti-DS-DNA en los pocillos.
- Se cubre la microplaca y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente (20-30⁰C).
- Al final de la incubación, se lava la microplaca como en los pasos anteriores.

- Se dispensan 100 µl de conjugado en los pocillos.
- Se cubre la microplaca y se incuba 1 hora a temperatura ambiente.
- Al final de la incubación se lava la microplaca.
- Se dispensan 100 µl de solución sustrato/cromógeno.
- Se Incuba 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

- Se dispensan 200 µl de solución de parada.
- por último, se realiza la lectura de la microplaca en un espectrofotómetro a 450/630 nm.

El punto de corte se establece por la suma de 0.150 a la media de la absorbancia de los controles negativos (CN).

$$\text{Punto de corte} = \text{CN} + 0.150$$

2.3.5.- METODOLOGÍA DE PCR

La técnica consiste en la amplificación “in vitro” mediante un método enzimático de segmentos específicos de DNA. El resultado es la obtención de numerosas copias de la diana de DNA, incluso a partir de una sola unidad de molde. El método se basa en la repetición cíclica de tres reacciones similares, modificando la temperatura y el tiempo en los que se llevan a cabo.

En este caso el genoma a amplificar es RNA de cadena simple por lo que se requiere el tratamiento previo con una transcriptasa reversa (Polimerasa RNA dependiente) para posteriormente amplificar el cDNA obtenido.

Este trabajo se ha centrado en la determinación del RNA viral en suero y en células mononucleares de sangre periférica totales y subpoblaciones linfocitarias CD14+, CD19+, CD8+ y CD4+ de pacientes diagnosticados de hepatitis C crónica. Dicha determinación se efectuó de forma basal previa al tratamiento con Interferón alfa 2b recombinante y al cabo de los 6 meses de tratamiento. El protocolo a seguir coincidió en todos los casos.

2.3.5.1.- Aislamiento y extracción del RNA viral en muestras de suero

Se usó como referencia el método de Chomczynsky y cols. (1987) modificado, ajustado a los volúmenes y tamaños de muestras a analizar.

La conservación de las muestras de RNA, tanto del suero como del RNA ya aislado, se realizó a -70°C y para el DNA fue suficiente una temperatura de -20°C.

De forma general, las medidas para trabajar con RNA requieren el uso exclusivo del material y reactivos para PCR; uso de guantes en todo momento y

cambio frecuente (mejor los que no llevan talco pues éste inhibe la PCR); material de contacto directo con la muestra (puntas de pipeta y tubos "eppendorf") tratados con DEPC (Dietilpirocarbonato) y esterilizados al autoclave y por último el uso de inhibidores de RNAsas como DEPC (Dietilpirocarbonato) y Rnasin.

Se trabajó siempre sobre hielo picado o gradillas apropiadas para mantener una temperatura constante (0-4°C).

El protocolo seguido para las muestras de suero fue el siguiente:

- 1.- Volumen de muestra: 150 µl de suero.*
- 2.- Añadir 500 µl de solución desnaturalizante.(A).*
- 3.- Mezclar varias veces.*
- 4.- Añadir 75 µl de Acetato Sódico 2M, pH 4.(B).*
- 5.- Añadir 700 µl de solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico.(C).*
- 6.- Agitar y mezclar invirtiendo el tubo varias veces.*
- 7.- Incubar durante 15 minutos en hielo.*
- 8.- Centrifugar en microfuga 15 minutos a 4°C a 13.000 rpm.*
- 9.- Recuperar cuidadosamente la fase acuosa superior, máximo 500 µl. No arrastrar nada de la fase intermedia.*
- 10.- Pasar la fase acuosa a otro tubo con 1 ml de Etanol Absoluto enfriado. Mezclar invirtiendo el tubo.*
- 11.- Incubar a -20°C durante toda la noche.*
- 12.- Centrifugar en microfuga 15 minutos a 4°C a 13.000 rpm.*
- 13.- Eliminar el sobrenadante cuidadosamente para no arrastrar el pellet.*
- 14.- Resuspender el pellet en 300 µl de Alcohol al 75%.(D). Centrifugar en microfuga 5 minutos a 4°C a 13.000 rpm.*
- 15.- Descartar el sobrenadante y el pellet resultante redisolverlo en 20 µl de H₂O libre de RNasas.*

Conservar el RNA a -70°C.

El tiocianato de guanidina en un potente agente caotrópico, rompe las

membranas celulares, disocia los complejos RNA-proteínas, desnaturaliza las nucleasas citoplasmáticas y degrada las nucleoproteínas además de ser un compuesto con importante actividad RNAasa. Las nucleoproteínas degradadas son retiradas mediante extracción con solventes orgánicos como el fenol y cloroformo; el RNA así purificado permanece en la fase acuosa y en presencia de etanol absoluto se agrega y precipita.

* Solución A: es la solución desnaturalizante constituida por tiocianato de guanidina 4 M; citrato sódico 25 mM pH 7,0; 2-mercaptoetanol 0.1 M y 0,5% N-lauril sarcosina.

* Solución B: acetato sódico 2 M pH 4,0.

* Solución C: fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: esta solución se compone de fenol saturado de agua y ácido cítrico (50%) (altamente tóxico y corrosivo); cloroformo (48%) (muy tóxico y posible agente cancerígeno) y de alcohol isoamílico (02%) (agente irritante). Cloroformo: alcohol isoamílico 49:1.

* Solución D: Alcohol al 75%. Esta solución estará preparada con H₂O tratada con DEPC al 0,1%.

Las soluciones A, B y C usadas en este protocolo pertenecen al kit de Promega "RNAgents", sistema para el aislamiento total del RNA.

Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1%. Este tratamiento inhibe potencialmente las ribonucleasas, sin poder ser utilizado en soluciones que contengan grupos amino (como Tris).

Junto con todas las muestras se procesaron un control positivo (VHC-RNA positivo) y un control negativo (VHC-RNA negativo) que sirvieron de referencia para la positividad o negatividad de las muestras.

El Kit de Promega RNAgents Total RNA Isolation System contiene:

- 50 g. de tiocianato de guanidina 2 x 25 g.
- 75 ml de tampón CBS (citrato/ sarcosina/ β -mercaptoetanol).

- 10 ml de acetato sódico, 2 M, pH 4.0
- 100 ml de solución de fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico.
- 100 ml de isopropanol.
- 25 ml de agua libre de RNAsas.

Para su uso se siguieron las indicaciones descritas en el propio kit: la solución de fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico se mantuvo, previamente a su uso, a temperatura ambiente unos 15 minutos para asegurar una total separación de fases.

Para reconstituir la solución desnaturalizante se disolvieron 25g de tiocianato de guanidina en 33 ml de tampón CBS. Para conseguir una total disolución se sumergió la mezcla en baño maría a 65°C. El tampón CBS está constituido por tampón Citrato: 0.5 M, pH 7.0; β -mercaptoetanol: 0.7% (V/V) y por sarcosil: 0.5% (W/V).

Las características de este kit sobre otros protocolos de extracción radican en la rapidez del proceso, ya que la purificación del ácido nucleico se consigue en tres horas o menos. El efecto inhibitorio de la actividad RNAsa y la posibilidad de aislamiento desde diversos tejidos, fluidos, células aisladas, etc.

2.3.5.2.- Aislamiento y extracción del RNA-VHC en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y en subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4

Se trabajó sobre muestras de sangre procedente de pacientes diagnosticados de hepatitis C crónica activa. Las muestras de sangre completa (adicionada de EDTA o citrato) tenían un volumen no inferior a 20ml.

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

- 1.- Cada tubo de muestra de 10 ml de sangre total se separó en dos tubos iguales y ambos se diluyeron en una proporción 1/2 con tampón PBS /BSA.
- 2.- Se vertió esta mezcla a partes iguales sobre las paredes de ocho tubos que contenían respectivamente 2.5 ml (corresponde a 1/3 del volumen total por tubo) de Ficoll-Hipaque, reactivo que separa el anillo linfocitario del resto hemático tras

centrifugar durante 20 minutos a 1.250 rpm (300 g) a temperatura ambiente.

3.- Se recuperaron las coronas linfocitarias en dos tubos, en uno de ellos se recogieron las células correspondientes a dos tubos (1/4 de muestra) y en el otro las células correspondientes a 3/4 de muestra (6 tubos). Se continuó con dos lavados sucesivos con tampón PBS/BSA, y posterior centrifugación durante 10 minutos a 1250 rpm a temperatura ambiente.

4.- Se hizo el recuento celular en cámara de Neubauer debiendo oscilar entre 10^5 - 10^7 células/tubo. En la mayoría de los casos se ajustaron las concentraciones para trabajar sobre $2 \cdot 10^6$ células correspondientes a cada subpoblación.

5.- Para el caso de la determinación del RNA en CMSP totales se recogió el pellet correspondiente a 1/4 de muestra inicial y se lavó con PBS/BSA, a continuación sobre dicho pellet se añadió directamente el tampón de lisis (tiocianato de guanidina) prosiguiendo la extracción del RNA viral como se indicó para suero, con la salvedad de que en este caso el RNA obtenido se disuelve en 10 µl de agua libre de RNasas.

Para aislar y separar del resto las subpoblaciones linfocitarias $CD14^+$, $CD19^+$, $CD8^+$ y $CD4^+$ se usó el procedimiento que ofrece Dynal, el cual aplica un sistema de bolitas con núcleo metálico que contienen en su superficie el anticuerpo monoclonal correspondiente al antígeno de superficie que distingue y diferencia a cada subpoblación.

Para la separación de la subpoblación linfocitaria $CD14^+$ se continuó como sigue:

1.- Añadir 5 ml de tampón PBS/BSA sobre el pellet celular correspondiente a los 3/4 de muestra inicial.

2.- Agitar para procurar una suspensión monocelular y añadir 60 µl de Dynabead $CD14^+$.

3.- Someter a agitación y rotación durante 30 minutos a 4°C.

4.- Adosar el tubo de muestra al separador magnético durante 2 minutos para conseguir así concentrar en la pared del tubo las bolitas metálicas que contienen

ligadas en su superficie las células CD14⁺.

5.- *Recoger el sobrenadante sobre otro tubo para continuar con la separación del resto de las células.*

6.- *Retirar el tubo del separador magnético.*

7.- *Lavar las bolitas dos veces con 5 ml de tampón PBS/BSA recuperándolas siempre mediante el separador magnético.*

8.- *Después del último lavado y tras eliminar el sobrenadante, añadir directamente sobre el pellet el tampón de lisis (tiocianato de guanidina) y continuar como se comentó anteriormente para suero, con la excepción de que en este caso el RNA obtenido se disuelve en 10µl de agua libre de RNasas.*

9.- *Para asegurar una total liberación del RNA se congeló la mezcla de pellet celular y tampón de lisis a -70°C y se descongeló a temperatura ambiente.*

Del mismo modo se separan las células CD19⁺: a partir del sobrenadante obtenido en el punto nº 5 del protocolo anterior se añadieron 60µl de Dynabeal CD19 y tras agitación y rotación durante 30 minutos a 4°C se concentran las células ligadas a las bolitas metálicas mediante el separador magnético.

El proceso se repite de igual forma para obtener las células CD8⁺ y CD4⁺ usando los anticuerpos Dynabeal CD8 y Dynabeal CD4 respectivamente.

Se siguió este orden de actuación y no otro debido a la presencia en los monocitos (células CD14) de antígenos de membrana CD4, así se asegura una total separación de monocitos sin arrastrar células T colaboradoras/inductoras (CD4) que podrían enmascarar los resultados.

2.3.5.3- Obtención del cDNA. Transcripción

Se trabajó en tubos eppendorf de 400 µl tratados con DEPC, al igual que las puntas de pipeta, y esterilizados en autoclave.

El volumen total de reacción es 20µl por muestra. La mezcla de reacción por muestra sería:

RNA		9.0 μ l.
P2		1.16 μ l. (50 pmoles)
Buffer 5X		4.0 μ l.
RNAsin		0.5 μ l. (20 U)
AMV-RT		1.0 μ l. (9.5 U)
dNTPs		0.4 μ l. (100 mM)
H ₂ O libre de RNAsas		4.47 μ l.

Agitar cada tubo y dar un golpe de centrifuga. Añadir dos gotas de aceite mineral (unos 60 μ l).

Para realizar la transcripción se utilizaron:

A.- Kit de Promega AMV Reverse Transcriptase que contiene:

- AMV Reverse Transcriptase: Concentración: 9.500 U/ml. 300 U.(5-10U/ μ l).
- AMV Reverse transcriptase Buffer 5X; 500 μ l. Composición: 250 mM Tris-CLH, pH 8,3; 250 mM KCl; 50 mM MgCl₂; 2.5 mM spermidine, 50 mM

Se define una Unidad de enzima como la cantidad de enzima requerida para catalizar la incorporación de 1nmol de dTTP en un compuesto ácido insoluble en 10 minutos a 37°C en 50 mM Tris-CLH, pH8.3; 40 mM KCl; 7 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 0.1 mg/ml BSA; 0.5 mM ³H-dTTP, y 130 μ g/ml rA₄₀₀: dT₅₀, 10:1.

B.- Kit de Promega 4 dNTPs. Contiene:

- dATP: 100 mM en agua desionizada y estéril, pH 7.5.

- dCTP: 100 mM en agua desionizada y estéril, pH 7.0.
- dGTP: 100 mM en agua desionizada y estéril, pH 7.5.
- dTTP: 100 mM en agua desionizada y estéril, pH 7.0.

Control de calidad:

- * La concentración se verifica por espectrofotometría de densidad óptica.
- * Los preparados están libres de contaminación de DNasa y RNasa determinándose esto por incubación de los dATP, dCTP, dGTP y dTTP con sustratos radiactivos.
- * La pureza de los preparados se determina por HPLC. El contenido en trifosfato está en el 99.8%.
- * Todos los lotes han sido testados con DNA Polymerase I de Promega.

C.- RNasin Ribonuclease Inhibidor. Es una proteína aislada de la placenta humana, con actividad ribonucleasa. Se define una Unidad de enzima como la cantidad de inhibidor de ribonucleasa requerida para inhibir la actividad de 5ng de ribonucleasa al 50%.

D.- En la transcripción el **primer** usado se ha denominado P2. Se constituye como primer externo. Genera fragmentos de 271 pares de bases. Su secuencia es:

5'-CGA GAC CTC CCG GGG CAC TCG CAA GCA CCC- 3'.

Se reconstituye adicionando 200 µl de tampón Tris.

E.- Se programó el termociclador tal como sigue:

- 1 hora a 42 °C.
- 5 minutos a 95 °C, consiguiendo así destruir la actividad transcriptasa de la AMV-RT y la desnaturalización del cDNA obtenido.
- Refrigerar.

Este cDNA puede conservarse a -20 °C o bien proseguir con el protocolo de PCR.

2.3.5.4.- Amplificación del cDNA

Se trabajó a partir de los 20 µl anteriores incorporándoles la mezcla de reacción hasta un volumen que en este caso es de 50 µl por muestra. La mezcla de reacción por muestra sería:

cDNA		20.0 µl.
P1		1.16 µl. (50 pmoles)
Buffer Taq Pol 10X		5.0 µl.
CL ₂ Mg		2.4 µl. (25 mM)
Taq DNA Pol.		0.4 µl. (2 U)
H ₂ O dd..		21.57 µl

Agitar y dar un "golpe" de centrífuga.

No se añaden dNTPs pues hay un exceso de la reacción anterior. No se añade aceite mineral pues conserva el anterior.

Para realizar la amplificación se utilizaron:

A.- *Kit de Promega Taq DNA Polymerase. Se define una Unidad de enzima como la cantidad de enzima requerida para catalizar la incorporación de 10 nmol en un compuesto ácido insoluble durante 30 minutos a 74°C. Las condiciones de la reacción son: 50 mM Tris-HCl, pH 9.0 (a 25°C); 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 200 µM dATP, dGTP, dCTP y ³H-dTTP y 12.5µg de DNA de timo de ternera activado en 50 µl de reacción. Incluye el Kit además:*

- *Buffer de reacción 10X: 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 (a*

25°C) y 1.0% de Tritón X-100. Este buffer está optimizado para el uso de 0.2 mM de cada dNTP. No contiene $MgCl_2$. Volumen suministrado: 750 μ l.

- Solución de $MgCl_2$ 25 mM. 750 μ l.

Control de calidad: actividad, SDS-PAGE/pureza, endonucleasa/kinasa, test de actuación específica.

B.- El **primer** usado se ha denominado P1. Se constituye como primer externo. Genera fragmentos de 271 pares de bases. Su secuencia es:

5'-ACT GTC TTC ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT- 3'.

Se reconstituye adicionando 200 μ l de tampón Tris.

C.- El programa del termociclador es el siguiente:

- Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C
- Hibridación o anillamiento: 1 minuto a 45 °C.
- Elongación: 2 minutos a 72 °C.
Repetido 35 ciclos.
- Elongación definitiva: 7 minutos a 72 °C.
- Refrigerar.

Este DNA amplificado puede conservarse a -20 °C o bien continuar con el protocolo de "nested" PCR.

2.3.5.5.- "Nested" PCR

Se trabaja en tubos eppendorf de 400 μ l esterilizados al autoclave.

El volumen total de reacción es de 50 μ l. La mezcla de reacción por muestra quedaría:

DNA		5.0 μ l.
P3.		1.16 μ l. (50 pmoles)
P4		1.16 μ l. (50 pmoles)

Buffer Taq Pol 10X		5.0 µl
Cl ₂ Mg.		2.4 µl. (25 mM)
Taq DNA Pol		0.2 µl. (1 U)
dNTPs		0.2 µl. (100 mM)
H ₂ O dd..		35.94 µl

Agitar y dar un golpe de centrifuga. Añadir dos gotas de aceite mineral.

Para realizar el nested PCR se utilizan:

A.- El mismo kit de la Taq DNA Polymerasa.

B.- Dos **primers** denominados P3 y P4 correspondientes, igualmente, a la zona 5' no codificante.

Sus secuencias son:

P3: 5'- ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT GGC GTT AGT -3'.

P4: 5'- TCC CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC AGG -3'.

Se constituyen como primers internos y generan fragmentos de 255 pares de bases. Se reconstituyen adicionando 200 µl de tampón Tris.

C.- El termociclador se programa como sigue:

- Desnaturalización previa: 5 minutos a 94 °C.

Repetir durante 24 ciclos:

- Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C.

- Hibridación o anillamiento: 1 minuto a 45 °C.

- Elongación: 2 minutos a 72 °C.

- Elongación definitiva: 7 minutos a 72 °C.

- Refrigerar.

2.3.5.6.- Análisis de los productos amplificados

El resultado de la reacción nested PCR se analizó sometiendo una alícuota de 10 µl de dicha reacción, más 1.5 µl de tampón de carga, a electroforesis submarina en gel de agarosa al 2%. Se determina el tamaño de los fragmentos amplificados por comparación con marcadores de DNA de tamaño conocido (PhiX 174 DNA/Hinfl ó PhiX 174 DNA/HaeIII); visualizándose por tinción con bromuro de etidio en lámpara ultravioleta; el bromuro de etidio se intercala entre las bases púricas y pirimidínicas del DNA, la luz UV excita sus moléculas de forma que estas emiten a longitudes de onda del espectro visible.

Analizamos el gel mediante el programa específico de geles Visilog 4 rev. y los datos obtenidos nos confirman el tamaño de los fragmentos amplificados, tras realizar el nested PCR, que se corresponden con una longitud de 255 pares de bases.

Como ejemplo de dicho análisis se detalla a continuación el perteneciente al gel de la figura 2.1, denominado gel: 19595:

Figura 2.1.

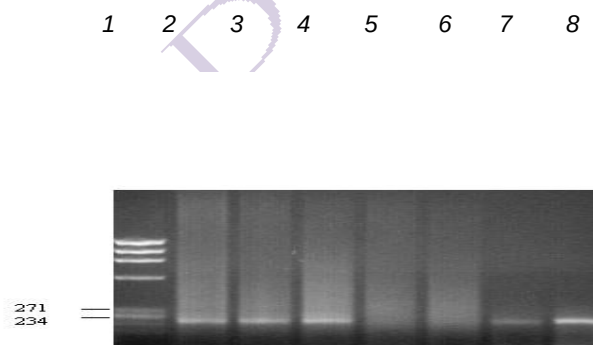


Fig. 2.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos amplificados de DNA.
Calle 1: marcador Phi X 174 DNA/Hind III. Calle 2: CMSP totales. Calle 3: Cél.
CD14+.Calle 4: Cél. CD19+. Calle 5: Cél. CD8+.Calle 6: Cél. CD4+. Calle 7: Suero.
Calle 8: control positivo.

Gel : 19595

Size of Gel x : 512 y : 512 Track Number : 8

Pre-processing Parameters:

No Filter

Rotation of 90 degrees

Signal inversion

Detection area of tracks x0:191 y0:100 x1:373 y1:381

Connected Part Parameters

Band/Background Contrat 3 Track/InterTrack Contrast 2

Main Axis of Inertia 0.90 Angular Tolerance 0.50

Half Filter Width 2 Half Background Width 25

Frac 0.25 High Contrast 10

Well line x0:191 y0:100 x1:191 y1:381

No Distorsion

Isophoresis detection parameters

Half Width Exploration 4 Intensity Tolerance 30

Max gap for reference pixel 4 Max gap pixel-band 2.50

propp 6

Band detection parameters

Algorithm used : Clean

High Contrast 10 Low Contrast 10

Minimum Distance 4 Minimum Intensity 10

Nb speckle points 5 Min speckle distance 6

w_backsig1 20 ptronc 0.50

Quantification Parameters

Without Repartition

Iteration Number 20

Classification Parameters

Reference Band pixel 264,359 distance 1.00

Migration Distance from well line

Distance Used : Minimal Distance

Maximal Intensity 80.0 Maximal Distance 4.0

Smoothness 10.0

Temoins pour la Classification

No External References

7 Internal References

Track number 1 Band number 1 Size 1.00
Track number 1 Band number 2 Size 2.00
Track number 1 Band number 3 Size 3.00
Track number 1 Band number 4 Size 4.00
Track number 1 Band number 5 Size 5.00
Track number 1 Band number 6 Size 6.00
Track number 1 Band number 7 Size 7.00

0 Size Distribution

Track 1 : Marcador 8 band Track Intensity 1490

<i>n</i>	<i>Y</i>	<i>realX</i>	<i>corX</i>	<i>Migration</i>	<i>Intens</i>	<i>Quant</i>	<i>Size</i>	<i>Label</i>
1	359	264	264	1.00	54	331.54	1352.00	A
2	359	273	273	1.12	47	237.69	975.00	B
3	359	283	283	1.26	42	208.69	603.00	C
4	359	301	301	1.51	30	143.00	310.00	D
5	359	335	335	1.97	20	0.00	281.00	E
6	359	341	341	2.05	25	0.00	271.00	F
7	359	351	351	2.19	3	0.00	234.00	G
8	359	359	359	2.30	0	0.00	203.08	G1

Track 2 : CMSP t 1 band Track Intensity 484

<i>n</i>	<i>Y</i>	<i>realX</i>	<i>corX</i>	<i>Migration</i>	<i>Intens</i>	<i>Quant</i>	<i>Size</i>	<i>Label</i>
1	326	345	345	2.11	14	111.94	258.25*	G

Track 3 : CD14+ 1 band Track Intensity 494

<i>n</i>	<i>Y</i>	<i>realX</i>	<i>corX</i>	<i>Migration</i>	<i>Intens</i>	<i>Quant</i>	<i>Size</i>	<i>Label</i>
1	292	346	346	2.12	17	96.42	254.50	G

Track 4 : CD19+ 1 band Track Intensity 627

<i>n</i>	<i>Y</i>	<i>realX</i>	<i>corX</i>	<i>Migration</i>	<i>Intens</i>	<i>Quant</i>	<i>Size</i>	<i>Label</i>
1	259	346	346	2.12	16	86.87	254.50	G

Track 5 : CD8+ 0 band Track Intensity 0

<i>n</i>	<i>Y</i>	<i>realX</i>	<i>corX</i>	<i>Migration</i>	<i>Intens</i>	<i>Quant</i>	<i>Size</i>	<i>Label</i>
1	259	346	346	2.12	16	86.87	254.50	G

Track 6 : CD4+ 0 band Track Intensity 0

<i>n</i>	<i>Y</i>	<i>realX</i>	<i>corX</i>	<i>Migration</i>	<i>Intens</i>	<i>Quant</i>	<i>Size</i>	<i>Label</i>
1	259	346	346	2.12	16	86.87	254.50	G

Track 7 : Suero 1 band Track Intensity 439

<i>n</i>	<i>Y</i>	<i>realX</i>	<i>corX</i>	<i>Migration</i>	<i>Intens</i>	<i>Quant</i>	<i>Size</i>	<i>Label</i>
1	159	347	347	2.14	16	15.26	250.59	G

Track 8 : Control(+) 1 band Track Intensity 478

<i>n</i>	<i>Y</i>	<i>realX</i>	<i>corX</i>	<i>Migration</i>	<i>Intens</i>	<i>Quant</i>	<i>Size</i>	<i>Label</i>
1	125	346	346	2.12	42	40.23	254.50	G

**Nota: en letra negrita figuran los valores de los tamaños de las bandas de los productos amplificados analizados que son coincidentes con el tamaño esperado.*

2.3.6.- FASE FINAL DEL ESTUDIO

La fase final del estudio incluye la recogida de datos, el tratamiento estadístico, la descripción de resultados y las conclusiones y el informe final.

2.3.6.1.- Creación del archivo de datos y estadística descriptiva

Una vez completado el proceso de recopilación de datos a partir de las historias clínicas de los pacientes y obtenidos los resultados del laboratorio, se configuró un fichero con el programa EXCEL, versión 5.0, en el que se introdujeron las variables y su estratificación, tal y como aparece en la relación siguiente:

- * Edad: valor numérico real.*
- * Sexo: 0=Varón; 1=Mujer.*
- * Enfermedades anteriores: 0= sin interés; 1= Nefropatía; 2= Hemopatía; 3= Diabetes mellitus; 4= Cardiopatía; 5=Hepatopatía.*
- * Intervenciones quirúrgicas previas: 0= Si; 1= No.*
- * Transfusiones anteriores: 0= Si; 1= No.*
- * Adicción a drogas por vía parenteral: incluyendo las ocasiones esporádicas. 0= Si; 1= No.*
- * Tatuajes: 0= Si; 1= No.*
- * Homosexualidad: 0= Si; 1= No.*
- * Antecedentes de ictericia o hepatitis: 0= Si; 1= No.*
- * Contacto próximo con enfermos con hepatopatías: 0= Si; 1= No.*
- * Familiares cercanos con hepatopatías: 0= Si; 1= No.*
- * Consumo de alcohol: 1= <20 g/día; 2= 20-100 g/día; 3= >100 g/día.*
- * Tiempo de hipertransaminemia: 1= <3 meses; 2= 3-12 meses; 3= >12 meses.*
- * Biopsia hepática: informe histológico: 1= normal o lesiones mínimas; 2= Hepatitis crónica persistente; 3= Hepatitis crónica activa leve; 4= Hepatitis crónica activa moderada; 5= Hepatitis crónica activa intensa.*
- * HBs Ag: 0= (-); 1= (+).*
- * AntiHBs: 0= (-); 1= (+).*
- * AntiHBc: 0= (-); 1= (+).*
- * AntiHBc IgM: 0= (-); 1= (+).*
- * HBe Ag: 0= (-); 1= (+).*
- * AntiHBe: 0= (-); 1= (+).*
- * AntiVIH: 0= (-); 1= (+).*

- * AntiVHC: 0= (-); 1= (+).
- * Genotipo: 0= 1b; 1= 3a.
- * Autoanticuerpos: anti- nucleares: 0= (-); 1= (+); anti-músculo liso: 0= (-); 1= (+); anti-mitocondriales: 0= (-); 1= (+); anti-LKM: 0= (-); 1= (+).
- * Hematíes, hemoglobina, actividad de protrombina, leucocitos, plaquetas, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, GOT, GPT y GGT basales (previos al tratamiento): valores numéricos reales.
- * Hematíes, hemoglobina, actividad de protrombina, leucocitos, plaquetas, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, GOT, GPT y GGT tras 1 mes de tratamiento: valores numéricos reales.
- * Hematíes, hemoglobina, actividad de protrombina, leucocitos, plaquetas, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, GOT, GPT y GGT tras 3 mes de tratamiento: valores numéricos reales.
- * Hematíes, hemoglobina, actividad de protrombina, leucocitos, plaquetas, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, GOT, GPT y GGT tras 6 mes de tratamiento: valores numéricos reales.
- * Hematíes, hemoglobina, actividad de protrombina, leucocitos, plaquetas, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, GOT, GPT y GGT tras 3 mes de concluido el tratamiento: valores numéricos reales.
- * Hematíes, hemoglobina, actividad de protrombina, leucocitos, plaquetas, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, GOT, GPT y GGT tras 6 meses de concluido el tratamiento: valores numéricos reales.
- * CMSPt, CD14, CD19, CD8, CD4 y Suero basales: 0= (-); 1= (+).
- * Suero 1m y Suero 3m: 0= (-); 1= (+).
- * CMSPt, CD14, CD19, CD8, CD4 y Suero tras 6 meses de tratamiento: 0= (-); 1= (+).
- * CMSPt, CD14, CD19, CD8, CD4 y Suero tras 3 meses de concluido el tratamiento: 0= (-); 1= (+).
- * CMSPt, CD14, CD19, CD8, CD4 y Suero tras 9 meses o más de concluido el tratamiento: 0= (-); 1= (+).

A continuación se indican para cada uno de los parámetros bioquímicos y analíticos considerados los rangos de normalidad indicados por el laboratorio responsable de tales determinaciones:

* Hematíes:	V: $4.7 - 6.1 \times 10^6 \mu l$;	M: $4.2 - 5.4 \times 10^6 \mu l$.
* Hemoglobina:	V: 14 - 18 g/dl;	M: 12 - 16 g/dl.
* Acti. Protrombina:	80 - 100%.	
* Leucocitos:	$4.8 - 10.8 \times 10^3 \mu l$.	
* Plaquetas:	$130 - 400 \times 10^3 \mu l$.	
* Bilirrubina Directa:	0.00 - 0.30 mg/dl.	
* Bilirrubina Indirecta:	0.00 - 0.70 mg/dl.	
* Fosfatasa alcalina:	100 - 280 U.I./l.	

* GOT:	0 - 37 U.I./l.
* GPT:	0 - 40 U.I./l.
* GGT:	7 - 32 U.I./l.

2.3.6.2- Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el test de homogeneidad de dos muestras o test para la comparación de dos medidas siendo las muestras independientes, aplicado al caso de muestras pequeñas donde n_1 o n_2 son <30 . Es el denominado test de Cochran.

Las condiciones bajo las cuales el test de Cochran se aplica son:

- Muestras aleatorias e independientes.
- Alguno de los tamaños muestrales es menor que 30.
- Las variables son normales.
- Las varianzas son desconocidas y desiguales.

Para obtener los valores de p se ha usado la tabla de distribución de la t de Student, siendo p la probabilidad de ser superior a este valor t, en valor absoluto. Una $p < 0.05$ se ha considerado con la suficiente significación estadística.

2.4.- INSTRUMENTACIÓN

2.4.1.- CENTRÍFUGA REFRIGERADA

Para la obtención de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se utilizó una centrífuga convencional marca Beckman, modelo TJ/6, dotada con una unidad adicional de refrigeración que permite centrifugar muestras a baja temperatura. La centrífuga consta de un rotor con soportes intercambiables para la centrifugación simultánea de un número de muestras variable (4 a 120 muestras). La máxima velocidad de centrifugación depende del rotor utilizado.

2.4.2.- MICRO CENTRÍFUGA

Para el proceso de extracción del RNA viral de las muestras se usó una

centrífuga "microfuge" marca Beckman, con capacidad para 18 muestras, programable en tiempo hasta 15 minutos y de una velocidad máxima de centrifugación de 13.000 rpm. Cuando el protocolo experimental requirió trabajar a 4°C se introdujo la microcentrífuga en la cámara fría.

2.4.3.- CENTRÍFUGA CONVENCIONAL

Se usó una centrífuga Orto (Clino) para la obtención de los sueros a partir de las muestras de sangre, trabajando a 3.500 rpm durante 5/7 minutos.

2.4.4.- MICROSCOPIO ÓPTICO

Se usó, igualmente, un microscopio óptico convencional Olympus CHB con aumentos 10x, 40x, 100 x. Este microscopio fue empleado para efectuar los contejes celulares necesarios con la cámara de Neubauer.

2.4.5.- CABINA DE FLUJO LAMINAR

Se utilizó una cabina de flujo laminar suministrada por Flow Laboratories, para evitar la contaminación biológica de los anticuerpos usados para la separación de las subpoblaciones linfocitarias CD19, CD14, CD8 y CD4. La circulación de aire en dirección vertical, con velocidad máxima de 0.46 m/s se establece mediante un ventilador. La filtración del aire, antes de entrar en la cabina, y el rendimiento del proceso de filtración (99.997% de retención de todas las partículas mayores de 0.3 μ de diámetro) garantizaron el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo las experiencias.

2.4.6.- CONGELADORES

Para el almacenamiento de muestras de suero y de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se usó un arcón congelador, marca Selecta, modelo 455, capaz de alcanzar la temperatura de -80 °C. La temperatura de operación durante todo el tiempo que duró este trabajo, fue de -70 °C.

Para almacenar las enzimas y tampones se usó un congelador, marca Liebherr, que alcanza la temperatura de -20°C. Se utilizaron también congeladores y frigoríficos convencionales para el almacenamiento de tampones y disoluciones.

2.4.7.- pH METRO

Para la regulación del pH de las soluciones tampón empleadas, se usó un pHmetro suministrado por la firma Orion Research, modelo 501, cuya precisión se estima en 0.01 unidades de pH.

2.4.8.- BALANZA DE PRECISIÓN

Se utilizó una balanza de precisión Mettler Toledo AB 104 capaz de alcanzar la décima de miligramo.

2.4.9.- AGITADOR MECÁNICO

Para favorecer la reacción antígeno-anticuerpo entre las subpoblaciones linfocitarias y las esferas metálicas soporte de la reacción, se usó un agitador mecánico orbital AOS-O, marca SBS, ajustado a unas 80 vueltas por minuto.

2.4.10.- SEPARADOR MAGNÉTICO DYNAL MPC-1

Para concentrar las bolitas metálicas a las que van unidos los anticuerpos correspondientes y separar las células CD19, CD14, CD8 y CD4, se usó este separador suministrado por Dynal, con capacidad para un sólo tubo de muestra.

2.4.11.- TERMOCICLADOR

Todo el proceso de PCR tiene lugar gracias a la mecanización de la técnica. Parte fundamental del protocolo es un sistema de control de la temperatura, en este caso se empleó el termociclador QUATRO TC-40, con un bloc diseñado para admitir 40 tubos de muestra de 400 µl de capacidad. Posee programador de temperaturas y tiempos, entre 99 y 4°C y entre 0.01 y 59.59 minutos. Es capaz de mantener la temperatura de refrigeración (4°C) durante 24 horas.

2.4.12.- SISTEMA DE ELECTROFORESIS

Se utilizó un equipo para electroforesis convencional suministrado por TDI, con cubeta de electroforesis sumergida, marca Minicell, modelo EC370 M, con el que es posible resolver, en función de su tamaño, fragmentos de DNA. El sistema incluye además de la cubeta de electroforesis, la fuente de alimentación, capaz de

alcanzar los 150 voltios, 500 mA (modelo Ps-1-VC).

Para la preparación del gel se utilizó el mismo soporte de la cubeta suministrada. El "pocillo" en el gel se preparó utilizando un "peine" apropiado (peines de 8 o 12 pocillos). Como norma general se estableció los parámetros de voltaje y tiempo siguientes: 100 V durante 30 minutos.

2.4.13.- TRANSILUMINADOR

Para la visualización de geles teñidos con bromuro de etidio se usó un transiluminador ultravioleta 20 X 20 (312 nm de longitud de onda) suministrado por TDI, modelo TC-312 A. En todos los casos, para la visualización de los amplificadores se usó una pantalla de protección UV facial completa.

2.4.14.- SISTEMA DE REPRODUCCIÓN FOTOGRÁFICA Y VÍDEO

Los geles, bajo iluminación ultravioleta, fueron fotografiados utilizando una cámara Polaroid, modelo CU-5 88-48 y una cámara de vídeo SONY CCD IRIS, estando ésta última acoplada a un sistema de análisis de imagen.

2.4.15.- ANALISIS DE IMÁGEN

Para la evaluación de los geles obtenidos en el desarrollo de los métodos descritos, se utilizó un sistema de análisis de imagen compuesto por una videocámara, acoplada a un ordenador que almacena la información y la procesa utilizando el programa de análisis de imagen "Visilog Geles", comercializado por Microoptic. El programa permite analizar la distribución de bandas en los geles y estimar el tamaño de la molécula de DNA amplificado por comparación con marcadores de tamaño conocidos.

2.4.16.- OTROS

Se usaron otros aparatos existentes en el laboratorio como son: microondas, picador de hielo, vortex, etc.

2.5.- REACTIVOS QUÍMICOS

2.5.1.- TAMPÓN ESTÁNDAR DE FOSFATO (PBS)

Como norma todas las soluciones y tampones se prepararon con agua bidestilada y estéril. El tampón PBS fue obtenido disolviendo 3.56 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.52 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 8.5 g de NaCl en un litro de agua bidestilada. Todos estos reactivos químicos fueron suministrados por Promega. El pH de la disolución tampón se reguló a 7.2.

2.5.2.- TAMPÓN ESTÁNDAR DE FOSFATO CON ALBÚMINA BOVINA (PBS/BSA)

Se hizo el tampón PBS/BSA adicionando albúmina sérica bovina en una concentración final de 0.3% al PBS. El pH se ajustó a 7.2. La solución final se filtró con un filtro de 0.45 micras en cabina de flujo laminar para conseguir una total esterilidad y asegurar la estabilidad de la albúmina.

2.5.3.- TAMPÓN TRIS-BORICO-EDTA (TBE)

El tampón TBE utilizado en electroforesis submarina se preparó disolviendo 108 g de Tris-base (Serva), 55 g de ácido bórico (Serva) y 9.3 g de EDTA (Serva), en un litro de agua bidestilada. Se obtuvo, así, una disolución de concentración diez veces superior (10x) a la estándar. En los experimentos de electroforesis la solución madre fue diluida 10 veces (1x). El pH de la disolución se ajustó a 8.2.

2.5.4.- TAMPÓN TRIS

Para reconstituir los primers usados en PCR se usó Tris 10mM, pH 8.2.

2.5.5.- FICOLL-HIPAQUE

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se separaron de la sangre total por gradiente de densidad mediante centrifugación con Ficoll-Hipaque en proporción 1:3 (V/V), durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Este producto fue suministrado por BIO Whitaker.

2.5.6.- AGAROSA

En la preparación de geles para electroforesis se utilizó Agarosa (Promega) al 2%.

2.5.7.- ACEITE MINERAL

Para evitar evaporaciones en el proceso de amplificación en el termociclador, se añadieron a cada tubo de muestra un par de gotitas de aceite mineral (60 µl), de este modo la mezcla de reacción queda cubierta y no existen pérdidas por evaporación. Dicho aceite mineral lo suministró Sigma.

2.5.8.- TAMPÓN DE CARGA

Las muestras se cargaron en el gel junto con un tampón de carga compuesto por: azul de bromofenol 0.25% y sacarosa en 50mm de EDTA 40%. Este tampón se usó 6x añadiendo 1.5 µl por cada 10 µl de muestra. La sacarosa precipita la muestra hasta el fondo del pocillo impidiendo que se salga de la matriz del gel y el colorante nos permite observar el frente de la electroforesis.

2.5.9.- DIETIL PIROCARBONATO (DEPC)

Para asegurar una total ausencia de RNAsas en el proceso de aislamiento del RNA viral, se trató todo el material de plástico (tubos eppendorf, puntas de pipeta) con una solución acuosa de DEPC al 0.1% (V/V), agitando enérgicamente hasta total disolución y dejandola 24 horas a 4°C para posteriormente esterilizar en autoclave y así eliminar la toxicidad residual del dietil pirocarbonato (producto potencialmente cancerígeno). El DEPC fue suministrado por Sigma.

2.5.10.- BROMURO DE ETIDIO

Para la tinción del DNA sometido a electroforesis en gel se utilizó una disolución de bromuro de etidio (Serva) de concentración 0.5 µg/ml. Se incorporó

tanto al gel como al tampón de electroforesis.

2.5.11.- ACETATO SÓDICO

Se preparó acetato sódico 2M, pH 4. (Serva).

2.5.12.- OTROS REACTIVOS QUÍMICOS

Para la regulación del pH de las disoluciones tampón se utilizaron, cuando fue necesario, disoluciones de HCl, NaOH y de ácido acético glacial para preparar el pH del acetato sódico.

2.5.13.- SOLUCIÓN DE NaClO AL 10%

Todas las superficies del laboratorio sobre las cuales se trabajó así como todos los materiales que estuvieron en contacto con el VHC, fueron lavados con una solución de hipoclorito sódico al 10 % (que debe prepararse cada día); seguido de un aclarado con etanol al 70% o similar. Se extremaron las medidas higiénicas siendo obligado el uso de guantes en todo momento.

Todos los restos biocontaminantes (restos de sueros, células sanguíneas, etc.) se vertieron en contenedores destinados a tal fin para su posterior incineración.

2.6.- REACTIVOS BIOLÓGICOS PARA PCR

2.6.1.- EXTRACCIÓN DEL RNA

Para la extracción del RNA viral se empleó el Kit de Promega RNAagents Total RNA Isolation System. (Cat. nº Z5110). Este sistema contiene suficiente reactivos para el aislamiento del RNA de 100 muestras de suero o células mononucleares de sangre periférica.

Está diseñado para seguir el procedimiento descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). La duración del protocolo es de unas tres horas. Elimina toda actividad RNAsa. El RNAagents System consigue una alta integridad del RNA aislado.

En el protocolo de extracción del RNA figuran dos reactivos que no los incluye el Kit: alcohol absoluto y alcohol al 75%. Dichos reactivos son suministrados por PROMEGA. Todos los reactivos son estables a 4°C.

2.6.2.- TRANSCRIPCIÓN

Para la realización del proceso de transcripción se utilizaron los reactivos que se describen a continuación:

2.6.2.1.- Kit de Promega **AMV Reverse Transcriptase** (Catálogo nº 5102).

La AMV, Avian Myeloblastosis Virus, Transcriptasa Reversa es una DNA Polimerasa capaz de catalizar la polimerización del DNA usando como base DNA, RNA o híbridos RNA-DNA. Requiere Mg^{2+} o Mn^{2+} para su actividad. Esta enzima aviar es heterodímera y posee actividad intrínseca ribonucleasa H. Detergentes no iónicos y compuestos sulfidrilo hacen disminuir la actividad de la enzima "in vitro". Posee actividad RNAsa, endonucleasa/kinasa, dsDNAsa y ssDNAsa. A -20°C es estable hasta su expiración.

2.6.2.2.- Kit de Promega 4 dNTPs (Catálogo nº U1240.)

Contiene 40 μ moles de cada uno de los siguientes nucleótidos: dATP (2'-desoxiadenina 5'-trifosfato, sal sódica), dTTP (2'-desoxitimidina 5'-trifosfato, sal sódica), dCTP (2'-desoxicitoxina 5'-trifosfato, sal sódica) y dGTP (2'-desoxiguanidina 5'-trifosfato, sal sódica).

No se debe exponer a frecuentes cambios de temperatura pues estas fluctuaciones afectan a la estabilidad de los productos. Para conservarse largo tiempo debe mantenerse a -70°C y para uso continuado a -20°C.

2.6.2.3.- RNAsin Ribonuclease Inhibidor. Promega (Catálogo nº N211).

Contiene 2500 U a una concentración de 20-40 U/ μ l. Debe conservarse en el tampón: 20 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 50 mM KCL, 8 mM DTT y Glicerol al 50%. El enzima es estable a -20°C en este tampón durante años.

2.6.2.4.- El primer usado en la transcripción se ha denominado P2. Corresponde a la zona 5' no codificante del VHC-RNA considerada de máxima estabilidad genómica. La posición del nucleótido corresponde a la zona comprendida entre los nucleótidos -14 y -43. Tanto este primer P1 como los P2,

P3 y P4 son sintetizados por Ingelheim Diagnóstica SA.

2.6.3.- AMPLIFICACIÓN

Para la realización del proceso de amplificación se utilizaron los reactivos que se describen a continuación:

2.6.3.1.- Kit de Promega Taq DNA Polymerase. (Catálogo nº M1861).

Contiene la polimerasa Thermus Aquaticus DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase) que es una enzima termoestable capaz de replicar el DNA a 74°C previa desnaturalización de éste a 95°C. Esta enzima no modificada tiene un peso molecular aparente medido por SDS-PAGE de 85.000 daltons y se recomienda para otras aplicaciones distintas a la secuenciación. La concentración es de 5.000 U/ml y su contenido es de 100 U. Se suministra disuelta en un tampón "A" que contiene: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50% glicerol y 1.0% de Tritón X-100. Se conserva a -20°C hasta expiración.

2.6.3.2.- El primer usado se denomina P1. Igualmente corresponde a la zona 5' no codificante del genoma viral. La posición del nucleótido corresponde a la zona comprendida entre los nucleótidos -285 y -256.

2.6.4.- PRIMERS NESTED PCR

Se usaron dos primers denominados P3 y P4 correspondientes, igualmente, a la zona 5' no codificante. Las posiciones de los nucleótidos corresponden a las zonas comprendidas entre los nucleótidos -276 a -247 y los -21 a -50 respectivamente para P3 y P4.

2.6.5.- MARCADORES DE TAMAÑO

Se usaron indistintamente dos marcadores de tamaño:

2.6.5.1.- PhiX 174 DNA/Hinfl (Promega, cat. G1751): es un marcador PhiX 174 DNA digerido con la enzima de restricción Hinf I. Origina 20 fragmentos de DNA con el siguiente número de pares de bases:

726, 713, 553, 500, 427, 417, 413, 311, 249, 200, 151, 140, 118, 100, 82, 66, 48, 42, 40 y 24.

Se suministra a una concentración de 1.0 mg/ml. Viene disuelta en el

tampón: 10 mM Tris-ClH, pH 7.5, 1 mM EDTA. Conservar a -20°C.

2.6.5.2.- *PhiX 174 DNA/HaeIII*. Promega (Catálogo nº G 1761): la digestión de la enzima *HaeIII* sobre el fago *PhiX 174 DNA* origina 11 fragmentos de DNA con el siguiente número de pares de bases:

1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72.

Se suministra a una concentración de 1.0 mg/ml. Viene disuelta en el tampón: 10 mM Tris-ClH, pH 7.5, 1 mM EDTA. Conservar a -20°C.

2.6.6.- *DYNABEADS M-450 PAN-B (CD19)* Dynal.

Para el aislamiento de las células *CD19⁺* a partir de sangre total se usaron bolas de poliestireno de núcleo metálico, ligadas a un anticuerpo monoclonal primario (mAb) específico para células B, restringido a antígenos de membrana *CD19*. El anticuerpo monoclonal es IgM de ratón, y está directamente adsorbido en la superficie de la bolita metálica. Dynal lo suministra en suspensión conteniendo 4×10^8 bolitas /ml en tampón fosfato salino (PBS), pH 7.4, conteniendo 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.02% de Azida sódica (NaN_3). Conservación a 4°C.

2.6.7.- *DYNABEADS M-450 (CD14)* Dynal.

Para el aislamiento de células *CD14⁺* a partir de sangre total se usaron bolas de poliestireno de núcleo metálico, ligadas a un anticuerpo monoclonal primario (mAb) específico para el antígeno de membrana *CD14* que es expresado predominantemente por monocitos y macrófagos. El anticuerpo monoclonal es IgG2a de ratón y es incorporado a las bolitas vía un segundo anticuerpo con un efecto óptimo de orientación del anticuerpo primario. Dynal lo suministra en suspensión conteniendo 4×10^8 bolitas /ml (30mg/ml) en tampón fosfato salino (PBS), pH 7.4, conteniendo 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.02% de Azida sódica (NaN_3). Conservación a 4°C.

2.6.8.- *DYNABEADS M-450 (CD8)*. Dynal.

Para el aislamiento de células *CD8⁺* a partir de sangre total se usaron bolas de poliestireno de núcleo metálico, ligadas a un anticuerpo monoclonal

primario (mAb) específico para el antígeno de membrana CD8 que es expresado predominantemente por subpoblaciones de células humanas T citotóxicas/supresoras. El anticuerpo monoclonal es IgM de ratón es directamente adsorbido por la superficie de las bolitas. Dynal lo suministra en suspensión conteniendo 1.4×10^8 bolitas /ml en tampón fosfato salino (PBS), ph 7.4, conteniendo 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.02% de Azida sódica (NaN_3). Conservación a 4°C.

2.6.9.- DYNABEADS M-450 (CD4). Dynal.

Para el aislamiento de células CD4^+ a partir de sangre total se usaron bolas de poliestireno de núcleo metálico, ligadas a un anticuerpo monoclonal primario (mAb) específico para el antígeno de membrana CD4 que es expresado predominantemente por subpoblaciones de células humanas T colaboradoras/inductoras. El anticuerpo monoclonal es IgG1 de ratón y es incorporado a las bolitas vía un segundo anticuerpo con un efecto óptimo de orientación del anticuerpo primario. Dynal lo suministra en suspensión conteniendo 1.4×10^8 bolitas /ml (10mg/ml) en tampón fosfato salino (PBS), ph 7.4, conteniendo 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.02% de Azida sódica (NaN_3).

Conservación a 4°C.

2.7.- REACTIVOS PARA TIPADO GENÉTICO

Se ha realizado una evaluación VHC-Genotyping, VHC-Plus, DEIA-NEW.

Las secuencias de las sondas utilizadas en la reacción de la hibridación para el genotipado del VHC han sido:

1a: 5' GCA ACC TCG AGG TAG ACG TC

1b: 5' GCA ACC TCG TGG AAG GCG AC

2: 5' GAG GTG GAT GCG CCG ATC TTT CAG GGG ATG GTG

2a: 5' GAG GTT CCC GTC CCT CTT GG

2b: 5' CCT CTG TAC TGG AAA CGA GGG CT

3a: 5' GCG CGT CGG AGC GAA GGC CG

4a: 5' AGC CAG TCT TGG GGA TCC AGA ATG ATC

5a: 5' AGA ACG GTC GCA ACC CCG TGG AGC

6a: 5' CCA GCC CAG AGG CAG GCG CCA A

2.8.- MATERIAL FUNGIBLE

Como norma general se limitó el uso de material de vidrio para eliminar el posible riesgo de contaminación con VHC al reciclar dicho material.

2.8.1.- MATERIAL DEL PLÁSTICO PARA EL AISLAMIENTO DEL RNA VIRAL

2.8.1.1.- Tubos eppendorf

Se usaron tubos eppendorf de 1500µl de capacidad para realizar todo el proceso de extracción del RNA. Dichos tubos fueron tratados con solución de DEPC al 0.1% durante 24 horas y posteriormente se autoclavaron para asegurar, además de la esterilidad, la total ausencia de contaminación por amplificadores.

2.8.1.2.- Puntas de pipetas con filtro (Tips)

Las puntas de pipetas son de plástico y estériles y están protegidas con filtros de algodón para evitar el arrastre de contaminación con amplificados de unas muestras a otras ya que dicho algodón ejerce de barrera contra los aerosoles que propagan los amplificados. Estas puntas han sido suministradas por Costar y Bio-Rad. Todas las puntas fueron tratadas con solución de DEPC al 0.1% durante 24 horas y posteriormente se autoclavaron para asegurar tanto la esterilidad como la total ausencia de contaminación por amplificados.

2.8.2.- MATERIAL DE PLÁSTICO PARA LA SEPARACIÓN DE LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES CELULARES A PARTIR DE SANGRE TOTAL

2.8.2.1.- Pipetas

Se usaron pipetas graduadas convencionales de volumen variable (1 a 25 ml) suministradas por Nunc, pipetas pasteur tanto de vidrio como de plástico y estériles.

2.8.2.2.- Tubos de ensayo

Se usaron tubos de ensayo convencionales de plástico, de 10 ml de capacidad, y estériles.

2.8.3.- MATERIAL DE PLÁSTICO PARA LA PCR

2.8.3.1.- Tubos eppendorf

Se usaron tubos de polipropileno de 400µl de capacidad, siliconizados para asegurar la total presencia de la muestra en el fondo del tubo, fueron suministrados por Eurolab y Bio-Rad.

2.8.3.2.- Puntas de pipetas con filtro (Tips)

Se usaron micropipetas de capacidad variable (entre 1/20 µl, 20/ 200 µl y 100/1000 µl). Las puntas de estas pipetas son de plástico y estériles y están protegidas con filtros de algodón para evitar arrastrar contaminación de

amplificados de unas muestras a otras. Estas puntas han sido suministradas por Costar y Bio-Rad.

2.8.4.- OTRO MATERIAL FUNGIBLE

2.8.4.1.- Películas Fotográficas

Para la fotografía de geles tras iluminación ultravioleta se utilizó una película fotográfica Polaroid modelo 667 (8.5 x 10.8 cm). Para hacer la foto a través de la vídeo impresora se ha usado papel Sony UPC-1010.

2.9.- OTRO MATERIAL

Se utilizó también diverso material tanto de vidrio como de plástico para la realización de las técnicas. Entre este material cabe citar: gradillas, vasos de precipitado, probetas, erlenmeyer, quitasatos, filtros, unidades de filtración y otros dispositivos.

TESIS DOCTORAL

3.- RESULTADOS

3.- RESULTADOS

3.1.- DETERMINACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

3.1.1.- ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PREPARATIVA PARA PCR Y METODOLOGÍA DE PCR

La determinación del virus de la hepatitis C por PCR ha supuesto la adopción de una serie de procesos generales, aplicables a cualquier técnica de PCR, cuya metodología ha quedado especificada en la sección correspondiente de Material y Métodos. A continuación se exponen las principales modificaciones de la técnica general de RT-PCR realizadas en este trabajo para su aplicación a la determinación del virus de la hepatitis C de forma estandarizada.

En la fase inicial del presente trabajo se optimizó el proceso de **extracción** del RNA usando como referencia el método modificado de Chomczynsky y cols. (1987), ajustando, primero, los volúmenes y tamaños de muestras a analizar, y adoptando a continuación las medidas adecuadas indicadas para trabajar con RNA. El protocolo seguido partió de un volumen inicial de muestra que pudo reducirse a tan solo 150 µl en el caso de suero. El RNA obtenido se conservó inalterable a -70°C, lo cual permitió realizar este proceso inicial en día diferente al resto de las operaciones.

Para la **transcripción** se siguieron las normas generales descritas para la manipulación del RNA. Se utilizaron 9,5 U de AMV Transcriptasa Inversa y 20 U de RNasin inhibidor. El "primer" empleado, P2, se usó a una concentración 50 pmoles y consta de 30 bases, cuya secuencia se muestra a continuación, y genera fragmentos de 271 pares de bases.

5'-CGA GAC CTC CCG GGG CAC TCG CAA GCA CCC- 3' (-14 a -43)*

* Posición del nucleótido según Okamoto y cols, 1990.

Para la **amplificación** del cDNA se trabajó con la totalidad del volumen obtenido en el paso anterior. Se utilizaron 2 U de Taq DNA polimerasa, el tampón y el

$MgCl_2$ se añaden en el momento de constituir la mezcla de reacción, aunque no es necesario añadir los 4 dNTPs pues hay un exceso de la reacción anterior. El “primer”, P1, se usó a una concentración 50 pmoles y consta de 30 bases cuya secuencia es:

5'-ACT GTC TTC ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT- 3' (-285 a -256)*

* Posición del nucleótido según Okamoto y cols, 1990.

El protocolo de la reacción se encuentra recogido en el apartado correspondiente de Material y Métodos al igual que los parámetros de temperaturas y tiempos usados en la amplificación, parámetros que permitieron conseguir un DNA de 271 pares de bases tras 35 ciclos en el termociclador.

Para aumentar la sensibilidad y especificidad del test de PCR se realizó la técnica del “**nested**” PCR, esta técnica se basa en la utilización de “primers” internos complementarios a las secuencias de los amplificados previos; igualmente es una técnica que supone una estrategia anti contaminación ya que hibridan solamente las secuencias específicas y no otras.

En este caso se usó 1 U de Taq DNA polimerasa partiendose de una alícuota de 5 μ l del amplificado previo, permitiendo conservar el resto de la muestra para los análisis posteriores que fuesen necesarios. Los “primers” P3 y P4, que se usaron a una concentración 50 pmoles, tienen las siguientes secuencias:

P3: 5'- ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT GGC GTT AGT -3' (-276 a -247)*

P4: 5'- TCC CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC AGG -3' (-21 a 50)*

* Posición del nucleótido según Okamoto y cols, 1990.

El programa del termociclador incluye una desnaturalización previa de 5 minutos a 94°C para asegurar una total desnaturalización del DNA amplificado previamente. Los parámetros de temperatura y tiempo se recogen en el apartado correspondiente de Material y Métodos repitiendose dichos parámetros durante 24 ciclos y obteniéndose fragmentos de 255 pares de bases.

Es interesante resaltar que todos los “primers” usados corresponden a la zona 5' no codificante del genoma del VHC (Bukh y cols, 1992), que se ha descrito como la zona de máxima estabilidad genómica del VHC.

Para la detección de los amplificados generados por la PCR de las muestras

analizadas se empleó la **electroforesis en gel de agarosa**, la cual permite determinar en menos de una hora la positividad o negatividad de las muestras. Además el uso de marcadores de peso molecular permite identificar las amplificaciones específicas en función de su tamaño.

3.1.2.- DETERMINACIÓN DEL GENOMA VIRAL VHC POR TÉCNICAS DE PCR EN MUESTRAS DE SANGRE: SUERO

El estudio se centró sobre un total de 143 pacientes protocolizados por el Servicio de Digestivo del Departamento de Medicina Interna del Hospital Clínico; a todos ellos se les realizó el test antiVHC y, al menos una vez, la detección del genoma viral RNA-VHC por técnicas de PCR.

Relación entre los resultados del test antiVHC y la PCR

Del total de pacientes, 131 (92%) fueron positivos en el test antiVHC y 12 (8%) fueron negativos en dicho test. Los primeros fueron diagnosticados de hepatitis crónica por virus C y se les realizó la biopsia hepática. 106 pacientes del total de individuos entraron en el protocolo para la terapia con interferón; los 25 pacientes restantes no recibieron este tipo de tratamiento. El grupo de 12 pacientes antiVHC (-) fueron diagnosticados clínicamente de hepatitis, de las cuales un 15% fueron filiadas como hepatitis tipo B y en el resto no se pudo demostrar la etiología del proceso hepático.

La tabla 3.1 muestra los resultados de la aplicación de la metodología de PCR a las muestras de suero de todos los pacientes. En el 100% de los casos la PCR resultó positiva para los pacientes antiVHC (+). Por otra parte, dos pacientes antiVHC (-) con hepatitis no filiada por la metodología RIBA resultaron positivos en el test PCR, esto es, VHC (+)

Tabla 3.1.

AntiVHC

		+	-
PCR sérica	+	131	2
	-	0	10

Debido a las especiales características de la técnica de PCR es posible la contaminación de muestras séricas antes de su procesamiento por restos de amplificadores de ensayos anteriores. Tal contaminación podría dar lugar a resultados falsamente positivos y justificar así las discrepancias encontradas entre el test RIBA y el test PCR. Para obviar la posible contaminación por amplificadores que enmascarasen los resultados produciendo falsos positivos se extremaron las medidas de seguridad para evitar dicha contaminación: uso de puntas de pipetas especiales y separación física entre laboratorios para la realización de la técnica pre y post PCR; además se procesaron, en todos los casos, las muestras por duplicado y junto con ellas se analizaron controles negativos. Los controles negativos fueron indistintamente agua o muestras de suero antiVHC (-) que de forma repetida y continuada daban resultados negativos en el test PCR. Bajo estas condiciones el porcentaje de casos falsos positivos de nuestra serie alcanza el 1.5% si se consideran los dos pacientes antiVHC (-) que resultaron PCR positivos.

Los falsos negativos se trataron de obviar mediante el procesamiento conjunto de controles positivos que descartan hibridaciones nulas o inespecíficas. Igualmente estos controles se procesaron por duplicado y correspondieron a muestras de suero antiVHC (+). Dentro de nuestra serie no se han detectado casos de pacientes antiVHC (+) que resultaran negativos en el test PCR.

Tomando como prueba diagnóstica del proceso morboso la determinación de anticuerpos antiVHC por RIBA, se consideró como verdadero positivo (VP) la

correspondencia entre la positividad de antiVHC y PCR; verdadero negativo (VN) cuando hubo correspondencia entre la negatividad de antiVHC y PCR; falso negativo (FN) cuando a un resultado del antiVHC positivo correspondía la negatividad de PCR y, por último, como falso positivo (FP) cuando a un resultado de antiVHC negativo correspondía el resultado de PCR positivo.

Esto permitió calcular la Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor predictivo positivo (VPP), Valor predictivo negativo (VPN) y Seguridad (SG) de la técnica de PCR.

* S: probabilidad de que el test sea positivo cuando la enfermedad está presente:

$$S = VP / VP + FN \times 100; S = 100\%.$$

* E: probabilidad de que el test sea negativo cuando la enfermedad está ausente:

$$E = VN / VN + FP \times 100; E = 83.3\%.$$

* VPP: probabilidad de que la enfermedad esté presente cuando el test es positivo:

$$VPP = VP / VP + FP \times 100; VPP = 98.49\%.$$

* VPN: probabilidad de que la enfermedad esté ausente cuando el test es negativo:

$$VPN = VN / VN + FN \times 100; VPN = 100\%.$$

Por último, la seguridad de la técnica (SG) estimada al resolver la siguiente ecuación, alcanza un valor próximo al 99%.

$$* SG = VP + VN / VP + FP + VN + FN \times 100; SG = 98.6\%.$$

Determinación del límite de detección de la técnica

Se realizó un estudio para determinar el límite de detección de la técnica de PCR. A partir de sueros antiVHC (+) y previamente clasificados como PCR (+), se hicieron diluciones seriadas a 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10000 y se realizaron nuevos test PCR, por duplicado, para cada dilución. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 3.2.

Tabla 3.2.

Diluciones									
	1:1	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:100	1:1000	1:10000
PCR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

Si bien la técnica de PCR desarrollada en este trabajo no es cuantitativa, fue posible observar que la dilución inicial de sueros positivos en el test molecular hasta factores de 1/10 - 1/20 generaba muestras que aparentemente contienen material génico de origen viral capaz de ser amplificado. Por encima de este factor de dilución no se asegura la positividad del test aun en presencia del genoma viral en la muestra.

Reproducibilidad de la técnica

De forma sistémica muestras de suero antiVHC (+) y previamente clasificadas como PCR (+) se sometieron a un nuevo test de PCR una vez alicuotadas en, al menos, cuatro fracciones. El resultado fue en todos los casos la positividad de la muestra, por lo que la estimación de las variaciones intraensayo del test cualitativo arrojó unos resultados muy satisfactorios.

Muestras de suero PCR (+) y PCR (-) fueron también sometidas a sucesivos test de PCR con objeto de estudiar las variaciones interensayo. En ningún caso una muestra PCR (+) resultó negativa en posteriores tests. Este proceso se repitió de forma sistemática y ha quedado descrito en el apartado correspondiente de control positivo y control negativo del test.

Resultados de PCR sobre una muestra de un crioprecipitado obtenido de una paciente antiVHC (+)

Cuando el suero de ciertos enfermos se deja reposar durante un determinado tiempo a 4 °C, es frecuente que en el fondo del tubo aparezca un precipitado blanquecino denominado crioprecipitado (CPTT) que, característicamente, se redisuelve por completo a 37 °C. Dado que éste suele estar compuesto básicamente por inmunoglobulinas (Ig), el término usado actualmente para esta fracción precipitable

es el de crioglobulinas.

Existen varios tipos de crioglobulinemias atendiendo a la composición y cantidad del crioprecipitado. En 1974, Brouet y cols, establecieron las tres clases de crioglobulinemias definiéndolas como tipo I, II y III.

Se ha demostrado que las crioglobulinemias tipo II y tipo III están frecuentemente asociadas a la infección concomitante con el VHC.

Se analizó por PCR el crioprecipitado procedente de una muestra de sangre de una paciente afecta de crioglobulinemia tipo II. Al mismo tiempo se procesaron y analizaron una alícuota del sobrenadante obtenido de dicho crioprecipitado y de suero. La aplicación de la técnica de PCR desarrollada y adaptada a este trabajo fue útil para poner de manifiesto la presencia del virus tanto en el crioprecipitado, como en el sobrenadante de él obtenido y en el suero de la paciente.

3.1.3.- DETERMINACIÓN DEL GENOMA VIRAL VHC POR TÉCNICAS DE PCR EN MUESTRAS DE SANGRE: CÉLULAS SANGUÍNEAS

Optimización de la técnica

Para el aislamiento y extracción del RNA-VHC en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y en subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4 se trabajó sobre muestras de sangre procedente de pacientes diagnosticados de hepatitis C crónica activa con test antiVHC (+). Se siguió el protocolo indicado en el apartado correspondiente de Material y Métodos para la obtención de una fracción de células linfocitarias comprendida entre 10^5 - 10^7 elementos; de esta suspensión celular se tomó una alícuota para la extracción del RNA viral y la determinación subsiguiente del virus VHC en células totales.

El resto de la suspensión celular fue tratada de acuerdo al protocolo descrito en Material y Métodos para el aislamiento y separación de las subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4. Para ello se empleó el procedimiento de Dynal, el cual se basa en la aplicación de un sistema de bolitas con núcleo metálico que contienen en su superficie el anticuerpo monoclonal correspondiente al antígeno de superficie que distingue y diferencia a cada subpoblación.

El orden de procesamiento fue el siguiente: en primer lugar linfocitos CD14,

después CD19 seguidos de CD8 y CD4. Se siguió este orden de actuación debido a la presencia en los monocitos (células CD14) de antígenos de membrana CD4. El orden de procesamiento elegido asegura una total separación de monocitos sin arrastrar células T colaboradoras/inductoras (CD4) que podrían enmascarar los resultados.

Relación entre resultados de PCR de muestras de suero y células totales

El estudio se realizó sobre muestras de suero y sangre procedente de 54 pacientes diagnosticados de hepatitis crónica por virus C, siendo todos ellos antiVHC (+).

En cerca de la mitad de los casos (46%) se obtuvo una buena concordancia entre la positividad o negatividad del test PCR aplicado a suero y a células totales (ver la tabla 3.3). No obstante en un alto porcentaje de pacientes (41%) el test PCR aplicado a las muestras séricas fue incapaz de detectar la presencia del virus, mientras que en ese mismo test aplicado a células totales resultó ser positivo. Por otra parte, en el 13% de los casos en que el test resultó negativo en células totales se detectó el virus circulante libremente en suero.

Tabla 3.3.

	CMSPt PCR (+)	CMSPt PCR (-)
SUERO PCR (+)	17 (22)*	10 (13)
SUERO PCR (-)	32 (41)	19 (24)

Códigos: * Entre paréntesis porcentajes.

Con objeto de investigar la localización específica del virus entre las células que componen la población linfocitaria se procedió a la aplicación del test de la PCR a lisados celulares obtenidos a partir de las subpoblaciones aisladas mediante anticuerpos específicos. Además se procesaron no solo muestras que previamente habían resultado positivas en PCR para la población celular total si no que se incluyeron en el protocolo 13 muestras en las cuales el test de la PCR había dado negativo para la fracción completa de células sanguíneas.

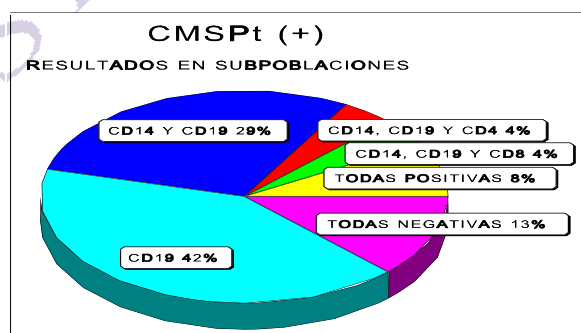
A 34 pacientes se les efectuaron un total de 37 determinaciones del genoma viral del VHC en células totales y en subpoblaciones linfocitarias. En 24 de las determinaciones (65%) el test PCR resultó positivo en células totales y en subpoblaciones, siendo en 2 casos (8%) PCR (+) en la totalidad de las cuatro subpoblaciones, en 1 caso (4%) fue PCR (+) en CD14, CD19 y CD8 siendo PCR (-) en CD4, en 1 caso (4%) fue PCR (+) en CD14, CD19 y CD4 siendo PCR (-) en CD8, en 7 casos (29%) fueron PCR (+) en CD14 y CD19 y PCR (-) en CD8 y CD4, en 10 casos (42%) las determinaciones fueron PCR (+) en CD19 y PCR (-) en CD14, CD8 y CD4.

En el 87% de los casos la fracción celular identificada como CD19+ resultó positiva en el test de PCR, siendo imposible determinar la localización subpoblacional del genoma viral en tan solo el 13% de los casos restantes.

Por último, 13 (35%) del total de las determinaciones resultaron PCR (-) en CMSPt (células mononucleares de sangre periférica totales) y PCR (-) en todas las subpoblaciones, por lo que no se pudo identificar la fracción celular portadora del virus. Es interesante hacer notar que en ningún caso se obtuvo positividad del test de PCR aplicado a subpoblaciones celulares en las que previamente se había obtenido negatividad en el conjunto celular extraído.

La figura 3.4. resume las positivities del test de PCR aplicado a la totalidad de las muestras y subpoblaciones.

Figura 3.4.



3.1.4.- GENOTIPO DEL VHC

Con objeto de identificar los genotipos más frecuentes entre las muestras séricas analizadas en nuestra serie, se procedió al estudio de los subtipos 1a, 1b, 2, 2a, 2b, y 3a, y los genotipos 4, 5, y 6, de la clasificación de Simmonds (1993). El método analítico se basó en la combinación de una nested-RT-PCR con una posterior hibridación con sondas específicas de cada genotipo, correspondiendo la secuencia que se amplifica a la región del core del VHC altamente conservada en estos genotipos. La secuencia de las sondas usadas en este ensayo se han descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

El estudio del genotipo del virus C de la hepatitis se realizó sobre un total de 11 muestras de suero procedentes de pacientes diagnosticados de hepatitis C crónica y obtenidas con anterioridad al tratamiento. El 92% de las muestras séricas de los pacientes analizados presentaron el genotipo 1b y tan solo un 8% correspondió al 3a, siendo negativos el resto de los subtipos ensayados. Los resultados del análisis se expresan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5.

GENOTIPO n=11	
1b	3a
10	1

3.2.- PROTOCOLO DE PACIENTES

3.2.1.- INTRODUCCIÓN

Una vez estandarizada la técnica de detección del virus de la hepatitis C, tanto en muestras de suero como en células mononucleares de sangre periférica, se procedió a la aplicación del test a un protocolo clínico terapéutico. Para ello, se incluyó el test PCR entre las pruebas bioquímicas analíticas que sirven para monitorizar a los pacientes diagnosticados de hepatitis viral y tratados con interferón.

El protocolo terapéutico principal se basó en el empleo de interferón alfa 2b recombinante, Intron A® (Shering Plug), a dosis de 3 MU aplicadas por vía intramuscular tres veces por semana y durante un periodo de seis meses. Tan solo 6 pacientes tuvieron que abandonar el tratamiento debido a los criterios de suspensión recogidos en el anexo V.

Por otra parte, se realizó según un diseño de estudio piloto sobre eficacia del tratamiento, un estudio clínico a un pequeño grupo de 6 pacientes tratados con interferón Beta, Frone® (Serono), a dosis de 6 MU aplicadas por vía intramuscular tres veces por semana y durante un periodo de seis meses. Este protocolo fue abandonado tras la comprobación de los bajos niveles de respuesta.

En ambos protocolos terapéuticos al paciente se le informó del régimen de tratamiento a seguir, significándole los momentos de control analítico y clínico y la posible aparición de efectos secundarios. El ensayo se realizó según los criterios al uso aprobados por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Granada y de acuerdo con la declaración de Helsinki.

En todos los casos el seguimiento de los pacientes se efectuó mediante la consulta clínica, la exploración y la realización de técnicas analíticas cuya descripción pormenorizada queda recogida en Material y Métodos.

Se incluye en este trabajo a un grupo de 25 pacientes igualmente diagnosticados de hepatitis C que no fueron seleccionados para el tratamiento con interferón. Tal grupo de pacientes se ha separado del grupo total de enfermos protocolizados debido a esta circunstancia y se han utilizado los datos bioquímicos y

del test de PCR para analizar la evolución de tales parámetros en ausencia de tratamiento.

Por último, se recogen los datos clínicos y bioquímicos de un grupo de 12 pacientes afectos de hepatitis crónica, en la cual no se pudo detectar la presencia de anticuerpos antiVHC. La evolución clínica de tales pacientes y los valores de las determinaciones analíticas efectuadas han servido, igualmente, para establecer los criterios de fiabilidad y utilidad del test PCR.

3.2.2.- PACIENTES TRATADOS CON INTERFERÓN-ALFA 2b RECOMBINANTE DURANTE 6 MESES

La serie consta de 91 pacientes de edades comprendidas entre 22 y 60 años con una media de 44 años, 51 de ellos varones (56%) y 40 mujeres (44%); diagnosticados de hepatitis crónica por virus C, siendo todos ellos antiVHC(+) mediante RIBA.

El control clínico y analítico de los pacientes en los cuales se instauró el tratamiento con interferón permitió establecer los criterios de respuesta al tratamiento. Estos se basaron en la normalización de los parámetros bioquímicos, fundamentalmente en lo que respecta a la caída en los niveles séricos de transaminasas hepáticas. Siguiendo este criterio los pacientes protocolizados en el ensayo terapéutico se clasificaron en respuesta positiva y respuesta negativa, los enfermos considerados como buenos respondedores al tratamiento son aquellos que normalizan sus niveles séricos de transaminasas, especialmente la GPT, a los tres meses de instaurado el tratamiento.

Los parámetros considerados forman parte del protocolo de actuación para el tratamiento de los pacientes con Interferón alfa 2b recombinante llevado a cabo por el Servicio de Digestivo del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina.

3.2.2.1.- Datos epidemiológicos

Se recogieron del estudio de anamnesis (antecedentes personales) realizado al confeccionar las historias clínicas de enfermos antiVHC(+) incluidos en el protocolo terapéutico. Dichos datos epidemiológicos quedan representados en la Tabla 3.6.

TABLA 3.6.

Datos epidemiológicos

	SI	NO	NR¹
INTER. QUIRUR. PREVIAS	47(52) ²	44 (48)	0
TRANSFUSIONES	21 (23)	70 (77)	0
ADVP³	19 (22)	69 (78)	3
TATUAJES	8 (9)	81 (91)	2
HOMOSEXUALIDAD	0	89 (100)	2
ANTEC. ICTER. O HEPATITIS	24 (27)	64 (73)	3
CONTACTO PROXIMO	17 (19)	70 (81)	4
CONTACTO FAMILIAR	17 (19)	70 (81)	0
ENFER. CONCOMITANTES⁴	19 (21)	72 (79)	0
CONSUMO DE ALCOHOL >20 g/ día⁵	43 (52)	40 (48)	8
TIEMPO DE HIPERTRANSAMINEMIA>3M⁶	52 (67)	26 (33)	13

Códigos: ¹ NR: No recogido en la historia clínica.

² Entre paréntesis: porcentajes.

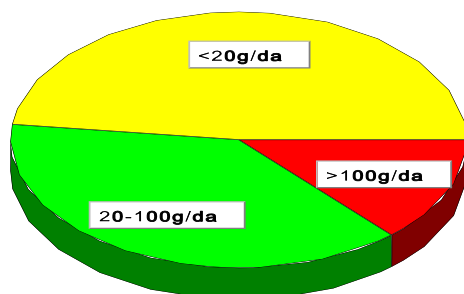
³ ADVP: adictos a drogas por vía parenteral; incluidos antecedentes de una sola punción.

⁴ Enfermedades concomitantes: 7 de los pacientes habían sido diagnosticados de nefropatía; 1 de hemopatía; 6 de diabetes mellitus; 3 de cardiopatía y 2 de hepatopatía.

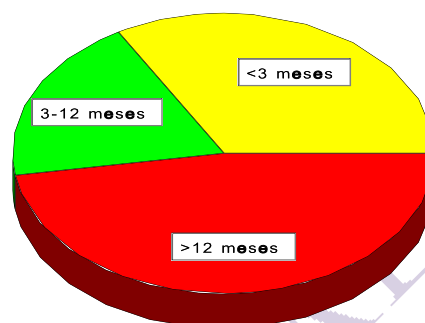
⁵ Consumo de gramos de alcohol por día: 40 pacientes declararon consumir <20 g/ día; 32 entre 20-100 g/ día y 11 consumen >100 g/ día de alcohol (Figura 3.7.).

⁶ Tiempo de hipertransaminemia: para 26 enfermos fue menor de 3 meses; para 15 osciló entre 3 - 12 meses y para 37 pacientes superó los 12 meses (Figura 3.7.).

Figura 3.7.

CONSUMO DE ALCOHOL
g/da

TIEMPO DE HIPERTRANSAMINEMIA



3.2.2.2.- Marcadores serológicos

El estudio incluyó la determinación de marcadores serológicos para los siguientes virus:

- Virus B de la hepatitis: se consideraron el antígeno de superficie (HBsAg) y su correspondiente anticuerpo (AntiHBs); también los anticuerpos correspondientes al antígeno del core: antiHBc total y antiHBc-IgM; además se incluyó el antígeno de la región pre-C (HBeAg) y su correspondiente anticuerpo (antiHBe).
- Virus de la inmunodeficiencia humana o virus del SIDA: se determinó el marcador antiVIH.
- Virus C de la hepatitis: se consideró el antiVHC determinándose por el test RIBA III (C100, NS5, C33 y C33).
- Igualmente se consideró el estudio de los autoanticuerpos anti-nucleares, anti-músculo liso, anti-mitocondriales y anti-LKM.

Todas estas determinaciones se han llevado a cabo en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico. Los resultados de dichos tests se recogen en la tabla 3.8.

TABLA 3.8.

Marcadores serológicos

	(+)	(-)
HBs Ag	2 (2)*	87 (98)
Anti HBs	19 (48)	21 (52)
Anti HBc	28 (33)	56 (67)
Anti HBc IgM	0	18 (100)
HBe Ag	2 (17)	10 (83)
Anti HBe	17 (49)	18 (51)
Anti VIH	0	38 (100)
AntiVHC	91 (100)	0

AUTOANTICUERPOS

Antinucleares	10 (18)	46 (82)
Antimúsculo liso	10 (18)	45 (82)
Antimitocondriales	0	34 (100)
AntiLKM	0	42 (100)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.2.3.- biopsia hepática

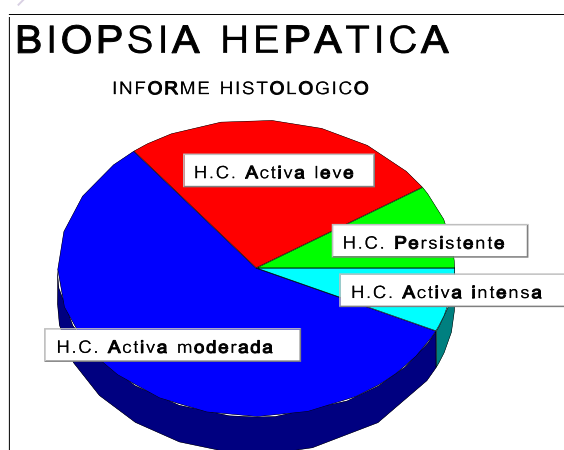
A 87 pacientes de la serie se les realizó una biopsia hepática que fue estudiada en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico. Las muestras histológicas fueron clasificadas como: hígado normal o con lesiones mínimas, hepatitis crónica persistente y hepatitis crónica activa pudiendo ser esta última leve, moderada o intensa. Los resultados se recogen en la tabla 3.9. y en la figura 3.10.

TABLA 3.9.

INFORME HISTOLOGICO	n = 87
NORMAL O LESIONES MINIMAS	0
H.C. PERSISTENTE	8 (9)
H.C. ACTIVA LEVE	23 (27)
H.C. ACTIVA MODERADA	50 (57)
H.C. ACTIVA INTENSA	6 (7)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

Figura 3.10.



3.2.2.4.- Resultados de los parámetros analíticos hematológicos y bioquímicos

Las determinaciones hematológicas y bioquímicas se realizaron en el Laboratorio General del Hospital Clínico. Se consideraron los parámetros relacionados a continuación, indicándose en cada caso los valores medios en que vienen expresadas y sus unidades: hematíes ($\times 10^6/\mu\text{l}$), hemoglobina (g/ dl), actividad de protrombina (%), leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$), plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$), bilirrubina directa (mg/dl), bilirrubina indirecta (mg/dl) y fosfatasa alcalina (UI/ml).

El estudio de transaminasas se centró en las de mayor significación clínica: glutámico-oxalacética (GOT) o ALT; alanil aminotransferasa, glutámico-pirúvica (GPT) o AST aspartato aminotransferasa y gamma glutamiltransferasa (GGT). Los resultados se expresan en unidades internacioneales por litro (UI/ml).

Los valores normales de todos estos parámetros quedaron definidos en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

Las determinaciones de cada uno de los marcadores bioquímicos se realizaron de forma basal (previas al tratamiento con INF), y a los 1, 3 y 6 meses de instaurado el tratamiento e igualmente transcurridos 3 y 6 meses de la finalización de dicho tratamiento. Los resultados se muestran en las tablas siguientes 3.11. a 3.16. indicándose en cada caso el valor medio (M), y el error estándar (E.E.) y desviación estándar de la media (D.E.).

TABLA 3.11.

Parámetros hematológicos y bioquímicos antes de la instauración del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	90	5.00	0.060	0.572
Hemoglobina	90	15.33	0.158	1.499
Acti. Protrombina	91	93.05	1.262	12.044
Leucocitos	91	6.82	0.221	2.112
Plaquetas	91	205.01	6.041	57.626
Bilir. directa	89	0.28	0.022	0.207
Bilir. indirecta	89	0.58	0.033	0.308
Fosfatasa alcalina	88	177.65	5.108	47.922
TRANSAMINASAS				
GOT	91	83.15	6.204	59.185
GPT	91	145.32	11.541	110.101
GGT	89	55.13	5.221	49.251

TABLA 3.12.

Parámetros hematológicos y bioquímicos al mes de instaurado el tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	88	4.94	0.053	0.500
Hemoglobina	88	15.03	0.150	1.405
Acti.Protrombina	86	98.92	1.244	11.539
Leucocitos	88	5.67	0.195	1.832
Plaquetas	86	176.29	6.528	60.543
Bilir. directa	87	0.21	0.011	0.099
Bilir. indirecta	87	0.51	0.021	0.196
Fosfatasa alcalina	88	169.49	5.856	54.939
TRANSAMINASAS				
GOT	89	44.39	2.506	23.638
GPT	89	60.90	4.687	44.217
GGT	88	43.86	4.080	38.275

TABLA 3.13.

Parámetros hematológicos y bioquímicos a los 3 meses de instaurado el tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	86	4.89	0.089	0.827
Hemoglobina	86	14.58	0.150	1.392
Acti.Protrombina	85	97.16	0.957	8.822
Leucocitos	86	5.49	0.170	1.573
Plaquetas	85	170.48	5.689	52.451
Bilir. directa	85	0.20	0.010	0.091
Bilir. indirecta	85	0.50	0.022	0.208
Fosfatasa alcalina	86	153.05	4.624	42.889
TRANSAMINASAS				
GOT	87	43.16	3.39	31.620
GPT	87	54.37	5.026	46.880
GGT	87	36.62	3.474	32.409

TABLA 3.14.

Parámetros hematológicos y bioquímicos al finalizar los 6 meses de tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	81	4.82	0.048	0.431
Hemoglobina	81	14.58	0.155	1.397
Acti.Protrombina	80	97.49	1.359	12.158
Leucocitos	81	5.86	0.208	1.872
Plaquetas	79	171.95	5.554	49.370
Bilir. directa	81	0.19	0.015	0.136
Bilir. indirecta	81	0.49	0.023	0.212
Fosfatasa alcalina	81	141.00	4.233	38.098
TRANSAMINASAS				
GOT	83	46.64	4.987	45.438
GPT	83	62.26	8.328	75.876
GGT	81	41.15	4.497	40.474

TABLA 3.15.

Parámetros hematológicos y bioquímicos transcurridos 3 meses de la finalización del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	74	4.88	0.052	0.444
Hemoglobina	74	14.82	0.168	1.450
Acti.Protrombina	74	95.60	1.559	13.416
Leucocitos	74	6.72	0.236	2.035
Plaquetas	72	197.10	6.796	57.667
Bilir. directa	75	0.23	0.016	0.140
Bilir. indirecta	75	0.54	0.031	0.267
Fosfatasa alcalina	76	149.04	5.108	44.532
TRANSAMINASAS				
GOT	76	71.01	10.893	94.961
GPT	76	116.34	14.628	127.528
GGT	76	47.30	4.662	40.645

TABLA 3.16.

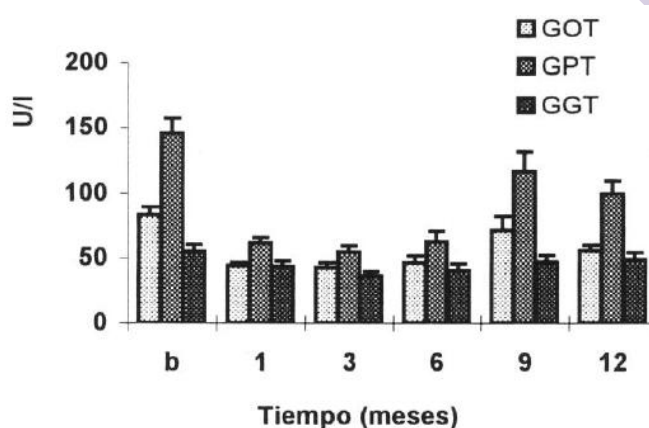
Parámetros hematológicos y bioquímicos transcurridos 6 meses de la finalización del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	66	4.90	0.053	0.434
Hemoglobina	66	15.00	0.195	1.587
Acti.Protrombina	64	98.62	0.462	3.693
Leucocitos	66	6.87	0.269	2.186
Plaquetas	65	202.35	7.037	56.735
Bilir. directa	67	0.23	0.019	0.159
Bilir. indirecta	67	0.56	0.031	0.254
Fosfatasa alcalina	65	163.55	6.021	48.544
TRANSAMINASAS				
GOT	68	55.22	4.307	35.517
GPT	68	92.12	10.223	84.308
GGT	67	48.70	5.382	44.057

En la figura 3.17. se representa la evolución de las transaminasas séricas del grupo de pacientes tratados con interferón alfa 2b recombinante. Se reflejan los valores basales(b), previos al tratamiento, y al mes (1), tres (3) y a los seis (6) meses de instauración del tratamiento, así como a los tres (9) y seis (12) meses de haber concluido dicho tratamiento.

Figura 3.17.

Evolución de las transaminasas



El estudio estadístico identificó diferencias significativas entre los valores basales de transaminasas séricas y los valores de dichas transaminasas a lo largo del tratamiento (1 y 3 meses) y a los 6 meses de haber concluido dicho tratamiento. Así, existen diferencias significativas entre:

* GOT basal frente a GOT 1m, GOT 3m, GOT 6m y GOT 12m ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p < 0.001$, respectivamente).

* GPT basal frente a GPT 1m, GPT 3m, GPT 6m y GPT 12m ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p < 0.001$, respectivamente).

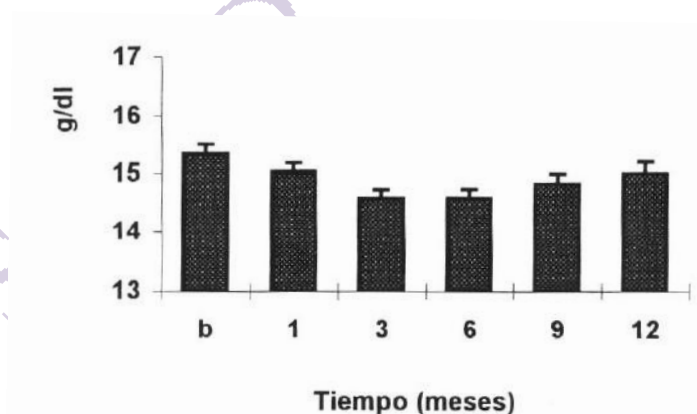
* GGT basal frente a GGT 3m y GGT 6m ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente).

Es interesante considerar que en ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los valores basales y los obtenidos en la medida de las transaminasas a los 3 meses (9) de haber suspendido el tratamiento. Esta observación es importante dado el hecho del aparente descenso de GOT y GPT a los 6 meses de la suspensión del tratamiento. Los resultados son compatibles con un “efecto rebote” provocado por la suspensión del tratamiento con interferón alfa 2b recombinante.

En lo que respecta a los parámetros hematológicos es destacable la caída significativa de los hematíes entre el valor basal y el correspondiente a 6m de tratamiento ($p<0,02$). Hecho que se vio acompañado de una bajada significativa en los valores medios de hemoglobina. La figura 3.18. muestra los niveles de hemoglobina a lo largo del tratamiento y su evolución.

Figura 3.18.

Evolución de la hemoglobina

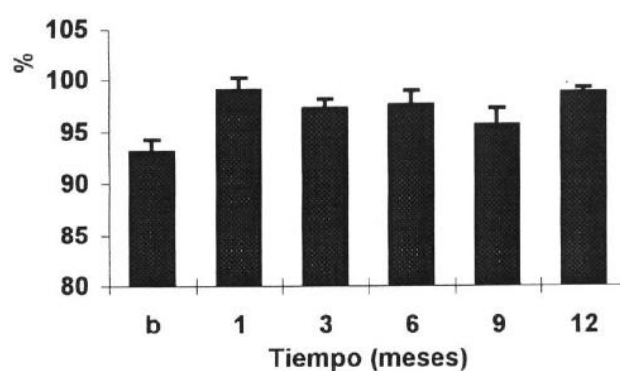


El estudio estadístico detectó las diferencias significativas entre el valor basal de la hemoglobina y los valores a lo largo del tratamiento y a los 3 y 6 meses de haber concluido dicho tratamiento, encontrando diferencias entre la hemoglobina basal y la hemoglobina 3m ($p<0,001$), hemoglobina 6m ($p<0,001$) y la hemoglobina 9m ($p<0,05$).

Un fenómeno parecido ocurrió tanto para la actividad de protrombina, glóbulos blancos y plaquetas. La figura 3.19. muestra la evolución de los niveles de la actividad de protrombina a lo largo del tratamiento.

Figura 3.19.

Evolución de la actividad de protrombina

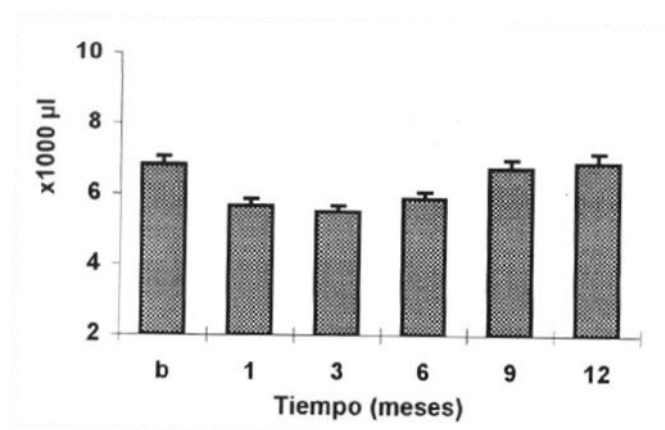


Las diferencias se hicieron significativas para los niveles basales comparados con los valores medios encontrados a los 3m, 6m y 12m ($p < 0.02$, $p < 0.02$ y $p < 0.001$, respectivamente).

En la figura 3.20. se muestra la evolución de los niveles medios de leucocitos a lo largo del tratamiento.

Figura 3.20.

Evolución de los leucocitos

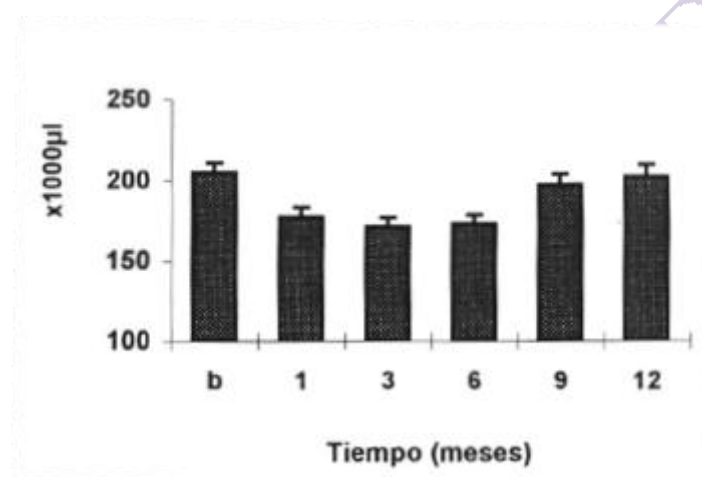


El estudio estadístico detectó diferencias significativas entre el valor basal de los leucocitos y el correspondiente a 1m ($p < 0,001$), 3m ($p < 0,001$) y 6m ($p < 0,001$).

La figura 3.21. representa la evolución de los valores de las plaquetas en idénticos periodos de tiempo a los parámetros anteriores.

Figura 3.21.

Evolución de las plaquetas



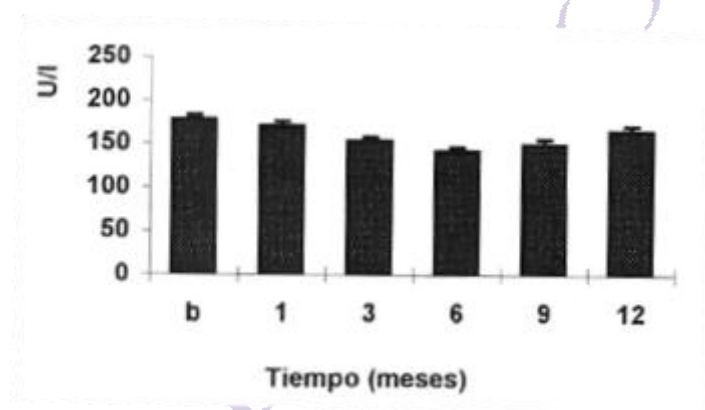
En este caso las diferencias significativas se centraron en los valores correspondientes a las plaquetas basales y las correspondientes a 1m ($p<0,01$) y 3m ($p<0,05$).

La caída significativa de los parámetros correspondientes a las serie blanca, roja y plaquetas es compatible con el efecto de deplección de médula ósea hematopoyética atribuido al tratamiento con interferón alfa 2b recombinante.

Por otra parte, la medida seriada de los marcadores bioquímicos ha permitido identificar aquellas cuyas variaciones puedan ser de utilidad para el seguimiento de la enfermedad y la respuesta general del organismo a la terapia instaurada con interferón. En el caso de la fosfatasa alcalina también existieron diferencias significativas en su evolución a lo largo del tratamiento. La figura 3.22. muestra esta tendencia.

Figura 3.22.

Evolución de la fosfatasa alcalina



En este caso las diferencias se hicieron significativas para los niveles basales comparados con los valores medios encontrados a los 3m ($p < 0,001$), 6m ($p < 0,001$) y 9m ($p < 0,001$) del comienzo del tratamiento.

Para el resto de los parámetros analizados no se han encontrado diferencias significativas en sus valores a lo largo del seguimiento.

El criterio clínico conducente a la consideración de respondedor al tratamiento con interferón en un paciente afecto de hepatitis crónica en general, y por virus C en particular, es la normalización de las transaminasas séricas, especialmente la GPT. Este fenómeno es ya evidente al mes de haber instaurado el tratamiento aunque algunos pacientes se asimilan a este criterio si la normalización ocurre aun al tercer mes de haber comenzado el tratamiento.

Este criterio de respuesta nos permitió separar de la serie total de enfermos tratados con interferón alfa 2b recombinante, aquellos que normalizan sus transaminasas a los 3 meses de tratamiento. Analizando las evolución de las transaminasas séricas de este grupo de pacientes encontramos diferencias significativas. Así, para el caso de la GOT existen diferencias entre su nivel basal y a 1 mes, 3 meses, 6 meses de instaurado el tratamiento así como a los 6 meses (12m) de concluido éste ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.01$ y $p<0.05$, respectivamente).

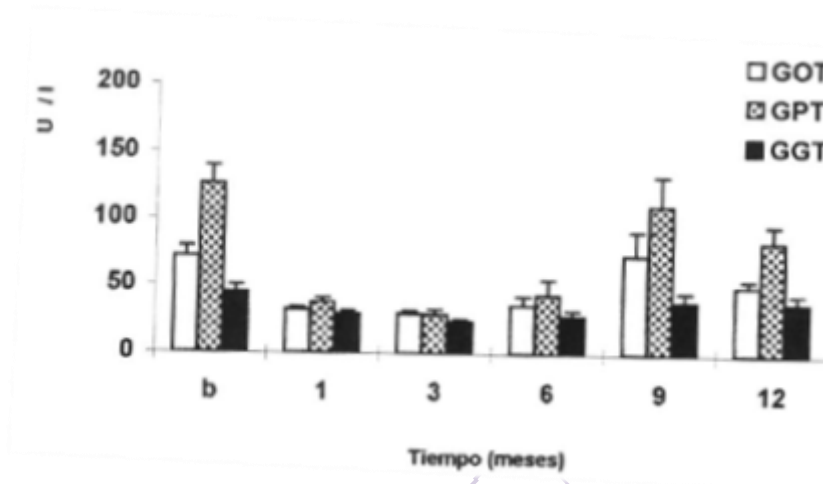
En cuanto a la GPT las diferencias encontradas aparecen, al igual que para el caso de la GOT, al contrastar los valores medios de la GPT basal con los correspondientes a 1 mes, 3 meses, 6 meses y 12 meses ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$ y $p<0.05$, respectivamente).

En el caso de la GGT las diferencias existentes se encuentran entre los valores medios basales y los correspondientes a 1 mes ($p<0.05$), 3 meses ($p<0.01$) y 6 meses ($p<0.05$) de instaurado el tratamiento.

La figura 3.23. representa gráficamente esta tendencia.

Figura 3.23.

Evolución de las transaminasas séricas en los pacientes respondedores



Igualmente, del criterio de respuesta adoptado anteriormente se extrae el grupo de pacientes correspondiente a aquellos que no normalizan sus niveles séricos de transaminasas a los 3 meses de tratamiento con interferón. Aplicando el test estadístico a los valores medios de las enzimas estudiadas en este grupo de enfermos, encontramos unas diferencias significativas que para la GOT se presentan en la totalidad del seguimiento, es decir, diferencias entre los niveles basales respecto a 1 mes ($p<0.01$), 3 meses ($p<0.01$), 6 meses ($p<0.01$) de instaurado el tratamiento y 3 meses (9m) ($p<0.05$) y 6 meses (12m) ($p<0.05$) de concluido éste.

En cuanto a la GPT las diferencias aparecen entre los niveles medios basales y los correspondientes a 1 mes, 3 meses y 6 meses de instaurado el tratamiento ($p<0.001$, $p<0.001$ y $p<0.001$, respectivamente) y a los 6 meses (12m) de finalizar dicho tratamientote ($p<0.01$).

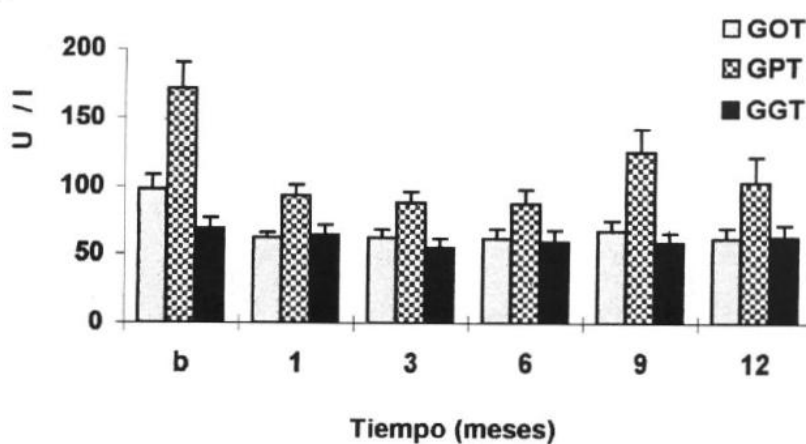
Cabe destacar que en el caso de la GGT no existen diferencias significativas estadísticamente para ninguno de los valores medios obtenidos a lo

largo del seguimiento.

Gráficamente, la figura 3.24. representa estos datos.

Figura 3.24.

Evolución de las transaminasas séricas en los pacientes no respondedores

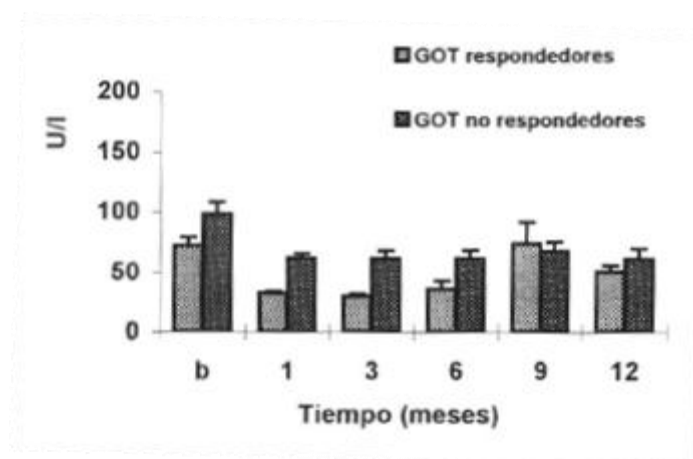


El análisis comparativo de cada uno de los enzimas hepáticos entre el grupo de pacientes con buena respuesta al tratamiento con interferón y los obtenidos por enfermos con mala respuesta o no respuesta se detalla a continuación.

En el caso de la GOT el estudio estadístico detectó diferencias significativas entre los niveles basales ($p < 0.05$), y los determinados a 1m ($p < 0.001$), 3m ($p < 0.001$) y 6m ($p < 0.05$) de haber instaurado el tratamiento.

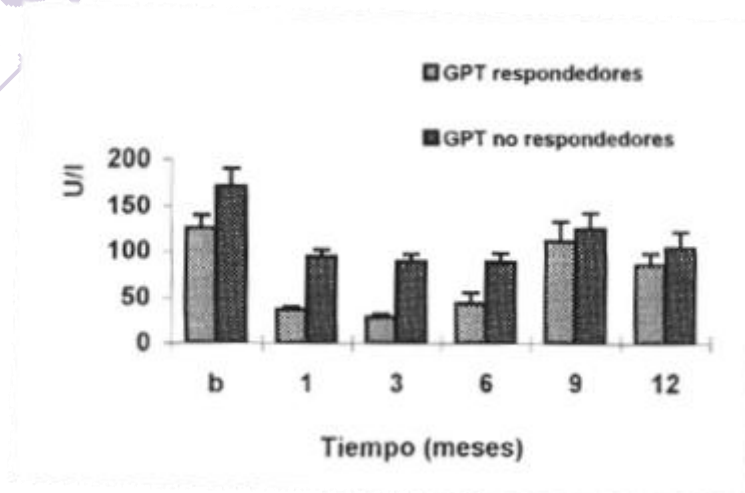
La figura 3.25. muestra esta tendencia.

Figura 3.25.

Evolución GOT respondedores/ GOT no respondedores

Para el caso de la GPT las diferencias encontradas se centran en torno a los valores correspondientes a 1m ($p<0.001$), 3m ($p<0.001$) y 6m ($p<0.001$) sin que se pueda afirmar que los valores basales distinguen el grupo de pacientes con una respuesta más favorable al tratamiento. La figura 3.26. muestra esta tendencia.

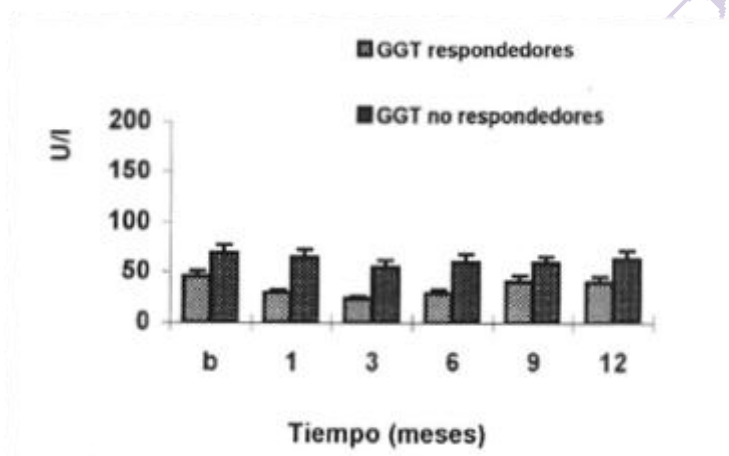
Figura 3.26.

Evolución GPT respondedores/ GPT no respondedores

En cuanto a la GGT las diferencias encontradas se amplían a la totalidad del seguimiento. Así existen diferencias significativas estadísticamente en los valores medios basales (b), 1 mes (1), 3 meses (3), 6 meses (6), 9 meses (9) y 12 meses (12) ($p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.05$ y $p<0.05$, respectivamente). Esta tendencia queda reflejada en la figura 3.27.

Figura 3.27.

Evolución de la GGT respondedores/ GGT no respondedores



Para los parámetros hematológicos considerados las diferencias se centraron en los valores medios de hemáties 9 meses (9) y 12 meses (12) ($p<0.02$ y $p<0.01$, respectivamente). Para la hemoglobina sólo se observó diferencias en los valores correspondientes a 3 meses tras la finalización del tratamiento (9) ($p<0.02$). Los leucocitos sólo fueron distintos significativamente en sus valores basales ($p<0.02$). Las plaquetas si contrastaron más ya que las diferencias afectaron a los valores basales ($p<0.01$), 6 meses ($p<0.02$), 9 meses ($p<0.05$) y 12 meses ($p<0.01$).

Por último, los valores de la fosfatasa alcalina discreparon en sus medidas a 1 mes de tratamiento ($p<0.02$) y a 3 meses de tratamiento ($p<0.05$).

Para el resto de los parámetros valorados las diferencias no fueron significativas en ningún caso.

3.2.2.5.- Resultados del test PCR

Las determinaciones de PCR se realizaron sobre muestras de suero, células mononucleares de sangre periférica y subpoblaciones linfocitarias CD14+, CD19+, CD8+ y CD4+, tomadas con anterioridad al tratamiento con interferón (determinación basal = b) y tras periodos variables de tiempo una vez instaurado éste, es decir, a los 3, 6, 9 y 12 meses. Los resultados de tales determinaciones se recogen en las tablas 3.28. a la 3.32.

TABLA 3.28.

Resultados de PCR en suero, CMSPt y subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4 antes de la instauración del tratamiento

	<i>n</i>	(+)
SUERO b	77	28 (36)*
CMSPt b	9	7 (78)
CD14+ b	3	2 (67)
CD19+ b	3	2 (67)
CD8+ b	3	1 (33)
CD4+ b	3	2 (67)

Códigos: * Entre paréntesis porcentajes

TABLA 3.29.

Resultados de PCR en suero tras 3 meses de tratamiento

	<i>n</i>	(+)
SUERO 3m	51	12 (25)*

TABLA 3.30

Resultados de PCR en suero, CMSPt y subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4 a los 6 meses de comienzo del tratamiento

	<i>n</i>	(+)
SUERO 6m	47	18 (25)*
CMSPt 6m	4	2 (50)
CD14+ 6m	1	0
CD19+ 6m	1	0
CD8+ 6m	1	0
CD4+ 6m	1	0

Códigos: * Entre paréntesis porcentajes

TABLA 3.31.

Resultados de PCR en suero, CMSPt y subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4 a los 3 meses de concluido el tratamiento

	<i>n</i>	(+)
SUERO 9m	52	20 (38)*
CMSPt 9m	7	1 (14)
CD14+ 9m	6	0
CD19+ 9m	6	1 (17)
CD8+ 9m	6	0
CD4+ 9m	6	0

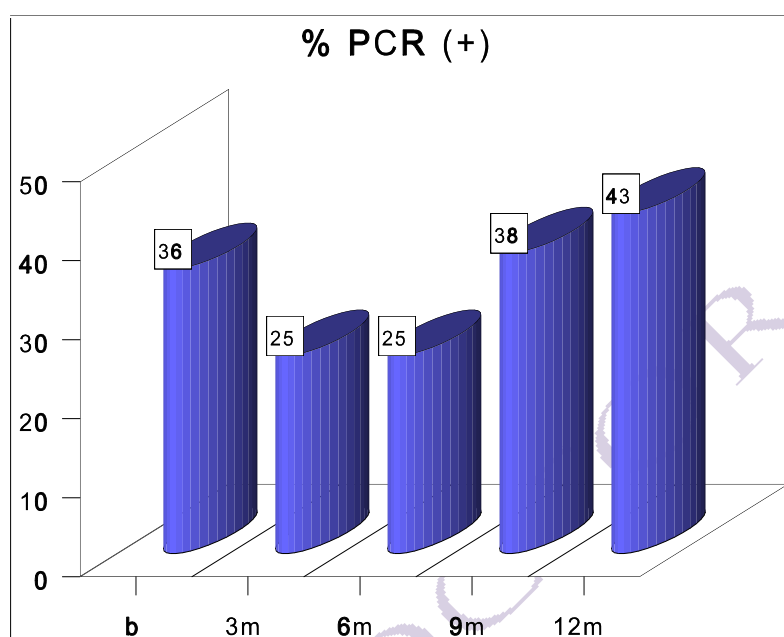
Códigos: * Entre paréntesis porcentajes

TABLA 3.32.

Resultados de PCR en suero, CMSPt y subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4 a partir de 6 meses de concluido el tratamiento

	<i>n</i>	(+)
SUERO 12m	112	48 (43)*
CMSPt 12m	34	23 (68)
CD14+ 12m	17	3 (18)
CD19+ 12m	17	10 (59)
CD8+ 12m	17	1 (6)
CD4+ 12m	17	0

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes.

Figura 3.33.

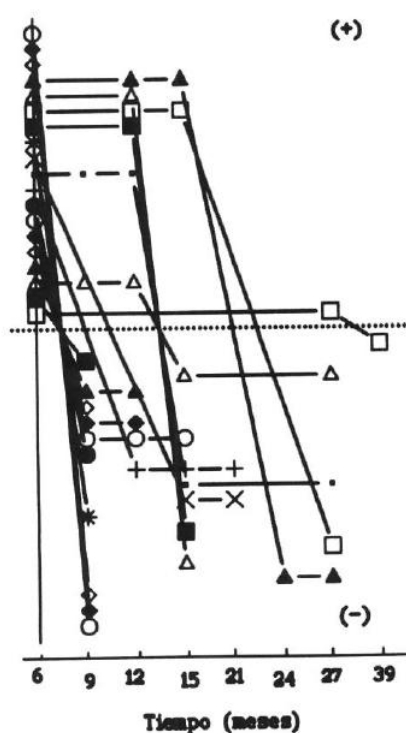
La figura 3.33. muestra los porcentajes medios de positividad del test PCR en muestras de suero en el grupo de pacientes tratados con interferón alfa 2b recombinante. Como puede observarse el tratamiento determina una caída importante en el número de pacientes PCR positivos, pero la suspensión de éste trae consigo una elevación significativa en el número de pacientes con virus circulante.

Un análisis más pormenorizado de los datos del test PCR puede ser de utilidad para la evaluación objetiva de la eficacia del test en el protocolo de seguimiento de los pacientes. Así, dentro de este grupo de enfermos tratados con interferón alfa durante 6 meses podríamos considerar como “verdaderos respondedores” al tratamiento a aquellos pacientes que negativizan la viremia tras en el curso del tratamiento. Los pacientes quedarían encuadrados como pacientes con respuesta positiva (aquellos en los que desaparece el genoma viral en suero) y pacientes con no respuesta o respuesta negativa (aquellos que mantienen la presencia del genoma viral a lo largo del tiempo).

La figura 3.34. muestra las tendencias del grupo de respuesta positiva en cuanto a la negativización viral en suero en función del tiempo. En todos los casos ocurrió el paso de positividad a negatividad de la viremia pero esto se produjo a diferentes momentos durante el tiempo del tratamiento, recién finalizado éste o meses tras haber finalizado la terapia.

Figura 3.34.

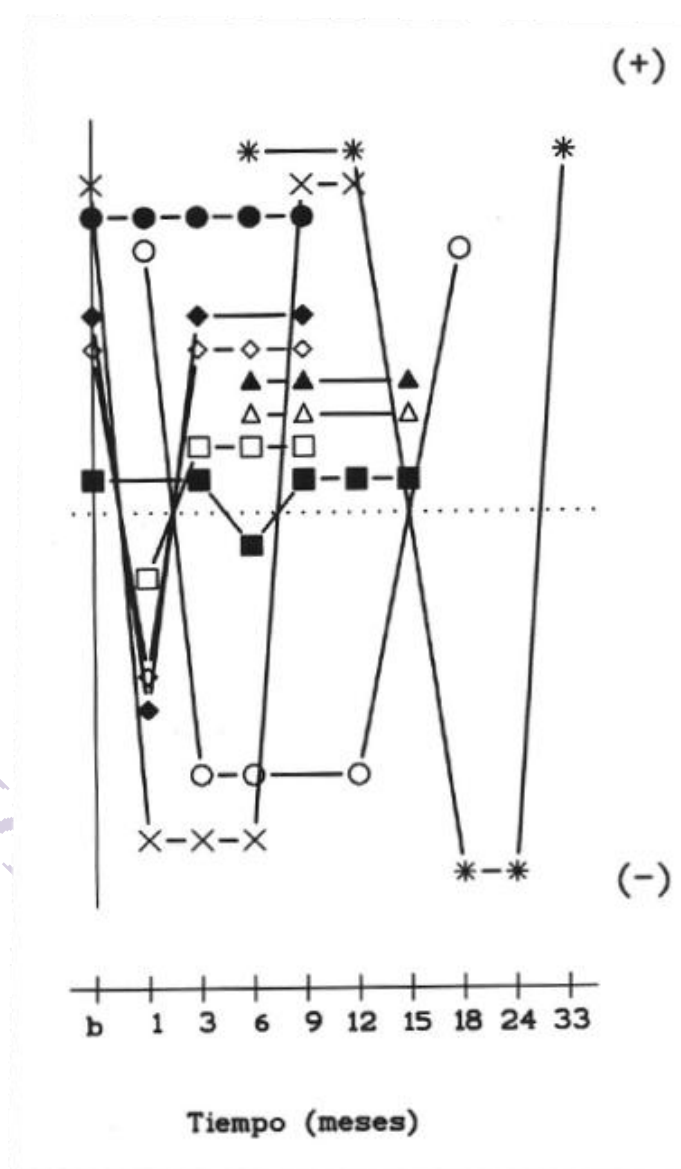
Pacientes con respuesta positiva



La figura 3.35. muestra las tendencias del grupo de no respuesta en cuanto a la evolución de su viremia en función del tiempo.

Figura 3.35.

Pacientes con no respuesta



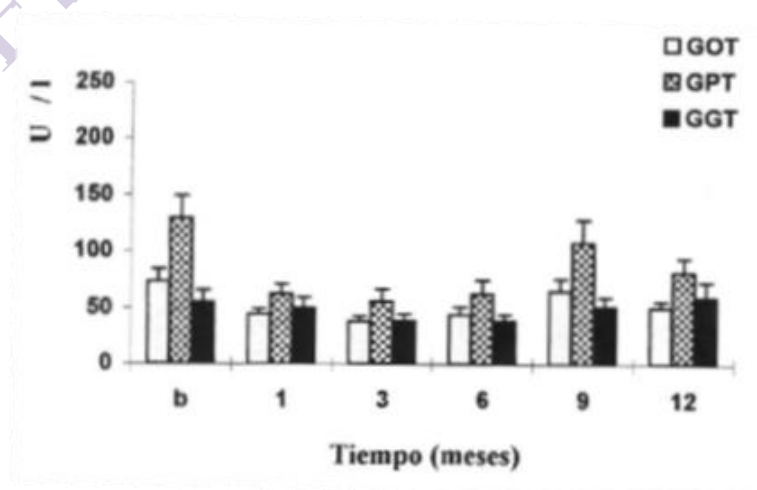
Al efectuar el análisis estadístico de la evolución de los parámetros bioquímicos, en estos dos grupos de pacientes, encontramos que en el grupo de los considerados como respuesta positiva -viremia negativa- existen diferencias significativas en los valores medios de las transaminasas antes y después del tratamiento. Así, al comparar los niveles de la GOT basal encontramos diferencias con la GOT 1mes ($p<0.05$), GOT3 meses ($p<0.01$) y GOT 6 meses ($p<0.05$). En el caso de la GPT este grupo presenta diferencias con respecto al valor basal en la media correspondiente a 1 mes ($p<0.01$), 3 meses ($p<0.01$), 6 meses ($p<0.01$) y 12 meses ($p<0.05$). Con respecto a la GGT no existen diferencias entre el valor medio basal y los valores medios a lo largo del tratamiento.

No ocurre lo mismo para el resto de la serie de pacientes tratados. En cuanto al grupo considerado como de no respuesta -viremia positiva- encontramos que no existen diferencias en los niveles medios de transaminasas al comparar niveles basales y los obtenidos a lo largo del tratamiento o tras la finalización de éste.

La figura 3.36. muestra la evolución en el tiempo de los valores medios de GOT, GPT y GGT para el grupo de pacientes en los que ocurrió la negativización de la viremia sérica.

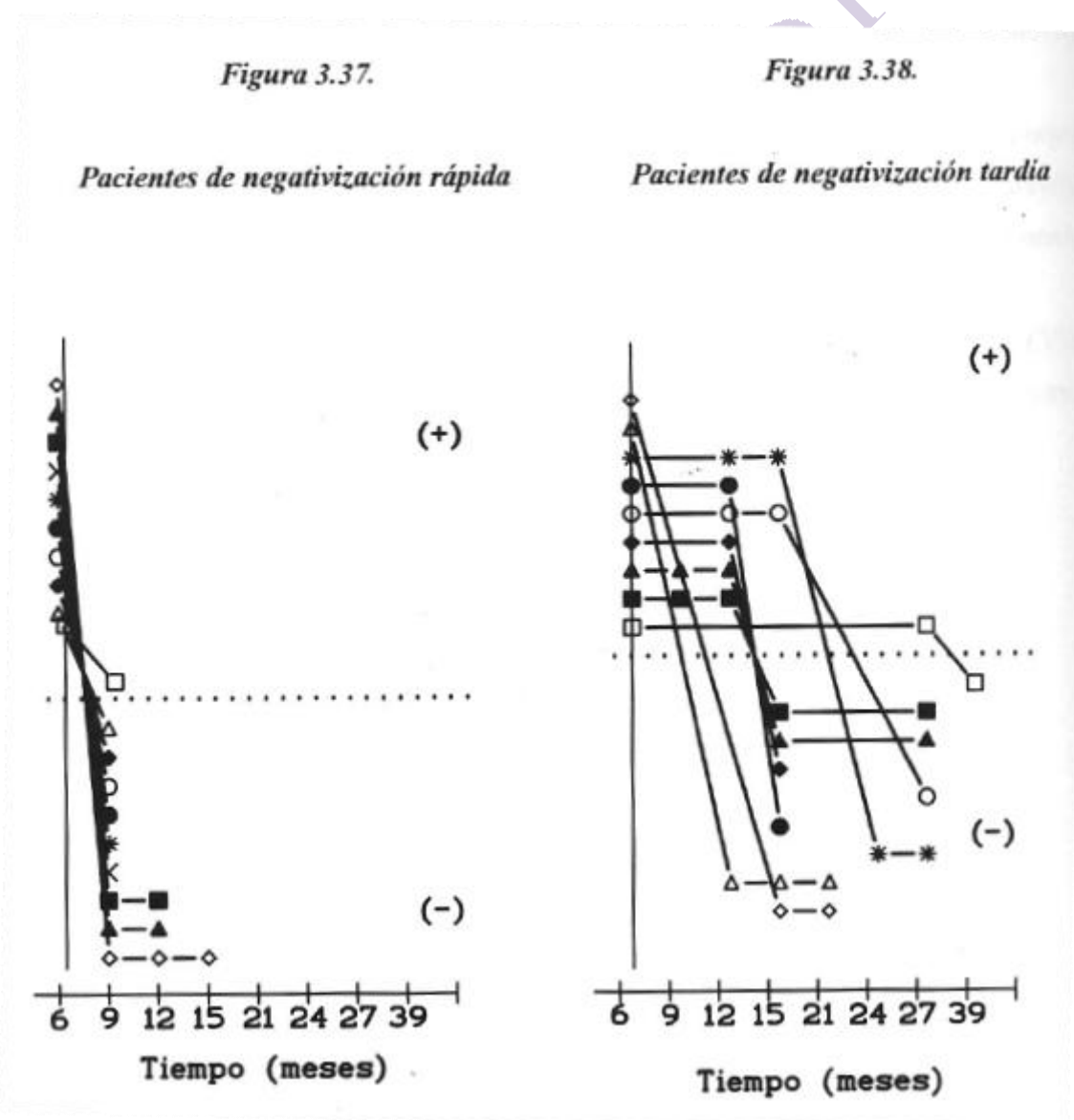
Figura 3.36.

Evolución de las transaminasas del grupo de respuesta positiva



Para hacer un estudio más pormenorizado del grupo de pacientes con respuesta positiva al tratamiento, desde el punto de vista del test molecular se procedió a la división de dichos pacientes en dos grupos, uno de respuesta precoz y otro de respuesta tardía, dependiendo del tiempo en que se produjo el paso a negativización de la viremia. Así, nos encontramos con un 53% de los pacientes en los que la negativización se ha producido a los 3 meses (9) de concluído el tratamiento, mientras que en el resto de los pacientes (47%) la negativización ocurrió en un plazo más tardío tras la finalización del tratamiento.

Las figuras 3.37. y 3.38. muestran gráficamente estas dos tendencias.



Al efectuar el estudio estadístico de las variaciones de los parámetros bioquímicos de los pacientes de respuesta positiva rápida con respecto a los que negativizan su viremia más tardíamente, tan solo se encontraron diferencias significativas en los valores correspondientes a los niveles medios de GPT a los tres meses de tratamiento ($p<0.05$).

Junto a la detección del virus en suero se tuvo la ocasión de determinar en este trabajo la presencia del agente patógeno en células sanguíneas. Para ello se siguió la metodología indicada en el apartado correspondiente de Material y Métodos para la separación de fracciones linfocitarias y la extracción del genoma viral del interior celular. La aplicación de esta técnica al grupo de pacientes sometidos a tratamiento con interferón alfa 2b recombinante generó los resultados que se muestran a continuación: mientras que en el grupo de pacientes de respuesta positiva por negativización de la viremia el 67% resulta positivo en el test celular, este porcentaje desciende tan solo al 50% para el grupo de pacientes en que no hubo negativización viral en suero.

Nuestros resultados parecen indicar que en un porcentaje muy importante de pacientes las células mononucleares de sangre periférica pueden actuar de reservorio para la reinfección viral.

Por último, al comparar el grupo de respondedores según criterio clínico de normalización de las transaminasas séricas a los 1-3 meses de tratamiento con el grupo de respuesta positiva por negativización de la viremia el test estadístico aplicado estimó diferencias significativas en los valores de transaminasas séricas. Así, existían diferencias entre la GOT de ambos grupos correspondiente a 1 mes de tratamiento ($p<0.05$); para la GPT las diferencias se centraron en los valores medios correspondientes a 1 mes y 3 meses ($p<0.01$ y $p<0.05$, respectivamente). Para el caso de la GGT también existieron diferencias en los valores correspondientes a 1 mes ($p<0.05$) y 3 meses ($p<0.05$).

Por el contrario, no existen diferencias en los valores medios de transaminasas séricas en los grupos de no respondedores según el criterio clínico y de no respuesta por no negativización de la viremia.

En el estudio clínico se ha incluido a un paciente varón de 43 años de edad, diagnosticado de hepatitis crónica por virus C. Dicho enfermo fue sometido al mismo protocolo clínico que los pacientes de la serie anterior pero a diferencia de ellos completó un ciclo de tratamiento con interferón alfa 2b recombinante de 12 meses.

Este paciente no fue positivo en ninguno de los marcadores serológicos estudiados excepto para el caso del antiVHC, declaró consumir más de 100 g de alcohol por día y su biopsia hepática confirmó el diagnóstico de hepatitis crónica activa leve.

Cabe destacar la evolución de sus transaminasas que a partir del primer mes de tratamiento siempre se mantuvieron en el intervalo de la normalidad.

En cuanto a los datos de las determinaciones de PCR realizadas en muestras de suero, células mononucleares de sangre periférica y subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4, quedan reflejados en las tablas 3.39. y 3.40.

TABLA 3.39.

	PCR
SUERO b	(-)
CMSPt b	(+)
SUERO 1m	(-)
SUERO 3m	(-)

TABLA 3.40.

	PCR
SUERO 12m	(-)
CD14+ 12m	(-)
CD19+ 12m	(-)
CD8+ 12m	(-)
CD4+ 12m	(-)
CMSPt 12m	(-)

3.2.3.- PACIENTES QUE NO CONCLUYERON EL TRATAMIENTO

El estudio clínico incluye un grupo de pacientes que no concluyeron el periodo estándar de 6 meses de tratamiento con interferón alfa 2b recombinante, interrumpiendo el mismo a los 4 meses de haberlo iniciado. El plazo de 4 meses para la valoración de no respuesta y abandono del protocolo se dispuso en un grupo de pacientes pertenecientes a otra rama de protocolo terapéutico que incluía tal fecha de valoración. La enmienda posterior prolongó a 6 meses el período inicial de tratamiento antes de valorar la respuesta.

La serie consta de seis pacientes con edades comprendidas entre 19 y 60 años con una media de 47 años, 3 de ellos varones (50%) y 3 mujeres (50%); diagnosticados de hepatitis crónica por virus C, siendo todos ellos antiVHC (+) mediante RIBA.

3.2.3.1.- Datos epidemiológicos

Se recogieron igualmente del estudio anamnesis (antecedentes personales) realizado al confeccionar las historias clínicas de enfermos antiVHC (+) incluidos en el protocolo terapéutico. Quedan reflejados en la tabla 3.41.

TABLA 3.41.

Datos epidemiológicos

	SI	NO	NR ¹
INTER. QUIRUR. PREVIAS	4 (80) ²	1 (20)	1
TRANSFUSIONES	2 (40)	3 (60)	1
ADVP³	0	5 (100)	1
TATUAJES	0	5 (100)	1
HOMOSEXUALIDAD	0	5 (100)	1
ANTEC. ICTER. O HEPATITIS	0	5 (100)	1
CONTACTO PROXIMO	0	5 (100)	1
CONTACTO FAMILIAR	0	5 (100)	1
ENFER. CONCOMITANTES⁴	0	5 (100)	1
CONSUMO DE ALCOHOL >20 g/ día⁵	2 (33)	4 (67)	1
TIEMPO DE HIPERTRANSAMINEMIA>3M⁶	2(67)	1 (33)	2

Códigos: ¹ NR: No recogido en la historia clínica.

² Entre paréntesis: porcentajes.

³ ADVP: adictos a drogas por vía parenteral; incluidos antecedentes de una sola punción.

⁴ Enfermedades concomitantes: los datos recogidos en 5 pacientes carecían de interés.

⁵ Consumo de gramos de alcohol por día: 4 pacientes declaran consumir <20 g/ día y 2 consumen entre 20-100 g/ día de alcohol.

⁶ Tiempo de hipertransaminemia: para 1 enfermo fue menor de 3 meses y para 2 superó los 12 meses.

3.2.3.2- Resultados de los marcadores serológicos

El estudio incluyó la determinación de los mismos marcadores serológicos que en la serie anterior. Los resultados se recogen en la tabla 3.42.

TABLA 3.42.

Marcadores serológicos

	(+)	(-)
HBs Ag	0	6 (100)*
Anti HBs	1 (100)	0
Anti HBc	1 (17)	5 (83)
Anti HBc IgM	0	0
HBe Ag	0	0
Anti HBe	0	1 (100)
Anti VIH	0	1 (100)
AntiVHC	6 (100)	0
AUTOANTICUERPOS		
Antinucleares	2 (33)	4 (67)
Antimúsculo liso	3 (50)	3 (50)
Antimitocondriales	0	1 (100)
AntiLKM	0	6 (100)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.3.3.- biopsia hepática

A 5 pacientes de la serie se les realizó una biopsia hepática que fue estudiada en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico. Los resultados se recogen en la tabla 3.43.

TABLA 3.43.

INFORME HISTOLOGICO	n = 5
NORMAL O LESIONES MINIMAS	0
H.C. PERSISTENTE	1 (20)
H.C. ACTIVA LEVE	1 (20)
H.C. ACTIVA MODERADA	3 (60)
H.C. ACTIVA INTENSA	0

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.3.4.- Resultados de los parámetros analíticos hematológicos y bioquímicos

Se han considerado las mismas determinaciones hematológicas que para la serie anterior. Las determinaciones de dichos parámetros se realizan de forma basal (previas al tratamiento con INF), y a los 1 y 3 meses de tratamiento, igualmente transcurridos 2, 5 y 8 meses de la finalización de dicho tratamiento. Los resultados se expresan en las tablas siguientes 3.44. a 3.49, indicándose en cada caso el valor medio (M), y el error estándar (E.E.) y desviación estándar de la media (D.E.).

TABLA 3.44.

Parámetros hematológicos y bioquímicos antes de la instauración del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	6	5.1	0.231	0.565
Hemoglobina	6	15.28	0.589	1.443
Acti. Protrombina	6	98.33	1.666	4.082
Leucocitos	6	7.03	0.851	2.086
Plaquetas	6	224.5	43.068	105.521
Bilir. directa	5	0.3	0.045	0.1
Bilir. indirecta	5	0.66	0.107	0.241
Fosfatasa alcalina	6	161	16.061	39.349
TRANSAMINASAS				
GOT	6	75.67	9.828	24.08
GPT	6	110.7	13.918	34.1
GGT	6	70.67	24.898	61.001

TABLA 3.45.

Parámetros hematológicos y bioquímicos al mes de instaurado el tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	6	5.2	0.299	0.732
Hemoglobina	6	15.17	0.601	1.472
Acti.Protrombina	6	100	0	0
Leucocitos	6	5.88	0.518	1.269
Plaquetas	6	185	30.746	75.329
Bilir. directa	6	0.22	0.031	0.075
Bilir. indirecta	6	0.5	0.057	0.141
Fosfatasa alcalina	6	165.17	16.227	39.756
TRANSAMINASAS				
GOT	6	65.67	9.740	23.864
GPT	6	84	14.551	35.65
GGT	6	59.33	16.470	40.352

TABLA 3.46.

Parámetros hematológicos y bioquímicos a los 3 meses de instaurado el tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	6	4.92	0.323	0.791
Hemoglobina	6	14.67	0.494	1.211
Acti.Protrombina	6	100	00	0
Leucocitos	6	14.93	9.237	22.631
Plaquetas	6	164	23.356	57.222
Bilir. directa	6	0.28	0.031	0.075
Bilir. indirecta	6	0.60	0.085	0.209
Fosfatasa alcalina	6	166.17	18.416	45.119
TRANSAMINASAS				
GOT	6	109.5	33.5	82.075
GPT	6	156	47.877	117.3
GGT	6	88.17	27.039	66.246

TABLA 3.47.

Parámetros hematológicos y bioquímicos a los 2 meses de suspensión del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	5	5.18	0.349	0.782
Hemoglobina	5	15.4	0.677	1.516
Acti.Protrombina	5	96.6	3.394	7.603
Leucocitos	5	7.74	0.876	1.963
Plaquetas	5	202	29.660	66.438
Bilir. directa	4	0.2	0.041	0.082
Bilir. indirecta	4	0.5	0.091	0.182
Fosfatasa alcalina	4	151.5	2.254	4.509
TRANSAMINASAS				
GOT	4	85.25	12.552	25.105
GPT	4	126	22.275	44.55
GGT	4	88.75	24.55	49.101

TABLA 3.48.

Parámetros hematológicos y bioquímicos transcurridos 5 meses de la finalización del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	3	4.77	0.418	0.723
Hemoglobina	3	15	1.156	2
Acti.Protrombina	3	90.67	5.213	9.018
Leucocitos	3	6.27	1.421	2.458
Plaquetas	3	185	67.089	116.065
Bilir. directa	3	0.33	0.066	0.115
Bilir. indirecta	3	0.8	0.265	0.458
Fosfatasa alcalina	3	172	31.083	53.773
TRANSAMINASAS				
GOT	3	103	28.861	49.93
GPT	3	176.7	71.445	123.6
GGT	3	67.33	37.538	64.941

TABLA 3.49.

Parámetros hematológicos y bioquímicos transcurridos 8 meses de la finalización del tratamiento

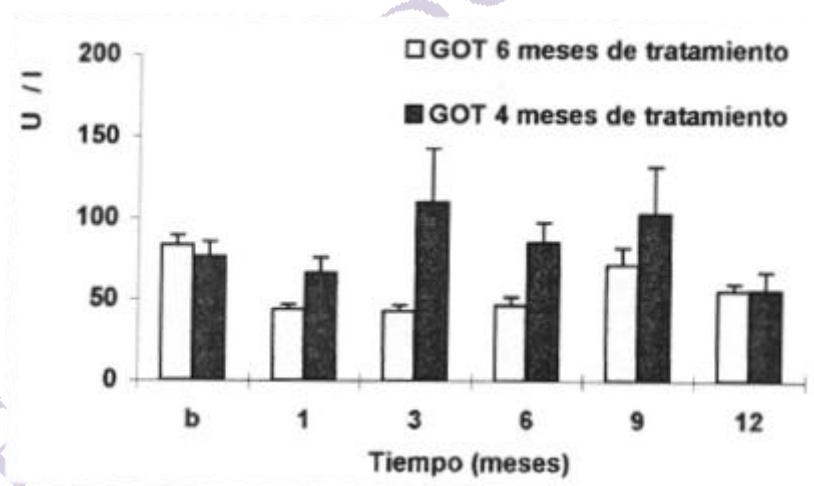
	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	3	4.97	0.441	0.763
Hemoglobina	4	15.25	0.75	1.5
Acti.Protrombina	4	100	0	0
Leucocitos	4	7.95	0.536	1.072
Plaquetas	4	236	39.317	78.634
Bilir. directa	4	0.2	0.041	0.082
Bilir. indirecta	4	0.45	0.05	0.1
Fosfatasa alcalina	4	137.75	7.04	14.080
TRANSAMINASAS				
GOT	4	55.75	11.123	22.247
GPT	4	84.5	10.49	20.98
GGT	4	58.75	15.107	30.215

En cuanto a la evolución de las transaminasas séricas de este grupo de pacientes tratados con interferón alfa 2b recombinante durante 4 meses el análisis estadístico no encontró diferencias significativas entre ninguno de los valores de los parámetros analizados

En el análisis estadístico comparativo entre las transaminasas séricas de este grupo con las del grupo de enfermos tratados durante 6 meses se encontraron diferencias significativas para el caso de la GOT en los valores medios a 1 mes ($p<0.05$) y 6 meses ($p<0.01$). La figura 3.50. muestra esta tendencia.

Figura 3.50.

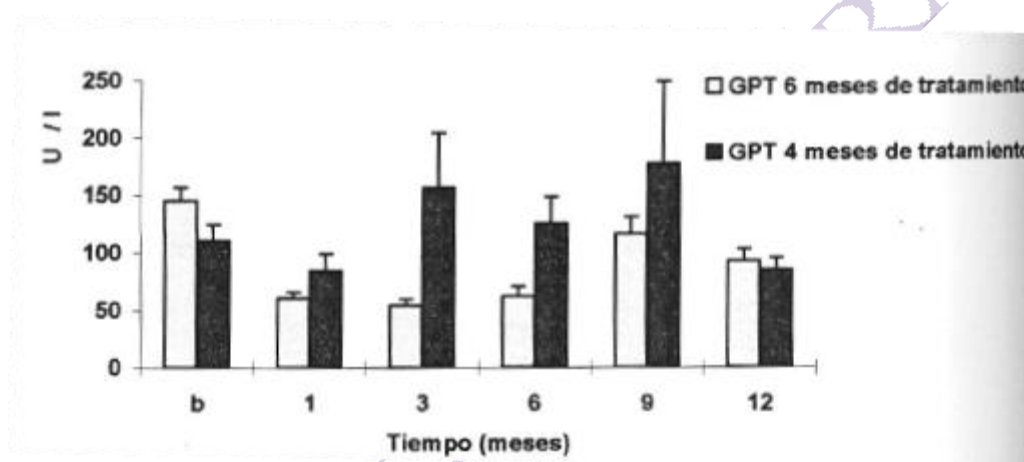
Evolución de la GOT tratamiento completo/ GOT 4 meses de tratamiento



En cuanto a la GPT las diferencias se encontraron a los 3 meses ($p < 0.05$) y 6 meses ($p < 0.01$). La figura 3.51. muestra esta tendencia.

Figura 3.51.

Evolución de la GPT tratamiento completo/ GPT 4 meses de tratamiento



Para el caso de la GGT no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos de determinaciones analizadas.

3.2.3.5.- Datos de PCR

Las determinaciones de PCR se realizaron sobre suero y células mononucleares de sangre periférica tomadas con anterioridad al tratamiento con interferón (basal = b) y tras periodos variables de tiempo una vez instaurado éste. Los resultados se recogen en la tabla 3.52.

TABLA 3.52.

	<i>n</i>	(+)
SUERO b	6	1 (17)*
SUERO 3m	5	2 (40)
CMSPt 3m	1	1 (100)
SUERO 9m	2	1 (50)
CMSPt 9m	1	1 (100)
SUERO 12m	1	0

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes.

3.2.4.- PACIENTES TRATADOS CON INTERFERÓN-BETA

Se realizó, según un diseño de estudio piloto sobre eficacia del tratamiento un protocolo terapéutico basado en la administración de 6 MU de interferón beta tres veces por semana y durante 6 meses por vía intramuscular.

La serie consta de 8 pacientes de edades comprendidas entre 47 y 60 años con una media de 55 años, 4 de ellos varones (50%) y 4 mujeres (50%); diagnosticados de hepatitis crónica por virus C, siendo todos ellos antiVHC(+) mediante RIBA. Se consideran los mismos parámetros analíticos valorados para

los enfermos tratados con Interferón alfa 2b recombinante.

3.2.4.1.- Datos epidemiológicos

Se recogieron de los datos incluidos en las historias clínicas personales de los enfermos protocolizados para la terapia con interferón beta. Quedan representados en la tabla 3.53.

TABLA 3.53.

	SI	NO	NR ¹
INTER. QUIRUR. PREVIAS	3 (43) ²	4(57)	1
TRANSFUSIONES	1 (17)	5(83)	2
ADVP ³	0	7 (100)	1
TATUAJES	0	7 (100)	1
HOMOSEXUALIDAD	0	7 (100)	1
ANTEC. ICTER. O HEPATITIS	2 (28)	5 (72)	1
CONTACTO PROXIMO	0	7 (100)	1
CONTACTO FAMILIAR	0	7 (100)	1
ENFER. CONCOMITANTES ⁴	3 (37)	5 (63)	0
CONSUMO DE ALCOHOL >20 g/ día ⁵	2 (33)	4 (67)	2
TIEMPO DE HIPERTRANSAMINEMIA>3M ⁶	5 (83)	1 (17)	2

Códigos: ¹ NR: No recogido en la historia clínica.

² Entre paréntesis: porcentajes.

³ ADVP: adictos a drogas por vía parenteral; incluidos antecedentes de una sola punción.

⁴ Enfermedades concomitantes: 1 de los pacientes había sido diagnosticado de nefropatía, 1 de diabetes mellitus y 1 de hepatopatía.

⁵ Consumo de gramos de alcohol por día: 4 pacientes declaran consumir <20 g/ día, 1 entre 20-100 g/ día y 1 consume >100 g/ día de alcohol.

⁶ Tiempo de hipertransaminemia: para 1 enfermo fue menor de 3 meses, para 1 osciló entre 3 - 12 meses y para 4 pacientes superó los 12 meses.

3.2.4.2.- Resultados de los marcadores serológicos

Se consideran los mismos marcadores serológicos que en las series anteriores. Dichos resultados se recogen en la tabla 3.54.

TABLA 3.54.
Marcadores serológicos

	(+)	(-)
HBs Ag	0	7 (100)*
Anti HBs	2 (67)	1 (33)
Anti HBc	2 (33)	4 (67)
Anti HBc IgM	0	0
HBe Ag	0	0
Anti HBe	1 (100)	0
Anti VIH	0	0
AntiVHC	8 (100)	0
AUTOANTICUERPOS		
Antinucleares	1 (50)	1 (50)
Antimúsculo liso	0	2 (100)
Antimitocondriales	0	0
AntiLKM	1 (100)	0

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.4.3.- biopsia hepática

A los 6 pacientes se les realizó la biopsia hepática en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico. Los resultados se recogen en la tabla 3.55.

TABLA 3.55.

INFORME HISTOLOGICO	n = 6
NORMAL O LESIONES MINIMAS	0
H.C. PERSISTENTE	1 (17)
H.C. ACTIVA LEVE	2 (33)
H.C. ACTIVA MODERADA	2 (33)
H.C. ACTIVA INTENSA	1 (17)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.4.4.- Resultados de las determinaciones analíticas hematológicas y bioquímicas

Las determinaciones de dichos parámetros se realizaron de forma basal (previas al tratamiento con INF beta), y a los 1, 3 y 6 meses de tratamiento, igualmente transcurridos 3 y 6 meses de la finalización del tratamiento. Los resultados se expresan en las tablas siguientes 3.56. a 3.61, indicándose en cada caso el valor medio (M), y el error estándar (E.E.) y desviación estándar de la media (D.E.).

TABLA 3.56.

Parámetros hematológicos y bioquímicos antes de la instauración del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	7	4.87	0.089	0.236
Hemoglobina	7	15	0.617	1.633
Acti. Protrombina	7	93.71	2.851	7.543
Leucocitos	8	5.94	0.521	1.473
Plaquetas	7	189	32.035	84.758
Bilir. directa	6	0.28	0.048	0.117
Bilir. indirecta	6	0.65	0.099	0.242
Fosfatasa alcalina	6	193	28.543	69.917
TRANSAMINASAS				
GOT	8	109.37	25.093	70.974
GPT	8	190.75	55.979	158.332
GGT	7	78.43	29.019	76.778

TABLA 3.57.

Parámetros hematológicos y bioquímicos al mes de instaurado el tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	7	4.81	0.156	0.414
Hemoglobina	7	15.29	0.421	1.113
Acti.Protrombina	7	99.43	0.571	1.512
Leucocitos	7	5.46	0.889	2.352
Plaquetas	7	137.86	16.313	43.160
Bilir. directa	7	0.26	0.037	0.097
Bilir. indirecta	7	0.64	0.094	0.251
Fosfatasa alcalina	7	186	20.859	55.187
TRANSAMINASAS				
GOT	8	60	10.469	29.612
GPT	8	103.5	32.896	93.044
GGT	7	71	32.075	84.863

TABLA 3.58.

Parámetros hematológicos y bioquímicos a los 3 meses de instaurado el tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	7	4.87	0.169	0.449
Hemoglobina	7	15.29	0.565	1.496
Acti.Protrombina	7	100	0	0
Leucocitos	7	5.74	0.568	1.503
Plaquetas	7	142.43	21.357	56.506
Bilir. directa	7	0.21	0.034	0.089
Bilir. indirecta	7	0.74	0.134	0.355
Fosfatasa alcalina	7	183.29	19.249	50.930
TRANSAMINASAS				
GOT	8	75.75	14.449	40.868
GPT	8	112	24.902	70.435
GGT	7	68.14	36.806	97.379

TABLA 3.59.

Parámetros hematológicos y bioquímicos al finalizar los 6 meses de tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	7	4.89	0.137	0.362
Hemoglobina	7	14.86	0.769	2.035
Acti.Protrombina	7	97.57	2.428	6.4258
Leucocitos	7	6.57	0.879	2.325
Plaquetas	7	166.29	21.224	56.154
Bilir. directa	7	0.21	0.026	0.069
Bilir. indirecta	7	0.6	0.105	0.277
Fosfatasa alcalina	7	171	23.693	62.687
TRANSAMINASAS				
GOT	7	63.14	11.151	29.504
GPT	7	84.57	17.037	45.077
GGT	7	63	21.135	55.917

TABLA 3.60.

Parámetros hematológicos y bioquímicos transcurridos 3 meses de la finalización del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	6	5	0.169	0.415
Hemoglobina	6	14.83	0.872	2.137
Acti.Protrombina	6	96.83	3.166	7.757
Leucocitos	6	6.78	0.587	1.439
Plaquetas	6	178.5	32.061	78.533
Bilir. directa	6	0.35	0.133	0.327
Bilir. indirecta	6	0.78	0.181	0.444
Fosfatasa alcalina	6	153	21.5	52.665
TRANSAMINASAS				
GOT	6	72.17	14.407	35.289
GPT	6	97	15.199	37.234
GGT	5	35.2	13.923	31.132

TABLA 3.61.

Parámetros hematológicos y bioquímicos transcurridos 6 meses de la finalización del tratamiento

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	5	5.03	0.172	0.385
Hemoglobina	5	14.6	0.812	1.816
Acti.Protrombina	5	95.8	4.199	9.391
Leucocitos	5	7.32	0.278	0.622
Plaquetas	5	213.6	26.105	58.372
Bilir. directa	5	0.22	0.037	0.084
Bilir. indirecta	5	0.54	0.081	0.182
Fosfatasa alcalina	5	175.2	27.637	61.799
TRANSAMINASAS				
GOT	5	57.2	6.507	14.549
GPT	5	76.6	13.655	30.533
GGT	5	59.2	37.54	83.942

El estudio estadístico mostró diferencias significativas entre los valores medios basales de la actividad de protrombina y los niveles medios correspondientes a los 3 meses de tratamiento ($p < 0.05$). Para el caso de los leucocitos la diferencia se encuentra en los valores medios correspondientes a 6 meses una vez concluido el tratamiento con respecto a los basales ($p < 0.05$). Para el resto de los parámetros considerados no se han detectado diferencias significativas.

En el estudio comparativo de los niveles de transaminasas del grupo de pacientes tratados con interferón alfa 2b recombinante y el grupo tratado con interferón beta resultó que para el caso de la GOT solo hay diferencias en los niveles correspondientes a los 3 meses de tratamiento ($p < 0.05$), para el caso de la GPT igualmente la diferencia se encuentra en los valores medios correspondientes a los 3 meses de tratamiento ($p < 0.05$), siendo en ambos casos los valores siempre superiores para aquellos enfermos tratados con interferón beta. Las figuras 3.62 y 3.63 muestran esta tendencia.

Figura 3.62.

Evolución de la GOT de pacientes tratados con IFN alfa vs IFN beta

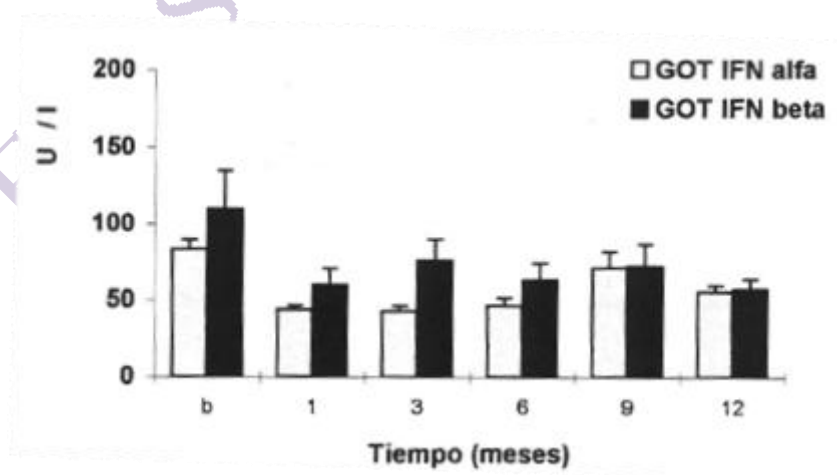
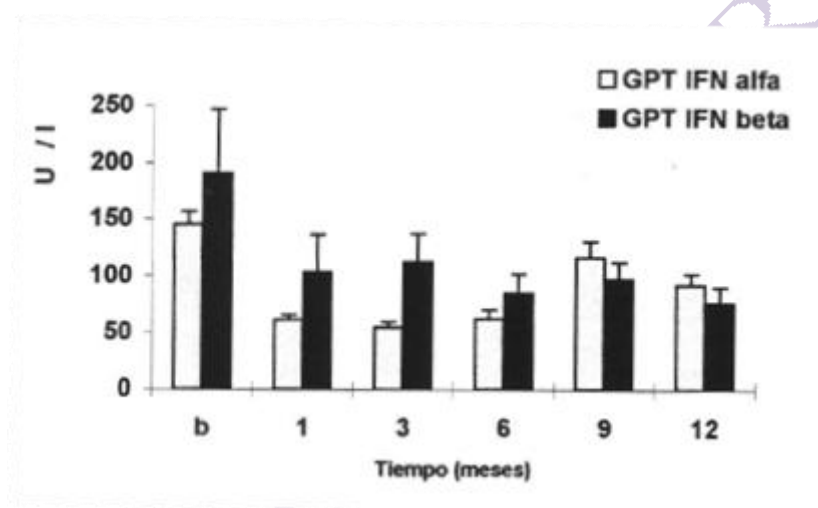


Figura 3.63.

Evolución de la GPT de pacientes tratados con IFN alfa vs IFN beta



3.2.4.5.- Datos de PCR

Las determinaciones de PCR se realizaron sobre muestras de suero y células mononucleares de sangre periférica, previos al tratamiento con INF beta, durante el tratamiento y transcurridos 3 y 6 meses de tratamiento. Los resultados se recogen en la tabla 3.64.

TABLA 3.64.

	<i>n</i>	(+)
SUERO b	7	2 (28)*
CMSPt 3m	1	0
SUERO 3m	6	5 (83)
CMSPt 6m	1	0
SUERO 6m	4	2 (50)
SUERO 9m	4	4 (100)
SUERO 12m	6	5 (83)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes.

En cuanto a los resultados de PCR en suero un 37,5% de los pacientes tratados con interferón beta mantienen positividad durante el tratamiento y a lo largo del seguimiento y un 12.5% mantiene la negatividad. Un 25% evolucionan negativizando la viremia y otro 25% lo hace positivizando a lo largo del seguimiento.

3.2.5.- PACIENTES NO TRATADOS

Se incluye en este apartado a un grupo de pacientes diagnosticados de hepatitis crónica por virus C, siendo todos ellos antiVHC (+) mediante RIBA, los cuales no fueron seleccionados para entrar en el protocolo terapéutico en el momento de la recogida de datos.

La serie consta de 25 pacientes de edades comprendidas entre 20 y 60 años con una media de 44 años, 12 de ellos varones (48%) y 13 mujeres (52%).

Se consideran los mismos parámetros analíticos que en las series anteriores.

3.2.5.1.- Datos epidemiológicos

Se recogieron de las historias clínicas personales de cada paciente. Quedan reflejados en la tabla 3.65.

TABLA 3.65.

	SI	NO	NR ¹
INTER. QUIRUR. PREVIAS	11(46) ²	13 (54)	1
TRANSFUSIONES	7 (29)	17 (71)	1
ADVP³	5 (21)	19 (79)	1
TATUAJES	0	22 (100)	3
HOMOSEXUALIDAD	1 (5)	21 (95)	3
ANTEC. ICTER. O HEPATITIS	11 (46)	13 (54)	1
CONTACTO PROXIMO	4 (18)	18 (82)	3
CONTACTO FAMILIAR	3 (14)	19 (86)	3
ENFER. CONCOMITANTES⁴	5 (20)	20 (80)	0
CONSUMO DE ALCOHOL >20 g/ día⁵	10 (43)	13 (57)	2
TIEMPO DE HIPERTRANSAMINEMIA>3M⁶	9 (56)	7 (44)	9

Códigos: ¹ NR: No recogido en las historias clínicas.

² Entre paréntesis: porcentajes.

³ ADVP: adictos a drogas por vía parenteral; incluidos antecedentes de una sola punción.

⁴ Enfermedades concomitantes: 3 de los pacientes habían sido diagnosticados de nefropatía; 1 de diabetes mellitus y 1 de cardiopatía. Para el resto de los enfermos sus antecedentes carecían de interés.

⁵ Consumo de gramos de alcohol por día: 13 pacientes declaran consumir <20 g/ día, 9 entre 20-100 g/ día y 1 consume >100 g/ día de alcohol.

⁶ Tiempo de hipertransaminemia: para 7 enfermos fue menor de 3 meses y para 9 pacientes superó los 12 meses.

3.2.5.2. Resultados de los marcadores serológicos; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Se consideran idénticos marcadores serológicos que en las series anteriores. Los resultados se recogen en la tabla 3.66.

TABLA 3.66.

Marcadores serológicos

	(+)	(-)
HBs Ag	2 (9)*	20 (91)
Anti HBs	7 (50)	7 (50)
Anti HBc	9 (47)	10 (53)
Anti HBc IgM	3 (43)	4 (57)
HBe Ag	0	6 (100)
Anti HBe	5 (72)	2 (28)
Anti VIH	0	7 (100)
AntiVHC	25 (100)	0
AUTOANTICUERPOS		
Antinucleares	0	12 (100)
Antimúsculo liso	1 (9)	10 (91)
Antimitocondriales	1 (14)	6 (86)
AntiLKM	0	4 (100)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.5.3. - biopsia hepática

A 12 pacientes se les realizó una biopsia hepática en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital. Los resultados del informe anatomopatológico se recogen en la tabla 3.67.

TABLA 3.67.

INFORME HISTOLOGICO	n = 12
NORMAL O LESIONES MINIMAS	0
H.C. PERSISTENTE	1 (8)
H.C. ACTIVA LEVE	4 (34)
H.C. ACTIVA MODERADA	6 (50)
H.C. ACTIVA INTENSA	1 (8)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.5.4.- Resultados de las determinaciones analíticas hematológicas y bioquímicas

Las determinaciones hematológicas y bioquímicas se realizaron a intervalos de tres meses. Los resultados se expresan en las tablas siguientes 3.68. a 3.71, indicándose en cada caso el valor medio (M) y el error estándar (E.E.) y desviación estándar de la media (D.E.).

TABLA 3.68.

Parámetros hematológicos y bioquímicos de la 1ª determinación

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	22	5.21	0.163	0.767
Hemoglobina	22	15.06	0.239	1.125
Acti. Protrombina	22	95.27	1.345	6.311
Leucocitos	22	7.44	0.365	1.713
Plaquetas	22	206.36	10.316	48.383
Bilir. directa	22	0.30	0.047	0.219
Bilir. indirecta	22	0.54	0.049	0.229
Fosfatasa alcalina	22	166.41	10.184	47.765
TRANSAMINASAS				
GOT	23	58.30	10.423	49.927
GPT	23	89.83	20.860	99.924
GGT	22	42.36	7.041	33.023

TABLA 3.69.

Parámetros hematológicos y bioquímicos de la 2ª determinación

	n	MEDIA	E.E.	D.E.
Hematíes	5	5.395.39	0.312	0.698
Hemoglobina	5	14.6	0.510	1.140
Acti.Protrombina	5	95.2	2.437	5.449
Leucocitos	5	7.16	0.889	1.988
Plaquetas	5	210.4	19.198	42.928
Bilir. directa	5	0.24	0.024	0.055
Bilir. indirecta	5	0.58	0.080	0.179
Fosfatasa alcalina	5	150	27.985	62.578
TRANSAMINASAS				
GOT	5	57.2	17.627	39.417
GPT	5	76.4	23.366	52.248
GGT	5	26.2	5.535	12.378

TABLA 3.70.

Parámetros hematológicos y bioquímicos de la 3ª determinación

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	2	4.8	0	0
Hemoglobina	2	15	0	0
Acti.Protrombina	2	95.5	4.501	6.364
Leucocitos	2	6.65	0.949	1.343
Plaquetas	2	209	17.002	24.041
Bilir. directa	2	0.2	0.099	0.141
Bilir. indirecta	2	0.5	0.099	0.141
Fosfatasa alcalina	2	197.5	35.505	50.204
TRANSAMINASAS				
GOT	2	34.5	16.502	23.334
GPT	2	61	51.007	72.125
GGT	2	58.5	45.507	64.347

TABLA 3.71.

Parámetros hematológicos y bioquímicos de la 4ª determinación

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	2	5	0.200	0.283
Hemoglobina	2	16	1.000	1.414
Acti.Protrombina	2	95	5.001	7.071
Leucocitos	2	7.65	0.149	0.212
Plaquetas	2	260	48.007	67.882
Bilir. directa	2	0.2	0.099	0.141
Bilir. indirecta	2	0.6	0.200	0.283
Fosfatasa alcalina	2	187	50.008	70.711
TRANSAMINASAS				
GOT	2	36	19.003	26.870
GPT	2	54	41.006	57.983
GGT	2	23.5	8.501	12.021

En este grupo el estudio estadístico solo detectó diferencias en los valores medios correspondientes a los hematíes de la tercera determinación con respecto de la primera. En el respto de los parámetros estudiados no hubo diferencias significativas en los valores medios analizados.

En cuanto al estudio comparativo entre los parámetros bioquímicos correspondientes a este grupo con el grupo de enfermos tratados con interferón alfa 2b recombinante durante 6 meses las diferencias estadísticamente significativas corresponden para el caso de la GOT para los valores basales ($p<0.05$), para el caso de la GPT igualmente para los valores basales ($p<0.05$) y para el caso de la GGT para los valores tomados en la segunda determinación ($p<0.02$).

3.2.5.5.- Datos de PCR

Las determinaciones de PCR se realizaron sobre muestras de suero, células mononucleares de sangre periférica y subpoblaciones linfocitarias CD14+, CD19+, CD8+ y CD4+, en idénticos intervalos que las determinaciones anteriores de los parámetros hematológicos y bioquímicos. Los resultados se recogen en las tablas 3.72. y 3.73.

TABLA 3.72.

	<i>n</i>	(+)
CMSPt 1^a	14	10 (72)*
CD14+ 1^a	9	6 (67)
CD19+ 1^a	9	8 (89)
CD8+ 1^a	9	1 (11)
CD4+ 1^a	9	1 (11)
SUERO 1^a	25	8 (32)

TABLA 3.73.

	<i>n</i>	(+)
CMSPt 2^a	2	2 (100)
SUERO 2^a	8	4 (50)
CMSPt 3^a	1	1 (100)
SUERO 3^a	2	0
SUERO 4^a	2	1 (50)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes.

3.2.6.- PACIENTES NO VHC

En este apartado se incluyen 12 pacientes de edades comprendidas entre 17 y 60 años con una media de 39 años, 6 de ellos varones (50%) y 6 mujeres (50%); no incluidos en el protocolo terapéutico por ser todos ellos antiVHC(-) mediante RIBA.

Se les consideraron los mismos parámetros analíticos valorados para los enfermos de los apartados anteriores, existiendo sólo una determinación de valores hematológicos y bioquímicos.

3.2.6.1.- Datos epidemiológicos

Se recopilaron a través de las historias clínicas correspondientes a cada paciente. Quedan reflejados en la tabla 3.74.

TABLA 3.74.

	SI	NO	NR ¹
INTER. QUIRUR. PREVIAS	1 (8) ²	11 (92)	0
TRANSFUSIONES	0	10 (100)	2
ADVP ³	0	10 (100)	2
TATUAJES	0	10 (100)	2
HOMOSEXUALIDAD	0	10 (100)	2
ANTEC. ICTER. O HEPATITIS	1 (10)	9 (90)	2
CONTACTO PROXIMO	0	10 (100)	2
CONTACTO FAMILIAR	4 (40)	6 (60)	2
ENFER. CONCOMITANTES ⁴	1 (8)	11 (92)	0
CONSUMO DE ALCOHOL >20 g/ día ⁵	2 (25)	6 (75)	4
TIEMPO DE HIPERTRANSAMINEMIA>3M ⁶	5 (83)	1 (17)	6

Códigos: ¹ NR: No recogido en las historias clínicas.

² Entre paréntesis: porcentajes.

³ ADVP: adictos a drogas por vía parenteral; incluidos antecedentes de una sola punción.

⁴ Enfermedades concomitantes: 1 de los pacientes había sido diagnosticado de hepatopatía. Para el resto de los enfermos sus antecedentes carecían de interés.

⁵ Consumo de gramos de alcohol por día: 6 pacientes declaran consumir <20 g/ día, 1 entre 20-100 g/ día y 1 consume >100 g/ día de alcohol.

⁶ Tiempo de hipertransaminemia: para 1 enfermo fue menor de 3 meses, para 2 osciló entre 3 - 12 meses y para 3 pacientes superó los 12 meses.

TESIS DOCTORAL

3.2.6.2.- Resultados de los marcadores serológicos

Se consideran los mismos marcadores serológicos que en las series anteriores. Los resultados se expresan en la tabla 3.75.

TABLA 3.75.

Marcadores serológicos

	(+)	(-)
HBs Ag	5 (45)*	6 (55)
Anti HBs	0	4 (100)
Anti HBc	6 (67)	3 (33)
Anti HBc IgM	2 (40)	3 (60)
HBe Ag	2 (40)	3 (60)
Anti HBe	4 (67)	2 (33)
Anti VIH	0	2 (100)
AntiVHC	0	12 (100)
AUTOANTICUERPOS		
Antinucleares	1 (33)	2 (67)
Antimúsculo liso	0	3 (100)
Antimitocondriales	1 (50)	1 (50)
AntiLKM	1 (50)	1 (50)

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.6.3.- biopsia hepática

A 4 pacientes se les realizó una biopsia hepática en el Servicio de Anatomía patológica del Hospital Clínico. Los resultados se recogen en la tabla 3.76.

TABLA 3.76.

INFORME HISTOLOGICO	n = 4
NORMAL O LESIONES MINIMAS	1 (25)
H.C. PERSISTENTE	0
H.C. ACTIVA LEVE	1 (25)
H.C. ACTIVA MODERADA	2 (50)
H.C. ACTIVA INTENSA	0

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes

3.2.6.4.- Resultados de los parámetros analíticos hematológicos y bioquímicos analizados

Solo existe una determinación en el tiempo. Los resultados quedan reflejados en la tabla 3.77, indicándose en cada caso el valor medio (M), y el error estándar (E.E.) y desviación estándar de la media (D.E.).

TABLA 3.77.

	<i>n</i>	<i>MEDIA</i>	<i>E.E.</i>	<i>D.E.</i>
Hematíes	11	5.10	0.228	0.756
Hemoglobina	11	14.81	0.348	1.155
Acti. Protrombina	11	99.182	0.818	2.714
Leucocitos	11	6.404	0.145	1.481
Plaquetas	10	184.1	17.876	56.526
Bilir. directa	10	0.15	0.022	0.071
Bilir. indirecta	9	0.34	0.053	0.159
Fosfatasa alcalina	10	174.6	11.883	37.577
TRANSAMINASAS				
GOT	11	47.454	9.307	30.872
GPT	11	68.545	17.769	58.945
GGT	9	89.889	31.064	93.193

Comparando los parámetros hematológicos y bioquímicos de este grupo de pacientes no VHC con los del grupo de enfermos tratados con interferón alfa 2b recombinante y tomando como referencia la determinación basal, el estudio estadístico obtuvo diferencias significativas en los valores de la actividad de protrombina ($p<0.001$), Bilirrubina directa ($p<0.001$), bilirrubina indirecta ($p<0.001$), GOT ($p<0.01$) y GPT ($p<0.001$).

Considerando que 2 pacientes de este grupo dieron como negativo el tes anti VHC y resultaron PCR positivo en suero, al efectuar su estudio estadístico se encuentra que no existen diferencias significativas en los parámetros analizados.

3.2.6.5.- Resultados de PCR

Las determinaciones de PCR se realizaron sobre muestras de suero y células mononucleares de sangre periférica. Los resultados se recogen en la tabla 3.78.

TABLA 3.78.

	<i>n</i>	(+)
SUERO	12	2 (17)
CMSPt	1	0

Códigos: * Entre paréntesis: porcentajes.

TESIS DOCTORAL

4.- DISCUSIÓN

4.- DISCUSIÓN

El diagnóstico de la hepatitis viral aguda suele establecerse, fundamentalmente, por criterios clínicos. La presencia de los síntomas más característicos, aunque sean frecuentes las formas asintomáticas, y la constatación analítica de los valores de transaminasas séricas (GOT/GPT) elevadas, conducen el diagnóstico de sospecha de hepatitis viral aguda una vez descartadas las causas no virales como son alcohol y hepatitis tóxicas por medicamentos.

El diagnóstico preciso de hepatitis por virus C exige, además, la determinación de la **serología viral**. Así, por un lado, se determinarán de forma rutinaria los marcadores serológicos IgM-antiVHA, HBsAg, IgM-HBcAc y anti-VHD que permiten descartar la implicación de estos otros virus en el cuadro infeccioso; por otro lado, se constatarán analíticamente los marcadores serológicos del virus de la hepatitis C, fundamentalmente la presencia de anticuerpos antiVHC detectados por la técnica de RIBA.

A pesar de todo, la infección aguda por virus C es un diagnóstico complicado dado que el marcador antiVHC es de aparición tardía (Bruguera M, y cols, 1993). Por esta razón se han buscado nuevos marcadores de la enfermedad y se han desarrollado técnicas como la detección del virus mediante PCR para el diagnóstico de hepatitis C poco evolucionadas o de muy reciente instauración. Además, se ha hecho necesario el desarrollo de diferentes marcadores séricos y hepáticos que proporcionen información sobre la infectividad o el estado replicativo del virus.

El **antígeno del virus C** se encuentra en la nucleocápside viral y su detección en suero ocurre en más del 80% de los casos de hepatitis, existiendo una buena correlación entre los niveles de antígeno medido y la presencia del

genoma viral en suero o nivel de viremia (Artini y cols, 1991). Además de en suero es posible detectar el VHCAg en biopsias hepáticas, tanto fijadas como congeladas, localizándose los Ag VHC exclusivamente en el citoplasma de los hepatocitos (Hosoda K, y cols, 1991).

La presencia en suero de **IgM sérica frente al VHC** se correlaciona de forma positiva con el antígeno C100-3 y con la actividad de la enfermedad en hígado. La persistencia de los anticuerpos IgM antiVHC después de la infección aguda es indicativa de la evolución a la cronicidad y se podría utilizar como un marcador precoz para identificar los pacientes más adecuados a un tratamiento antivírico (Kikuchi T, y cols, 1993).

La hepatitis viral cronicada rara vez presenta una sintomatología clínica manifiesta y, en caso de hacerlo, ésta es inespecífica. La discreta elevación de transaminasas orienta el diagnóstico, pero las cifras de transaminasas son muy variables y rara vez alcanzan valores 10 veces superiores a la normalidad, no teniendo valor indicativo de gravedad del daño hepático.

En cuanto a los parámetros hematológicos y bioquímicos pueden no demostrar la afectación hepatocelular y mantenerse dentro de la normalidad. Por otra parte, la fosfatasa alcalina y la GGT pueden o no estar alteradas y rara vez existe hiperbilirrubinemia.

La **biopsia hepática** en último lugar confirmará la hepatitis crónica, su actividad y su patrón histológico predominante.

Todas estas pruebas diagnósticas ayudarán, en definitiva, a la instauración del tratamiento adecuado y su monitorización objetiva.

La dificultad diagnóstica de la hepatitis viral es aún más complicada en aquellos casos en que se debe tomar una decisión ante un test antiVHC positivo en un paciente sin evidencia clínica de enfermedad hepática y con transaminasas normales. Podría tratarse de un portador crónico asintomático o de un falso positivo. La distinción entre uno y otro caso no es sencilla. Se hace necesario investigar cada caso de forma individualizada y hacer un seguimiento prolongado con controles bioquímicos repetidos, antiVHC y transaminasas.

De nuevo, ante una situación de dificultad diagnóstica clara la técnica de

PCR parece ser de gran utilidad, ya que este test es indicativo de la presencia real del virus.

Detección del genoma viral del VHC. Diagnóstico por PCR

El virus C de la hepatitis se encuentra a muy baja concentración tanto en el suero como en los tejidos infectados de los pacientes afectados de hepatitis por VHC; por esta razón se ha hecho necesario el desarrollo de pruebas diagnósticas que proporcionen información precisa sobre la infectividad del virus y su estado replicativo. Con este fin la aplicación de la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha hecho con gran acierto.

En la actualidad, el RNA que se detecta mediante esta prueba es el marcador más sensible para el diagnóstico de la hepatitis por el virus C. Además, es el más precoz ya que es el que antes se positiviza. Así, es posible detectar el RNA-VHC en pacientes a los que se les transfunde sangre infectada tan solo a 1 a 4 semanas después de la transfusión, indicativo de la replicación viral en el paciente recién infectado (Laguna del Estal P, 1993).

En este trabajo se ha optimizado la técnica de PCR efectuándose modificaciones en la metodología y ajustando volúmenes y tiempos de desnaturalización y de amplificación a un protocolo técnico sencillo y reproducible. Las variaciones más significativas han quedado relacionadas en el apartado de Material y Métodos.

La técnica de PCR consiste en la amplificación exponencial mediante métodos enzimáticos de segmentos específicos de DNA "in vitro"; el resultado son numerosas copias de la diana de DNA, incluso a partir de una sola unidad de molde. El método se basa en la repetición cíclica de tres reacciones similares, modificando exclusivamente la temperatura y tiempos a las que se llevan a cabo.

Las primeras aplicaciones de la técnica de PCR en pacientes antiVHC positivos detectaban el genoma viral entre el 40-80% de los caso (Kawasaki ES, 1989; Kaneko S, 1990). Los resultados obtenidos por diferentes autores eran muy dispares debido, principalmente, a la elevada heterogeneidad viral. La utilización

de “primers” o cebadores de diferentes regiones genómicas, los volúmenes de muestra variables utilizados y así como la variabilidad en la técnica de extracción de ácidos nucleicos, justifican tales desigualdades.

Hoy día es sabido que la amplificación es específica y es función de los **oligonucleótidos o primers** empleados, que reconocen los extremos del fragmento a amplificar y actúan como cebadores de la reacción. Los “primers” usados en este trabajo son secuencias conocidas de 30 bases, de cadena simple, correspondientes a la zona 5' no codificante del genoma. Tales secuencias son complementarias de las del DNA diana, reconociendo los fragmentos del extremo a amplificar y actuando tras su hibridación al DNA.

La inconstancia de la secuencia de nucleótidos de algunas regiones hipervariables del genoma viral del VHC puede hacer ineficaz el intento de detectar RNA vírico en el suero de los pacientes afectados. Por este motivo en este trabajo se optó por la detección del RNA-VHC mediante de la amplificación de secuencias pertenecientes a la región 5' terminal no codificante cuya secuencia de nucleótidos es la más constante y conservada en todos los VHC aislados (Takehasa T, 1992). El uso de cebadores localizados en esta región para realizar la PCR ha aumentado significativamente el porcentaje de detección del RNA-VHC en suero (hasta un 90%) en pacientes con hepatitis crónica por virus C (Buch J, 1992).

En el trabajo que nos ocupa, la totalidad de los pacientes que presentaron títulos de anti VHC positivo resultaron ser también positivos en el test PCR. El porcentaje de detección del virus en muestras de suero ha alcanzado en nuestra serie el 100% de los casos. Por otra parte, la probabilidad de que la enfermedad esté presente cuando el test es positivo alcanza un valor superior al 98%. En definitiva, nuestro trabajo ha servido para confirmar la seguridad diagnóstica (SG) de esta metodología molecular, al alcanzar valores del 98,6%.

Por otra parte, en este trabajo se ha optado por la PCR tipo “nested” que supone la adopción de una estrategia anticontaminación pues aumenta la sensibilidad y especificidad obviando la posibilidad de falsos positivos (Quirke P, 1992). Para ello se ha sometido el amplificado previo a una amplificación posterior

con una pareja de “primers” internos que amplifican fragmentos ya amplificados previamente. Los “primers” internos elegidos tienen una longitud de 30 bases y codifican una región del DNA transcrito consecutivo al punto de inserción de los “primers” iniciales. La adopción de esta técnica supone la imposibilidad de replicar secuencias de DNA no amplificadas previamente.

Por último, los productos obtenidos en la amplificación final se han analizado mediante la visualización del producto por electroforesis en geles de agarosa. La ayuda del programa de análisis de imagen y el uso de un analizador ha supuesto otra mejora en esta fase de la técnica de PCR.

La precisión, reproductibilidad y la fiabilidad en la detección del RNA-VHC mediante la reacción en cadena de la polimerasa se ha estudiado mediante diversos tests de variación intraensayo, interensayo y límite de dilución. Los resultados experimentales han permitido definir la buena repetitividad del test y han servido para establecer los controles internos necesarios para la detección tanto de falsos positivos como de falsos negativos.

Presencia del genoma viral en suero y población linfoide total

La demostración de la presencia del virus en la fracción no celular de la sangre se puede asociar al diagnóstico de certeza de la enfermedad, pero lo cierto es que el resultado negativo de tal test no lleva implícito la ausencia del cuadro infeccioso. Gran parte de este trabajo ha estado dedicada a la puesta a punto y posterior aplicación de la técnica de determinación del virus a muestras de células sanguíneas. Es importante tener en cuenta que en el curso del proceso patogénico de la hepatitis C y su cronificación pueden alternarse fases de viremia importante con otras en las que el número de virus circulantes es muy escaso o nulo y por tanto no cuantificable. El reservorio para el virus en tal situación pudiera ser el tejido hepático o las células sanguíneas (Zignego AL, y cols, 1992).

Junto a un posible hepatotropismo directo, el virus de la hepatitis C tiene una marcada afinidad por la colonización de los linfocitos, de tal manera que es frecuente encontrarlo infectando células mononucleares, monocitos y macrófagos,

así como linfocitos B y T (Zignego AL, y cols, 1992; Artini M, y cols, 1992; Bouffard P, y cols, 1992; Muller HM, y cols, 1993).

Sin embargo no está demostrado que los linfocitos infectados liberan partículas virales a sangre periférica (Bartolomé J. 1993b), aunque esta localización intracelular podría ser utilizada por el virus para escapar a la destrucción por el sistema inmune y contribuir a la cronificación de la infección viral. En definitiva, no está aclarado si la colonización de estas células es un reflejo de la fagocitosis del virus circulante o significa una infección real de esta subpoblación celular.

En el presente trabajo se ha tenido la oportunidad de estudiar la presencia del virus en células sanguíneas, para lo cual se ha desarrollado un protocolo experimental en el que se ha investigado la existencia de genoma viral amplificable tanto procedente de la población total como de las subpoblaciones linfocitarias.

La técnica de separación de tales subpoblaciones, efectuada con anterioridad al proceso de extracción del genoma viral, fue establecida en un riguroso orden de actuación con objeto de evitar la contaminación de fracciones celulares con linfocitos procedentes de otras subpoblaciones. El análisis de los resultados obtenidos sobre nuestra serie de 54 pacientes diagnosticados de hepatitis C, encontró una buena concordancia entre los resultados del test de PCR aplicado a células totales y a muestras de suero en un porcentaje que alcanzó la mitad de los casos (46%).

Más interesante aún resultó el análisis de aquellos casos en los que tal concordancia no fue puesta de manifiesto. Así, un grupo no despreciable de pacientes en los que no se pudo detectar el virus circulante libremente en sangre mostraron tener copias del genoma viral en las células linfocitarias. Esta situación se dio en el 41% de los pacientes, porcentaje muy alto que obliga a tomar con precaución cualquier resultado de PCR diagnóstica que se limite a la detección viral en suero.

La presencia del virus de la hepatitis C en células mononucleares de sangre periférica no es un hallazgo exclusivo del presente trabajo experimental.

Publicaciones previas han demostrado que tanto la cadena genómica como la antígenica, indicativa esta última del estado replicativo viral, pueden ser demostradas en células sanguíneas (Zignego AL, y cols, 1992; Bouffard P, y cols, 1992). El virus se ha detectado tanto en monocitos y macrófagos (Bouffard P, y cols, 1992) como en linfocitos B y T (Artini M, y cols, 1992; Ahmed R, y cols, 1992).

Presencia del genoma viral VHC en subpoblaciones linfocitarias CD14, CD19, CD8 y CD4

En un estudio complementario llevado a cabo con las mismas muestras sanguíneas, se analizó la distribución del virus en las subpoblaciones celulares en aquellos pacientes en los que el test PCR aplicado a la totalidad de la muestra sanguínea celular había resulta positivo. La fracción celular CD19 fue la que más frecuentemente presentó positividad en el test, ya fuera de forma exclusiva (42%) o con otras localizaciones subcelulares acompañantes (87%).

Por otra parte, en tan solo un 13% de los pacientes el resultado del test de PCR aplicado a células dio un resultado negativo siendo el virus detectable mediante esta técnica cuando se aplicó a una muestra de suero tomada en el mismo acto diagnóstico.

Se ha cuidado especialmente en el presente trabajo el desarrollo de un procedimiento experimental que evitara la contaminación de la fracción celular sanguínea por virus circulantes en sangre. El virus puede adherirse a la membrana celular y ser arrastrado en la separación de las subpoblaciones linfocitarias, por lo que se ha prestado especial atención al lavado intenso de las fracciones celulares en ficoll. Las conclusiones del análisis de los resultados precedentes no pueden ser establecidas en toda su extensión si no se considera el momento preciso en que se lleva a cabo la extracción sanguínea a los pacientes. En la serie considerada, algunas determinaciones analíticas se han hecho dentro del seguimiento de un protocolo terapéutico de hepatitis C, por lo que la negativización de la viremia pudiera ser consecuencia del acto terapéutico.

En los apartados siguientes se considerará cada uno de los casos de forma individualizada, de tal manera que se podrá ofrecer una explicación a tales discrepancias. No obstante, la presentación de la falta de correlación entre los resultados de la técnica aplicada a suero y a sangre periférica no pierde valor. Es más, se convierte en un importante indicador de la ausencia de respuesta al tratamiento y posible marcador de persistencia y recidiva de la enfermedad.

Debido a la alta incidencia y prevalencia en nuestro medio de la enfermedad infecciosa objeto de este trabajo hemos tratado de definir los beneficios que esta prueba diagnóstica aportará al paciente. Para que se acepte la PCR como método rutinario en la protocolización de pacientes con sospecha de hepatitis viral se requiere que los trabajos comparativos demuestren la posición de este test dentro del conjunto de pruebas diagnósticas a las que se somete el paciente.

Todo esto permitirá definir la correcta utilización de esta técnica y su consideración como prueba complementaria o confirmatoria para casos de resultados ambiguos o la decisión de su elección diagnóstica de primer orden.

El test PCR en el protocolo terapéutico de la hepatitis C.

Uno de los objetivos del presente trabajo era el definir la forma, lugar y secuencia temporal de utilización del test de determinación del virus de la hepatitis C por PCR en el curso de la enfermedad hepática. Para ello, y después de haber puesto a punto una técnica sencilla, sensible y reproducible, hemos aplicado el test a los pacientes incluidos en un protocolo terapéutico basado en el uso del IFN-alfa 2b recombinante.

La serie completa de pacientes incluidos en este estudio se compone de varios grupos de enfermos con un diagnóstico común de hepatitis (137 pacientes). El grupo principal está compuesto por 105 pacientes que de acuerdo con los criterios de inclusión previamente definidos (ver apartado correspondiente de Pacientes, Material y Métodos) fueron seleccionados para el tratamiento con interferón. La mayoría de ellos (86%) fueron sometidos al tratamiento con

interferón alfa 2b durante seis meses, aunque se produjeron 6 suspensiones del tratamiento a los cuatro meses de haberlo instaurado.

Otro pequeño grupo de tan solo 8 pacientes fue tratado durante seis meses con interferón beta. Aunque no se trata de un número significativo de pacientes que pudiera ser evaluado conjuntamente con las respuestas del grupo mayoritario, lo cierto es que de su seguimiento se pueden obtener conclusiones provisionales de gran utilidad.

Dentro de la serie se incluye también un subgrupo de 25 pacientes, igualmente con el diagnóstico de hepatitis C, que no fueron tratados con interferón. Los datos analíticos obtenidos en el seguimiento clínico de estos pacientes nos han servido para efectuar un análisis comparativo entre el curso "espontáneo" de la enfermedad y la evolución observada en aquellos pacientes tratados.

Por último, el número total de pacientes de la serie se completa con la observación clínica y analítica y el seguimiento durante todo el periodo de protocolización, de 12 pacientes en los cuales el diagnóstico de hepatitis C resultó negativo en el test RIBA.

Los parámetros clínicos, incluida la epidemiología, las determinaciones bioquímicas y hematológicas, así como los marcadores de hepatitis se han recogido para cada uno de los pacientes durante un periodo medio de doce meses, aunque en muchos de los casos los periodos de observación se han prolongado hasta los 24 meses.

El análisis detallado de los resultados presentados en este trabajo nos ha permitido concluir que "a priori" no hay diferencias en la presentación de la enfermedad entre los diferentes grupos de pacientes que comprenden la totalidad de la serie. Tampoco las hay entre los parámetros bioquímicos y hematológicos. Esto significa que la serie es homogénea y que la aleatorización es efectiva y por tanto lo podrán ser las diferencias encontradas entre unos pacientes y otros, dependientes de las medidas terapéuticas efectuadas.

De hecho los parámetros recogidos en las historias clínicas que pudieran informar sobre la forma de contagio de la enfermedad y vías de entrada del virus,

parecen coincidir en todos los subgrupos considerados: predominio de las intervenciones quirúrgicas previas (aproximadamente un 50% de los pacientes) y la existencia de transfusión sanguínea en unos porcentajes muy significativos (aproximadamente un 25% de los pacientes).

Estos datos parecen confirmar las observaciones previas, en más de la mitad de los casos no es posible identificar una vía parenteral para el contagio de la enfermedad (Sánchez-Tapias JM, 1992).

En lo que respecta a la enfermedad hepática y causas desencadenantes los datos recogidos en la anamnesis e historia clínica, lo único relevante es junto al largo periodo de transaminasemia, previa al diagnóstico de la enfermedad, la alta frecuencia de pacientes con un importante consumo de alcohol (>20 g/día en el 52% de los pacientes). Ello puede hacer que el proceso sea más grave e intratable (Pares A, y cols, 1996; Brillante S, y cols, 1991; Sukri I, 1997).

Como ha quedado recogido en la sección correspondiente de Resultados y previamente explicitado en la Introducción de este trabajo, la alteración bioquímica fundamental en el curso de la hepatitis por virus C es el aumento moderado de las transaminasas. Es, además, éste el mejor marcador bioquímico para establecer el seguimiento de los pacientes sometidos estudio, ya que sus variaciones, normalización y elevación, son consideradas unos excelentes índices de respuesta y de evolución de la enfermedad.

Los valores basales medios de GOT y GPT para los subgrupos de pacientes protocolizados en el tratamiento con interferón alfa y beta, incluidos aquellos que abandonaron el tratamiento con interferón alfa a los cuatro meses de ser instaurado, no son significativamente diferentes. Por otra parte, la elevación de estos niveles basales respecto a la normalidad es demasiado moderada, situándose en valores medios que no cuadriplican el valor de la normalidad y un mayor predominio en la elevación de GPT (Media GPT $\pm$ EE = 145.32 $\pm$ 11.32 UI/l).

Se asume que la elevación de los niveles de las transaminasas es un reflejo de la lesión irreversible de los hepatocitos y su liberación al torrente circulatorio, no obstante la destrucción de otros tipos celulares también puede

causar la elevación de forma más o menos masiva. Por otra parte, no se puede encontrar una relación exacta entre los niveles de enzimas circulantes y el grado de necrosis o la gravedad de la hepatitis. Por estas razones, si bien la monitorización del paciente afecto de hepatitis C crónica mediante la medida seriada de las transaminasas es un proceso económico y eficaz, lo cierto es que otros marcadores más específicos y de fácil obtención deberían utilizarse en la clínica habitual.

En lo que respecta a los enzimas del árbol biliar hemos encontrado una elevación significativa y constante de la GGT ($\text{Media} \pm \text{EE} = 55.13 \pm 5.21 \text{ UI/l}$) y de la fosfatasa alcalina ($M \pm \text{EE} = 177.65 \pm 5.11 \text{ UI/l}$), mientras que la bilirrubinemia se encuentra en la mayoría de los casos dentro de la normalidad.

La evolución en el tiempo de los parámetros bioquímicos se hace de forma lenta y progresiva como reflejo del paso hacia la cronicidad y la degeneración cirrótica del hígado. Es sabido que los niveles de transaminasas muestran un curso fluctuante a lo largo de muchos años, con fases de mayor elevación y periodos de aparente normalización (Sánchez-Tapias JM, 1992). De hecho en nuestra serie, aquellos pacientes afectados de hepatitis C y no tratados se observa una variación temporal de los niveles de los enzimas hepáticos circulantes que no hacen sino aumentar la dispersión de los valores medios.

En el caso concreto de los pacientes afectados de VHC y protocolizados en este trabajo dentro de un régimen terapéutico específico, las variaciones en los niveles séricos de las transaminasas circulantes han servido tanto para efectuar el seguimiento adecuado de la enfermedad como para evaluar la respuesta al tratamiento.

En el tratamiento de la hepatitis crónica por virus C se han ensayado fármacos antivíricos, inmunomoduladores y modificadores de la respuesta biológica del tipo del interferón. Este último, constituye en realidad un grupo de sustancias de naturaleza proteica y glicoproteica formadas en los vertebrados superiores por inducción específica (Isaacs A, y col, 1957). Aunque se destaca en ellos un importante papel antivírico, presenta una amplia variedad de actividades biológicas: efecto antiproliferativo, inhibición de la expresión oncogénica,

regresión fenotípica, inmunomodulación y efecto sobre la diferenciación celular, en parte justificados por la existencia de varios tipos de interferón (Staehele P, 1990; Bartolomé J, 1995).

En principio fue el interferón alfa el primero en utilizarse en el tratamiento de las hepatitis noA-noB, obteniéndose efectos favorables en al menos la mitad de los pacientes tratados (Hoofnagle, 1986). Estudios posteriores confirmaron que alrededor de un 40-60% de los pacientes normalizan los niveles séricos de transaminasas tras un periodo de tratamiento de 6-12 meses, considerándose ésta como una respuesta completa. Desafortunadamente la mitad de los pacientes respondedores vuelven a presentar citolisis al suspender el tratamiento, sin que se pueda prever tal circunstancia (Malaguarnera M, y cols, 1995).

Las indicaciones terapéuticas del interferón beta incluyen, al igual que ocurre para el interferón alfa, el tratamiento de la hepatitis C, aunque es presumible una forma diferente de actuación para ambos compuestos. Es evidente que las diferencias en su estructura molecular, origen y biodistribución condicionarán mecanismos de respuesta orgánica, celular y molecular diferentes.

El subgrupo mayoritario de nuestro estudio lo constituyen los pacientes sometidos a tratamiento con interferón alfa 2b durante seis meses. La monitorización bioquímica y hematológica se llevó a cabo mediante las determinaciones seriadas de los mismos parámetros que se describieron previamente para el diagnóstico basal. La evolución en el tiempo de tales parámetros nos ha servido para evaluar la respuesta al tratamiento.

Se comenzó estableciendo el criterio de respondedores para aquellos pacientes en los que se observó en el curso del tratamiento, con criterio amplio, una caída significativa en los valores basales de GPT y GOT. Este fenómeno fue visible en casi el 90% de los pacientes, en los que además otros criterios clínicos confirmaron la observación analítica.

En una fracción (10%) del grupo de pacientes sometidos a tratamiento la respuesta esperada no se observó, ni aun tras seis meses de tratamiento sostenido, de tal manera que siguiendo criterios analíticos y bioquímicos fueron clasificados como no respondedores. La medida de las transaminasas séricas

mostró, en este grupo de pacientes, una caída significativa entre los valores basales y los observados en las determinaciones analíticas efectuadas durante el tratamiento. Sin embargo, esta caída no fue suficiente como para llegar a la normalización de los valores de las transaminasas.

Es necesario hacer notar que un número muy reducido de pacientes (6) experimentaron un agravamiento en el curso del tratamiento y que por esta razón el protocolo terapéutico fue suspendido a los cuatro meses de haberse instaurado.

Como se ha indicado, la medida sérica de las transaminasas GOT y GPT y de la enzima GGT, reflejó el curso de la enfermedad de manera que en la totalidad de los pacientes los valores basales cayeron significativamente a partir del mes de instaurado el tratamiento. El descenso en los valores enzimáticos se mantuvo durante el tiempo que duró el tratamiento pero una vez suspendido éste se produjo un efecto rebote con el ascenso de los niveles de los enzimas a valores similares a los basales. Sin embargo, cuando esta serie general de pacientes se divide en los grupos de buena respuesta y no respuesta al tratamiento, la evolución de los niveles de las transaminasas identifica a aquellos que responden al tratamiento no solo por la caída y normalización de los niveles de enzimas circulantes sino también por la duración de la respuesta. Mientras que los primeros expresan unos niveles séricos normalizados y significativamente diferentes de los basales a los tres meses de suspendido el tratamiento, los no respondedores muestran un acusado efecto rebote.

En general, se habla de una respuesta completa y sostenida cuando una vez cesado el tratamiento se observa un mantenimiento de los niveles normales de las transaminasas, fundamentalmente la GPT. La tasa de respuesta es variable según las series y se mueve en el rango del 38 al 68%. En nuestro caso, la tasa de respuesta completa alcanzó la cifra del 57%, aunque para que se de esta condición haya que obviar el efecto rebote inmediato a la suspensión del tratamiento, que posteriormente vuelve a normalizarse.

Es sabido que la respuesta completa necesita de, al menos, periodos de tratamiento de seis meses, el tiempo de tratamiento elegido en este trabajo (Hoofnagle y cols, 1986).. Y por otra parte, se ha descrito que la ganancia de

respuestas no es significativa si se prolonga el periodo de tratamiento durante un tiempo mayor, aunque los pacientes con respuesta transitoria se benefician de una prolongación de la terapia por un periodo de tiempo superior (12 meses) (Sáez- Royuela F, y cols, 1991). Nuestros propios resultados experimentales parecen confirmar este hecho ya que se ha observado una respuesta excelente en un paciente en que el tiempo de tratamiento se extendió durante un período de 12 meses. Por último, es necesario comentar que la dosis de interferón alfa 2b que se administró al paciente en el protocolo terapéutico (3 MU, por vía IM, tres veces en semana) parece ser la adecuada sin que se haya descrito mayor beneficio del aumento de ésta o de una diferente secuenciación temporal (Lindsay KL, y cols, 1993).

Una observación interesante de nuestro trabajo en lo referente a la evolución de los parámetros hematológicos durante el curso del tratamiento es la evolución de los niveles de células sanguíneas durante el curso del tratamiento. El tratamiento con interferón alfa 2b se acompañó de una caída importante y significativa en los valores de hematíes y hemoglobina, glóbulos blancos y plaquetas. Este fenómeno de anemia, plaquetopenia y leucopenia ha sido descrito con anterioridad y se ha atribuido a la moderada supresión medular que provoca el interferón (Renault PR, y cols, 1989; Ernstoff MS, y cols, 1984; Hoofnagle JH, y cols, 1991). Se ha indicado que el fenómeno es reversible y nuestros resultados parecen confirmarlo ya que tan solo se mantuvieron descendidos durante el tiempo de tratamiento, volviéndose a valores pretratamiento de forma rápida, una vez suspendido éste.

La determinación de forma seriada del virus circulante durante el curso del tratamiento y una vez finalizado, ha servido para evaluar la utilidad del test PCR en el diagnóstico y seguimiento evolutivo de los pacientes sometidos a tratamiento con interferón alfa 2b. Como se ha mostrado en la sección de Resultados la instauración del tratamiento condujo a una caída significativa en el número de tests positivos, mientras que la suspensión de éste trajo consigo la elevación del número de casos de viremia detectable alcanzándose valores superiores a los basales (basal = 36%, fin del tratamiento = 25%, seis meses finalizado éste =

43%).

Hay estudios que sugieren que los pacientes que negativizan la viremia en el test PCR al cabo del mes de tratamiento son aquellos que van a tener una respuesta completa y mantenida al finalizar dicho tratamiento (Shindo y cols, 1992). En nuestra serie es interesante resaltar el hecho de que en el grupo de pacientes en que ocurrió la negativización del test PCR se observó una caída significativa en los niveles de transaminasas circulantes. Por el contrario en el grupo de pacientes que no negativizaron el test PCR mostraron una continuidad en los niveles elevados de transaminasemia. La velocidad de negativización de un test que previamente ha sido PCR positivo y evoluciona hacia la negatividad, ocurre de forma muy dispar. Mientras que en un grupo de pacientes ocurre de forma precoz (53%), durante el primer mes de tratamiento, en el resto (47%) ocurre en tiempos posteriores, incluso una vez concluido el tiempo de tratamiento con interferón alfa 2b. Con la intención de estudiar si la rapidez con la que ocurre este fenómeno es indicativa de una mejor evolución clínica, se analizó la evolución en el tiempo de los niveles séricos de transaminasas. No se pudieron observar diferencias significativas en lo que respecta a la normalización de los enzimas hepáticos, ambos grupos de pacientes mostraron una evolución muy similar.

Estas observaciones son lo suficientemente importantes y sugieren, de una parte la relación entre la viremia y el grado de afectación hepático, de otro la utilidad del test en la monitorización de los pacientes sometidos a tratamiento y la predicción de la respuesta.

De hecho, entre los factores predictivos de respuesta al tratamiento con interferón se han descrito tanto la negativización de la presencia del virus C en la biopsia hepática, como el grado de viremia previo al tratamiento (Portal I, et al, 1994; Marcellin P., et al. 1994).

El número de pacientes tratados con interferón beta incluidos en este estudio no ha sido suficiente para realizar un análisis comparativo con las respuestas al tratamiento con interferón alfa, sin embargo, el seguimiento clínico de esta corta serie parece indicar el fracaso en la instauración de este tipo de

tratamiento. El subgrupo presentaba características anatomo-clínicas semejantes al grupo mayoritario sometido a tratamiento con interferón alfa y los parámetros hematológicos y bioquímicos fueron en todo punto comparables. Los resultados analíticos demostraron la ausencia de respuesta a la terapia instaurada.

De forma resumida podemos decir que el tratamiento de los pacientes afectos de hepatitis C con interferón alfa 2b es una decisión correcta ya que se evidencia un número de respuestas considerable y con una persistencia significativa. La inclusión del test molecular para la detección del genoma viral en el curso del tratamiento es, bajo nuestro punto de vista y a tenor de los resultados, de gran valor. De una parte porque su realización es sencilla y aprovecha muestras sanguíneas obtenidas con el fin general de la analítica convencional. Por otra parte, ya que proporciona una información muy valiosa sobre la evolución de la viremia.

En este trabajo hemos podido observar como en aquellos pacientes en que se produce la negativización del test PCR, tanto de forma precoz como tardía, la evolución clínica y la analítica confirman una mejoría del paciente. Bajo esta óptica, el test PCR debería de incluirse en el seguimiento de los pacientes afectos de hepatitis C tratados con interferón, y por extensión, sometidos a cualquier otro tratamiento que tenga como fin último la erradicación del virus en el paciente.

Nuestro trabajo ha servido, además, para poner de manifiesto la complicada patogenia del proceso infeccioso por el virus C. La inclusión en el protocolo clínico de la realización del test molecular sobre muestras de células sanguíneas añade aún más valor a la normalización de este medio diagnóstico. Si bien la correcta realización del test da lugar a un requerimiento de mayor muestra sanguínea, lo cierto es que proporciona una información valiosísima sobre el estado replicativo del virus y su secuestro en fracciones celulares. No podemos afirmar que el virus aislado en una población linfocitaria determinada represente un reservorio de material infectivo, inaccesible al efecto virucida de la medicación administrada al paciente, pero de ser así la afirmación de curación de un sujeto por negativización de la viremia puede ser un grave error. Si el virus puede escapar al control farmacológico en tal situación la posibilidad de reinfección y

enfermedad abierta es muy alta. Quizás sea esta una explicación para el fenómeno "rebote" observado en el seguimiento de los pacientes tratados en lo que respecta a la respuesta de las transaminasas séricas una vez que finaliza el periodo de tratamiento.

Se ha querido relacionar el secuestro del virus en las células de sangre periférica con una mayor probabilidad de recurrencia de la infección viral una vez efectuado el trasplante hepático (Feraý C, y cols, 1992). Por otra parte se ha interpretado el fenómeno de la aparición de variantes genómicas en el curso de la infección vírica como una consecuencia del refugio temporal del virus en las células sanguíneas, que escapando a la presión del sistema inmune sería capaz de modificar su presentación (Ahmed R, y cols, 1991). Nuestro trabajo no ha podido demostrar este último fenómeno ya que el estudio del genoma viral se ha limitado a un grupo muy reducido de pacientes, que en su mayoría resultaron ser de una variante genómica idéntica.

Cuando de forma particular se han analizado cada uno de los casos de pacientes tratados con interferón alfa 2b recombinante y se ha estudiado detalladamente la evolución de los niveles de transaminasas junto a la secuencia de positividad/negatividad del test PCR aplicado, tanto a muestras de suero como de células, ha sido posible demostrar la utilidad de estas dos técnicas en el seguimiento individual de cada paciente. La mayor conclusión de tal análisis está implícita en el comentario anterior: la determinación conjunta del virus C por la técnica PCR en suero y en células sanguíneas debe ser considerada de forma individualizada y utilizada como un instrumento particular con cada paciente protocolizado. El análisis global puede, falsamente, hacer pensar que el número de disparidades PCR suero/sangre es aleatorio, sin embargo el estudio detallado convierte a esta técnica en un instrumento de utilidad por el clínico instruido en su empleo.

Si bien es cierto que muchas preguntas quedan sin responder y que este trabajo presenta en muchas ocasiones más interrogantes que respuestas, también es cierto que los objetivos para los que estaba diseñado han quedado resueltos. Así, como punto final, podemos enunciar el momento en el cual la determinación

del virus de la hepatitis C por la técnica de PCR puede ser de utilidad en un protocolo clínico: 1) En el diagnóstico de la hepatitis aguda C como prueba decisoria ante un paciente con anticuerpos negativos y con un antecedente expositivo muy reciente, y como prueba confirmatoria ante una hepatitis no bien filiada, 2) En el seguimiento de los pacientes con hepatitis C, con objeto de: i) evaluar la respuesta al tratamiento específico instaurado, ii) seguir el curso infectivo de la enfermedad e identificar fracciones celulares que actúen de reservorio del virus, iii) como factor predictivo de respuesta a un tratamiento específico.

Otras aplicaciones del test PCR, descritas en el apartado correspondiente introductorio a este trabajo, son tan legítimas como las indicadas aquí, pero no pueden derivarse de los datos experimentales presentados. Así por ejemplo, la revisión de la literatura médica más reciente apoya el uso del test PCR en la evaluación de la transmisión vertical madre-hijo en madres infectadas o en el diagnóstico de hepatitis en sujetos trasplantados (Sullivan DG, y cols, 1996; Bizollon T, y cols, 1996).

La PCR es, en definitiva, una herramienta magnífica para el diagnóstico de la viremia y su estandarización y aplicación rutinaria en el conjunto de pruebas diagnósticas de una unidad de hepatología debería ser una meta a alcanzar de forma inmediata.

TESIS DOCTORAL

5.- CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo y su comparación con los datos existentes al respecto en la literatura médica nos han permitido formular las siguientes conclusiones:

- 1. El test molecular desarrollado para la determinación en muestras sanguíneas --suero y células-- del virus de la hepatitis C es un método sensible, reproducible y específico, que puede ser aplicado de forma rutinaria en protocolos diagnósticos y terapéuticos de hepatitis viral C.*
- 2. La seguridad diagnóstica del test PCR alcanza el 96.8% en nuestra serie. El logro de tan alto grado de confianza diagnóstica para el test molecular pasa por: i) la determinación conjunta del genoma viral circulante libremente en sangre o incluido en la fracción celular y ii) la repetición del test de forma seriada durante el curso de la enfermedad.*
- 3. El control periódico de transaminasas y PCR sérica del genoma del VHC durante el tratamiento constituye un método adecuado en la monitorización de la respuesta terapéutica.*
- 4. Los pacientes tratados con interferón alfa 2b recombinante de nuestra serie presentan un perfil de transaminasas séricas con descenso y ascenso paralelo a los observados en los niveles de viremia determinada por PCR.*
- 5. La detección en suero del genoma viral RNA-VHC por PCR no implica necesariamente su presencia/ausencia en células mononucleares de sangre periférica.*

6. La desaparición del genoma en suero como criterio de respuesta al tratamiento no se sigue de negativización del test en células mononucleares de sangre periférica.

7. Por último, la determinación mediante PCR de la distribución del genoma viral del virus de la hepatitis C en subpoblaciones linfocitarias, presenta un patrón definido por la constante positividad del test en la línea celular B (CD19), ocasional en monocitos (CD14) y escasa y aislada en linfocitos T (CD8 y CD4).

TESIS DOCTORAL

TESIS DOCTORAL

6.- BIBLIOGRAFÍA

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguello V, Chung RT, Kaplan LM. A ride for hepatitis C virus infection in type II crioglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* **1992**; 327: 1490-1495.
- Ahmed R, Hahn CS, Somesunderan T, Villarete L, Madloubian M, Strauss JM. Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J Virol* **1991**; 65:4242-7.
- Alberda ML, Carmelo C, Navas S, Aguilera B, Carreño V, et al. Infección por virus C de la hepatitis en pacientes en hemodiálisis y en receptores de trasplante renal. *Hepatología Clínica* **1993**; 3: 185-193.
- Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, et al. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* **1992**; 340: 697-98.
- Alter HJ, Purcell RH, Shin JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic NonANonB hepatitis. *N Engl J Med* **1989b**; 321: 1494-1500.
- Alter HJ. The chronic consequences of NoANoB hepatitis. En Seeff LB, Lewis JH, eds. *Current perspectives in hepatology*. New York: Plenum Medical Books, **1989a**; 83-97.
- Alter HJ. Hepatitis C: a sleeping giant?. *Am. J. Med.* **1991**; 91: 1125-1155.
- Alter HJ, Margulis MS, Krawczynski K, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N. Engl. J. Med.* **1992a**; 327: 1899-905.
- Alter MJ, Gallagher M, Morris TT, et al. Role of hepatitis G virus in the etiology and clinical course of viral hepatitis. *Hepatology* **1996**; 24:247A.
- Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, Kramaer E, Miller JK, Mandel E, Hadler SC, et al. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and NonANonB hepatitis. *JAMA* **1989c**; 262: 1201-1205.
- Alter HJ. New kit on the block: evaluation of second generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* **1992b**; 15: 350-353.
- Arima T, et al. Hepatitis C: basic and clinical studies. *Gastroenterology-JPN* Feb. **1992**; 27 (1): 121-7.
- Artini M, De Marzio E, Colleparado D, et al. Hepatitis C viral RNA in serum of italian patients with chronic NANBH. *J Hepatol.* **1991**; 13 (2): S92 (abstrac).
- Artini M, Natoli G, Avantaggiati ML,

- et al. Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in peripheral blood mononuclear cells from chronic HCV carriers. *J. Hepatol.* **1992**; 17 (suppl 1): S13.
- Ashwell JD. Lymphocytes: properties and strategies. En: Ariar EM, Jacoby WB, Popper H, Schachert D, Shafritz DA, eds. *The liver biology and pathobiology*. New York: Raven Press, **1988**; 867-84.
 - Asociación Española para el Estudio del Hígado. Estudio epidemiológico multicéntrico nacional sobre hepatitis crónica **1991**; Gayoso-Wellcome pag. 15-19.
 - Attard L, Verucchi A, BoschiA, Minieso R, et al. HCV acute hepatitis: kinetic of specific antibodies. **1990**; 11 (2): S3 (abstrac).
 - Bach N, Thung SN, Shaffner F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic active hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology* **1992**; 15: 572-577.
 - Bancheran J. Antiviral properties of interferons. *J Pharm Clin* **1986**; 5: 193-200.
 - Bartolomé J. Biología Molecular del virus C de la hepatitis. *Hepatología Clínica*, **1993a**; 1:37-45.
 - Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA, Navas S and Carreño V. Detection of hepatitis C virus RNA un serum and peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Hepatology*, **1993b**; 17 (Suppl.3): S90-S93.
 - Bartolomé J, Quiroga JA, Carreño V. Ultimos avances en hepatopatía. *Hepatología Clínica*, **1996**; 215:240.
 - Belli LS, Alberti A, Rondinara GF,, et al. Recurrent HCV hepatitis after liver transplantation. *Lancet* **1993**; 341: 378-9.
 - Bischofberger N, Wagner RW. Antisense approaches to antiviral agents. *Sem Virol* **1992**; 3:57-66.
 - Bizollon T, Palazzo U, Chevallier M, Ducerf C, Trepo C. HCV recurrence after OLT: a pilot study of ribavirin therapy following initial combination with IFN. *Hepatology* **1996**; 24:293A.
 - Boletín Epidemiológico Semanal. Red nacional de Vigilancia Epidemiológica. Infección por virus de la hepatitis C. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Epidemiología . Ministerio de Sanidad y Consumo; Nov. **1991**; 1992.
 - Boletín Epidemiológico Semanal. Red nacional de Vigilancia Epidemiológica de España. Centro nacional de Epidemiología; Enero **1996** Vol. 4, nº 1/1-12.
 - Boucher E, André P, Jouanolle H, et al. Treatmen of chronic viral C hepatitis by interferon plus ursodeoxycholi acid: results from a controlled randomized trial in 80 patients. *Hepatology* **1994**; 20: 169A.
 - Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zeldis JB. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J. Infect. Dis.*

1992; 166: 1276-80.

- Branca AA, Baglioni C. Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature* **1981**; 294: 768-70.

- Brillanti S, Masci C, Siringo S, et al. Serological and histological aspects of hepatitis C virus infection in alcoholic patients. *J. Hepatol.* **1991**; 13: 347-50.

- Brillanti S, Masci C, Ricci P, Migliali M, Barbara L. Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **1992**; 15: 998-1001.

- Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am. J. Med.* **1974**; 57: 775-788.

- Bruguera M. Hepatitis vírica aguda. *Medicine VI Edición*, **1992**; 8: 311-322.

- Bruix J, Calvet X, Costa J, Ventura M, Castillo R, Barrera JM, Ercilla G, Sanchez-Tapias JM, Vall M, Bru C, Rodes J. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma an hepatic cirrhosis. *The Lancet* **1989**; 2:1004-1006.

- Buey LG, Garcia Monzon C, Moreno R. Inmunopatogenia de la hepatitis crónica por virus C. *Hepatol Clin* **1993**; 2: 105-119.

- Bukh J, Puercell RH, Miller RH. Importance or primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction

assay. *Proc Natl Acad. SCI USA* **1992**; 89:187-191.

- Buti M. Hepatitis crónica autoinmune y virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* **1992**; 15: 522-524.

- Campagne E, San Juan A. DECISCAN HVC: a supplemental assay for HVC infection diagnosis. *Laborama* **1992**; 5:15.

- Camps J, García Granero M, Riezu-Boj JI, et al. Predictive factors of disease relapse after therapy with lymphoblastoid interferon (L-IFN) in chronic hepatitis C (CHC). *J Hepatol* **1991**; 13 (2): S16 (abstract).

- Carnicer Jaúregui F, et al. Transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis C. *Medicina Clínica* **1993**; 20:46.

- Carreño V. Variante española del virus C de la hepatitis: la VHC-S. *Journal of General Virology*, **1995**:76.

- Carreño V, Quiroga JA. Últimos avances en hepatología. *Hepatología Clínica* **1993**; 3: 224-244.

- Carreño V. Alternativas terapéuticas para el tratamiento de las hepatitis virales. *Anales de Medicina Interna* **1995**; 50:52.

- Carreño V, Castillo I, Gonzalez A, Pardo M. Interleukin-2 treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* **1994**; 20: 170A.

- Castells L, Vargas V, Comas P, García Sureda D, Vidad X, Esteban R, Guardia J. Carcinoma

Hepatocelular: Clínica, diagnóstico y supervivencia en 140 casos. *Medicina Clínica* **1993**; 12:441-446.

- Castillo I, Bartolome J, Navas S, et al. Hepatitis C virus replication and hepatocellular damage. *J. Hepatol.* **1991b**; 16:55.

- Castillo I, Bartolomé J, Carreño V. Detección del VHC-ARN por PCR. Comparación de métodos y secuenciación del genoma vírico. *Gastroenterol Hepatol.* **1991a**; 14 (7): 351.

- Chambers T, Rice C. Molecular biology of the flaviviruses. *Microbiol Sciences* **1987**; 4: 219-23.

- Chemello L, Cavalletto D, Belussi F, Bortolotti F, Talato F, Alberti A. Antibodies to structural and non-structural hepatitis C virus epitopes in acute infection. *J. Hepatol.* **1991**; 13 (2): S20 (abstrac).

- Chomczynski P, sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**; 163:156-159.

- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overloy LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non A- non B viral hepatitis genoma. *Science* **1989**; 244:359-362.

- Conjeevaram HS, Everhart JE, Hoofbanagle JH. Predictors of a sustained beneficial response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* **1995**; 22: 1326-9.

- Costa A, Serejo F, Raimundo M, et al. Bile duct lesion: a predictive factor of relapse to alpha-interferon therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* **1994**; 20: 158A.

- Cotler SJ, Gretch DR, Carithers RL. The absence of hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after interferon therapy does not predict sustained response. *Hepatology* **1996**; 24: 154A.

- Curso Hepatitis Virales. Facultad de Medicina. Colegio Oficial de Médicos. Granada, **1996**.

- Davis GL, Balart LA, Shiff ER, et al. Treatment of chronic hepatitis C virus with recombinant interferon alpha: a multicenter randomized, controlled trial. *N Engl J med* **1989**; 321: 1501-6.

- Davis GL. Interferon therapy of chronic hepatitis C: Update 1995. En Arroyo V, Bosch J, Rodés J. Eds. *Masson Barcelona* **1995**; 155 -60.

- De Maeyer-Cruignard J, De Maeyer E. Immuno modulation by interferons: Recent developments. *Interferon* **1985**; 6: 69-91.

- Demelia L, Vallebona E, Pama R, Sanna G, Coppola R. Evidence of VHC sexual transmission in italian families. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (The 8th Triennial Congress, 1993)*. Scientific program and Abstract Volume, 523 (Abstract).

- Di Bisceglie AM, Shindro M, Fang

- TS, et al. A pilot study of Ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* **1992**; 16: 649-654.
- Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, et al. Recombinant IFN-alpha therapy for chronic hepatitis C: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *N Engl J Med* **1989**; 321: 1506-10.
 - Diener HP, Hutteroth TH, Hess G, Meuer S. Immunodetection microscopic observation on the inflammatory infiltration and HLA antigen in hepatitis B and NoANoB, *Hepatology* **1987**; 7:1317-25.
 - Dienstag JL, NonANonB hepatitis. I. Recognition, epidemiology and clinical features. *Gastroenterology* **1983**; 85: 1744-6.
 - Dienstag JL. Hepatitis NoANoB. *The Lancet* **1985** 6, 3:190-193.
 - Driggers PH, Ennist DL, Gleason SL, et al. An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**; 87: 3743-7.
 - Durand JM, Kaplanski G, Richard MA, et al. Cutaneous vasculitis in a patient infected with hepatitis C virus. Detection of hepatitis C virus RNA in the skin by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* **1993**; 128: 359-60.
 - Dusheiko GM, Smith M, Scheuer PJ. Hepatitis C virus transmitted by human bite. *lancet* **1990**; 503-4.
 - Editorial The Lancet. VHC y hepatopatía autoinmune. *The Lancet* **1991**; 18, 5: 285-286.
 - Estaheli P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res* **1990**; 38: 147-200.
 - Esteban JI, Viladomiu L, González A, Roget M, Genesca J, Esteban R, López-Talavera JC, Hernandez JM, Vargas V, Buti M Guardia J. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *The Lancet* August **1989**; 294-296.
 - Estivill X, Nunes V. Amplificación del DNA y aplicación en Medicina. *Medicina Clínica* **1991**; 96, 9:341-349.
 - Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. Barcelona, Doyma ed. **1991**.
 - Fattovide G, Tagger A, Brollo L, et al. Hepatitis C virus infection in chronic hepatitis B virus carriers. *J. Infect. Dis.* **1991**; 163: 400-402.
 - Feray C, Samuel D, Thiers V, et al. Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *J. Clin Invest* **1992**; 89: 1361-5.
 - Fong TL, Shindo M, Feinstone SM,

Hoofnagle JH, Bisceglie AMD. Detection of replicative intermediate of hepatitis C viral and serum of patients with chronic hepatitis C. *J. Clin. Inves.* **1991**; 88: 1058-60.

- Fried MW, Shido M, Foug TL, et al. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **1992**; 102: 1306-1308.

- Galli M, Marti G, Monteverde A et al. Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinaemias. *The Lancet* **1992**; 339:989

- García-Samaniego J, Soriano V, Martínez-Odrizola P, et al. Efficacy and safety of alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C in VIH + patients. *Hepatology* **1994**; 20: 162A.

- Garrigós E, Diago M, Tuset C, Asenjo E, Roma E, Jimenez M, González C, Péres A. Anticuerpos antiviral de la hepatitis en pacientes en hemodiálisis. *Nefrología* **1991**; 11: 155-159.

- Gerber MA, Krawczynski K, Alter MJ, et al. Histopathology of community acquired chronic hepatitis C. *Hum. Path.* **1992**; in press.

- Goodbourn S, Maniatis T. Overlapping positive and negative regulatory domains of the human beta interferon gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**; 85: 1447-52.

- Gray PM, Leung D, Pennia D, et al. Expression of human immune interferon cDNA in *E. Coli* and monkey cells. *Nature* **1982**; 295: 503-8

- Gresser I. Production of interferon by suspensions of human leucocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* **1961**; 108: 799-803.

- Grottola A, Buttafoco P, Ferreti I et al. Selection of more pathogenic HCV genotype II during long-term follow-up of IFN-treated patients. *Hepatology* **1994**; 20: 167A.

- Guéchet J, Loria A, Serfaty L, Giral P, Giboodeau J, Poupon R. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of alpha-interferon therapy. *J hepatol* **1995**; 22: 22-6.

- Habersetzer F, Marcellin P, Boyer N, et al. Recombinant interferon beta for the treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology* **1995**; 22: 119A.

-Haddad J, Deny P, Munz-Gotheilc et al. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *The Lancet* **1992**; 339: 321-323.

- Han JH, Shyamala V, Richman KH, Braver MJ, Irvina B, Urdea MS, Tekamp-Olsar P et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserve sequences in the 5' untranslated region and poly (a) tails at the 3' end. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **1991**; 88: 1711-1715.

- Harada H, Fujita T, Miyamoto M. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* **1989**; 58: 729-41.

- Haruna Y, Hayashi N, Hiramatsu N, Kasahara A, Fusamoto H, kamada T. Analysis of infiltrating lymphocytes in chronic active hepatitis C. *Hepatology* **1992**; 16: 1081.
- Hassanein T, Nussler A, Friedlander L, Van Thiel DH. Responses to interferon therapy in chronic hepatitis C are associated with an increase in plasma No. *Hepatology* **1994**; 20: 161A.
- Hata K, Van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TL. Phenotypic and functional characteristics of lymphocytes isolated from liver biopsy specimens from patients with active liver disease. *Hepatology* **1992**; 15: 816-823.
- Hayashi P, Marrone A, Kleiner D, et al. Hepatic apoptosis in chronic hepatitis C: analysis by in-situ terminal transferase labeling (TdT). *Hepatology* **1994**; 20:160A.
- Hepatitis por Virus C. Carrión Bolaños JA, Bandrés Moya F. Fundación Laboral Servicios Asistenciales. Universidad Complutense de Madrid, **1994**.
- Hibbs JR, Frickhofen N, Rosenfeld SJ, et al. ¿Anemia Aplásica y Hepatitis vírica NoANoBNoC?. *The Journal of the American Association* Abr. 15, **1992a**; 267 (15): 2051-2054.
- Hibbs JR, Issaragrisil S, Young NS. High prevalence of hepatitis C viremia among aplastic anemia patients and controls from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **1992b**; 46:564-70.
- Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, et al. Immunohistochemical detection of Fas Antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **1994**; 19: 1354-1359.
- Hiramatsu N, Hayashi N, Haruna Y, et al. 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* **1992**; 16:306-311.
- Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, et al. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* **1986**; 315: 1501-1506.
- Hoofnagle JH. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **1990**; 323: 337-9.
- Hoofnagle JH. Chronic hepatitis: the role of corticosteroids. In Szmunn W, Alter HJ, Maynard JE, eds *Viral Hepatitis: 1981 International Symposium Philadelphia*, Franklin Institute Press **1982**; 573-83.
- Hoofnagle JH. Thrombocytopenia during interferon alpha therapy. *JAMA* **1991**; 266-849.
- Hosoda K, Yokosuka O, Omata M, Kato N, Ohto M. Detection and partial sequences of hepatitis C virus RNA in the liver. *Gastroenterology* **1992**; 101: 766-771.
- Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo Q. Molecular Biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control

of viral disease. *Hepatology*, **1991**; 14; 2:381-388.

- Hovanessian AG. Interferon-incuced and dsRNA activated enzymes: a specific protein kinase and 2'-5' oligoadenylated synthetases. *J Interferon Res* **1991**; 11: 199-205.

- Hsu HH, Wright TL, Luba D et al. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology* **1991**; 14: 767-777.

- Inove Y, Takeuchi K, Chou WH et al. Silent mother to child transmission of hepatitis C virus through two generations by comparative nucleotide sequence analysis of the viral cDNA. *J. Infect. Dis.* **1992**; 166: 1425-1428.

- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The Interferon. *Pro. R Soc Lond Biol Sci* **1957**; 147: 258-67.

- Jakschies D, Zachoval R, Müller R et al. Strong transient expression of the type I interferon-incuced MxA protein in hepatitis A but not in acute hepatitis B and C. *Hepatology* **1994**; 19: 857-65.

- Jin-Town Wang, Jin-Chuan Sheu, Jaw-Town Lin, Teh-Hong Wang, and Ding Shinn Chen. Detection of Replicative Foem of Hepatitis C virus RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The J. Of Infetious Diseases*, **1992**; 166: 1167-9.

- Jonak GJ, Kniight EJ. Interferons and the regulation of oncogens. *Interferon* **1986**; 7: 167-85.

- Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K, Kuno K, Murakami S, Hattoh N. Detection of serum hepatitis C virus RNA. *Lancet* **1990**; 335:976.

- Kanto T, Hayashi N, Takehara T. et al. Predictive value of hepatitis C virus density analysis for relapse in interferon-treated chronic hepatitis C patients. *Hepatology* **1994**; 20: 157A.

- Kawasaki ES, Wang AH. Detection of gene expression In: Erhiditta, ed. PCR technology; principals and aplications for DNA amplification. MacMilain Publishers Ltd. V.R. **1989**: 89-97.

- Keller AD, Maniatis T. Identification and chracterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. *Genes & Dev* **1991**; 5: 868-79.

- Kikuchi T, Onji M, Michitaka K, Ohta Y. Inmuglobulina M antiviral de la hepatitis C en pacientes con hepatitis crónica tipo C. *Hepato-Gastroenterology* **1993**; 3: 158-161.

- Kimmchi A. Autocrine interferon and the suppression of the C-myc nuclear oncogene. *Interferon* **1987**; 8: 86-110.

- Kishihara Y, Ikematu H, hayashi J, Yamaji K, Kashiwagi S. Serum antibody to natural interferon of the IgG class among hepatitis C virus carriers and theri relevance to interferon therapy of chonic hepatitis. IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease **1996**: 320.

- Kitajewski J, Scheneider RJ, Safer B, et al. Adenovirus VAI RNA antagonises the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon induced eIF-2 alpha kinase. *Cell* **1986**; 45: 195-200.
- Kitis G, Papaglianni E, Tzilves D, Kordits F, Kokozidis G. Co-administration of granulocyte colony-stimulating factor allows completion of interferon therapy in chronic viral hepatitis with neutropenia. *Hepatology* **1994**; 20: 171A.
- Knodell AJ, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kierman TW, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* **1981**; 1: 431-435.
- Koskinas J, Tibbs C, Saleh MG, Pereira LMMB, McFarlane IG, Willeams R. Effects of ribavirin on intrahepatic and extrahepatic expression of hepatitis C Virus in interferon nonresponsive patients. *J Med Virol* **1995**; 45: 29-34.
- Krawczynski K, Beach MJ, Braley DW, et al. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* **1992b**; 103:622-9.
- Krawczynski K, Beach M, Bradley DW, Meecks E, Spelbring JE. Immunosuppression and pathogenic studies of acute hepatitis C virus (HCV) infection in chimpanzees. *Hepatology* **1992a** 16 (2): 131A.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human NonA/NonB hepatitis. *Science* **1989**; 244: 359-362.
- Kuroki T, Nishiguchi S, Fukuda K, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers with chronic hepatitis C without human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **1992**; 166: 1192.
- Laguna del Estal P. Infección por VHC: Seroepidemiología y diagnóstico serológico. *An Med Intern*, **1993**, vol 10; 1: 38-46.
- Lan JYN, Davis GL, Kniffen J, et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* **1993**; 341:1501-4.
- Langer JA, Rashidbaigi A, Lai LW, Patterson D, Jones C. Sublocalization on chromosome 21 of human interferon-alpha receptor gene and the gene for an interferon-gamma response protein. *Som Cell Mol Gen* **1990**; 16: 231-40.
- Leon A, Canton R, Elia M et al. Second generation RIBA to confirm diagnosis of HVC infection. *Lancet* **1991**; 337:912.
- Lindsay KL, Spencer C, Nicoloff J, et al. Thyroid peroxidase antibody - A potential predictor of IFN associated thyroid disease. *Hepatology* **1994**; 20: 168A.
- Lindsay KL, Davis GL, Schiff ER, et al. Long-term response to higher doses of interferon alfa-2b treatment of patients with chronic hepatitis C: a randomized multicenter trial.

Hepatology **1993**; 18:106A.

- Llibre JM, Bartoli M. Seroprevalencia del virus de la hepatitis C en adictos a drogas por vía parenteral. *Medicina Clínica* **1992**; 675.

- Lok ASF, Soldevilla-Pco. Epidemiology and serologic diagnosis of hepatitis E. *J. Hepatol* **1994**; 20:567-9.

- López Talavera JC, González A y Estéban R. Hepatitis C. *Medicine* **1991**; 76: 40-50.

- Malaguarnera M, Restuccia S, Trovato G. et al. *Clin Drug Invest* **1995**; 9: 141-9.

- Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 3 vol- 2 ed. **1989**.

- Marcellin P, Martinot M, Pouteau M, et al. HCV genotype and pretreatment serum HCV-RNA level are the main and independent prognosis factors of sustained response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* **1994**; 20: 208A.

- Martin P, Di Bisceglie AM, Kassianides C, et al. Rapidly progressive non-A non-B hepatitis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Gastroenterology* **1989**; 97: 1559-1561.

- Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* **1988**; 54:

903-16.

- Mondelli M, Alberti A, Tremolade F, Williams R, Eddleston ALWF, Realdi G. In vitro cell-mediated cytotoxicity for autologous liver cells in chronic NoANoB hepatitis. *Clin Exp Immunol* **1986**; 63:147-65.

- Müller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J. Of General Virology* **1993**; 74: 669-676.

- Mullis K.B. and Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzimol.* **1987**; 155: 335-350.

- Murray JAH. *Antisense RNA and DNA*. Murray Ed., Wiley-Liss Inc. New York, NY. **1992**.

- Navas S. Determinación del RNA del virus C de la hepatitis en tejido. *Hepatología Clínica* **1993**; 3:171-184.

- Nishavian P, Hofman B, Wang YX, Jackson AL, Detels JR, Fajeu JL. Serum soluble CD8 molecule is a marker of CD8 T cell activation in HIV-1 disease. *AIDS* **1991**; 5: 805-12.

- Nouri-Aria KT, Sallie R, Sanger D. Et al. Detection of genomic and intermediate replicative strands of hepatitis C virus in liver tissue by in situ hybridization. *J. Clin. Invest* **1993**; 91: 2226-34.

- Okamoto et al, *Jpn. J. Exp. Med*, **1990**; 60, 167-177.

- Okamoto H, Kurai K, Okada S, et al. Fulllength sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*, **1992**; 188:331-341.
- Olynyk J, Reedy R, Di Bisceglie AM, et al. Hepatic iron concentration as predictor of response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* **1993**; 18: 90 A.
- Pardo M. Hepatitis crónicas activas autoinmunes. *Hepatología Clínica* **1993**; 2: 128-148.
- Pares A, Caballería J, Virus de la hepatitis y enfermedad hepática alcohólica. *Gastroenterol. Hepati.* **1996**; 19: 383-9.
- Patel A, Sherlock S, Dusheiko G, et al. Clinical course and histological correlations in post-transfusion hepatitis C: The Royal Free Hospital experience. *Eusop. J. Gastroenterol. Hepatol.* **1991**; 3: 491-495.
- Pawlostsky JM, Bastie A, Pellet C, et al. Significance of indeterminate third-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay (RIBA). *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 80-83.
- Pawlotsky JM. Significance of indeterminate second generation RIBA and resolution by third generation RIBA. In: *Hepatitis C virus: new diagnostic tools. Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP)*, ed. Paris: John Libbey Eurotex, **1994**: 17-27.
- PCR TEORIA Y PRACTICA. Roche System Diagnostic. Sevilla, **1993**.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* **1987**; 56: 727-77.
- Pfeffer LM, Eisenkraft BL, Reich NC, et al. Transmembrane signalling by IFN alpha involves diacylglycerol production and activation of the E soform of protein kinase C in Daudt Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**; 88:7988-92.
- Poralla T, Hütteroth TH, Meyer KH. Cellular cytotoxicity againts autologous hepatocytes in acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *Gut* **1984**; 25:114-120.
- Portal I, Bourlière M, Halfon PH. et al. Predictive value of serom HCV-RNA levels and genotypes for response to interferon alfa therapy. *Hepatology* **1994**; 20: 156A.
- Prince AM, Brotman B, Inchauspé G, et al. Patterns and prevalence of hepatitis C virus infection in posttransfusion Non-A,Non-B hepatitis. *J Infect Dis* **1993**; 167: 1296-9.
- Prince AM, Brotman B, Huima T, Pascual D, Jaffery M, Inchauspé G. Immunity in hepatitis C infection. *J Infect Dis* **1992**; 165: 438-43.
- Pucci DL, Stramer SL, ABBOTT LABORATORIES EEUU, Lennartz L, Simpson B, Pelzer C, Klarmann R, Sutherland R ABBOTT DIAGNOSTIKA ALEMANIA Nuevos avances en la respuesta inmune de IgM en pacientes con hepatitis C.

- Pumarola A. *Virología general*. En: MATILLA V. *Microbiología y Parasitología*. Madrid: Amaro; **1980**: 61-78.
- Quirke P, Taylor GR. *PCR a Practical Approach*. Mcpherson MJ. Edit. **1992**.
- Rabinovitz M, Ehrlich G. HCV-RNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) predicts outcome after alpha-interferon (IFN) treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology* **1996**; 24: 157A.
- Ratzu V, Marcellin P, Boyer N et al. Interferon treatment of chronic hepatitis C associated with symptomatic cryoglobulinemia: dissociated effects. *Hepatology* **1994**; 20: 162A.
- Reed JC. Bcl-2 and the Regulation of Programmed Cell Death. *J. Cell Biol*, **1994**; 124, 1-6.
- Reinus JF, Leikin EL, Alter HJ, et al. Failure to detect vertical transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* **1993**; 17: 881-886.
- Renault PR, Hoofnagle JH. Side effects of alpha-interferon. *Semin Liv Dis* **1989**; 9: 273-7.
- Resumen del IV Simposium Internacional sobre hepatitis virales. Tomado de Noticias Médicas nº 3521, Nov, **1993**; 37-42.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* **1985**; 229: 726-33.
- Riestra S, Suarez A, Rodriguez M, Pérez R, Lambraña JLS, Alavez C, Rodrigo L. Transmisión intrafamiliar del virus C de la hepatitis. *Gastroent. y Hepatal* **1990**; 13:160.
- Rizzetto M, Canese MG, Arico S, et al. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta-antidelta) associated with the hepatitis B virus in the liver and in the serum of HBsAg carriers. *Gut* **1977**; 18:997-1003.
- Rossi GB. Interferons and cell differentiation. *Interferon* **1985**; 6: 31-67.
- Roth D, Fernández JA, Babinschkin S, et al. Detection of hepatitis C virus infection among cadaver organ donors: evidence for low transmission of disease. *An. Inter. Med.* **1992**; 117: 470-475.
- Ryals J, Dierks P, Ragg H, Weissmann C. A 46-nucleotide promoter segment from an IFN-alpha gene renders and unrelated promoter inducible by virus. *Cell* **1985**; 41: 497-507.
- Sáez-Royuela F, Porres JC, Moreno A, et al. High doses of recombinant alpha-interferon or gamma-interferon for chronic hepatitis C: a randomized, controlled trial. *Hepatology* **1991**; 13: 327-31.
- Samuel CE. The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeast to humans. *J Biol Chem* **1993**; 268: 7303-6.

- Sanchez Tapias JM. En pacientes con hipertransaminasemia asintomática. *Jano* Vol XLIII **1992**; 1001:67-72.
- Santiago Ruiz G, San Miguel Joglar G, Herrero León AM, Vega Santos T, Crespo García J, Pons Romero F. Hepatitis Aguda C. Estudio clínico y epidemiológico. *Medicina Clínica* **1992**; 98:49-52.
- Santos Vicente J, Suriñadi Caralt, Blandi P, Mirada Canals A. Carcinoma hepatolelular con positividad para los anticuerpos de la hepatitis C en un varón afecto de porfiria cutánea tarda. *Medicina Clínica* **1992**; 14:558.
- Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, Brown D, Dusdheiko GM. The pathology of hepatitis C. *Hepatology* **1992**; 15:567-1.
- Sherker AH, Twu S, Reyes GR, Robinson WS. Presence of viral replicative intermediates in the liver and serum of patients infected with hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* **1993**; 39: 91-6.
- Sherlock S. Virus C de la hepatitis. Presente y Futuro. *Hepatología Clínica* **1993**; 1:3-36.
- Sherman KE, Sjogren MH, Creager RL, et al. Hepatitis C RNA response to combined therapy with thymosin alpha-1 and interferon. *Hepatology* **1994**; 20: 207A.
- Shindo M, Di Bisceglie, Hoofnagle JH. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with alfa-interferon. *Hepatology* **1992**; 15: 1013 -6.
- Shocos TB, Sakaguchi AY, Naylor SL, Goeddel DV, Lawn RM. Clustering of leucocyte and fibroblast interferon genes on human chromosome 9. *Science* **1982**; 218-373.
- Shou-Doug Lee, Cho-Yu Chan, Yan-jenn Wang, Jaw-ching Wu, Knok-Hung Lai, Yang-te Tsai and kwang-Juer Lo. Seroepidemiology of Hepatitis C Virus Infection in Taiwan. *Hepatology* **1991**; 13: 830-833.
- Serra Desfilis MN. Hepatitis Aguda vírica. *JANO* **1992**; vol. XLII nº 998: 64-70.
- Simmonds P, Mc Omish F, Rosek, Chan SW, Yap PL, Holmes E. Classification and detection of genotypes of hepatitis C virus. *Proceedings 8 th Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*, **1993**:62.
- Staeheli P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv. Virus Res.* 1990; 38: 147-200.
- Steller H. Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science* **1995**; 267: 1445-1449.
- Stevens CE, Taylor PE, Pindyck J, et al. Epidemiology of hepatitis C virus. A preliminary study in volunteer blood donors. *JAMA* **1990**; 263: 49-53.
- Suarez A, Rodriguez M, Riestra S, Rodrigo L. Prevalencia del anticuerpo antiviral de la hepatitis C en cirrosis

biliar primaria y hepatitis crónicas autoinmunes. *Medicina Clínica* **1992**; 99,,2:51

- Sukri I. Interacción patogénica entre la infección por el virus de la hepatitis C y el consumo de etanol. Tesis doctoral **1997**.

- Sullivan DG, Wilson JJ, Corey L, Perkins J, Carithers RL, Gretch DR. Tissue compartmentalization of quasispecies variants during asymptomatic hepatitis C virus infection in liver transplant recipients. *Hepatology* **1996**; 24: 265A.

- Takada A, Tsutsumi M. Efficacy of a combination therapy with interferon and ofloxacin in chronic type C hepatitis. *Hepatology* **1994**; 20: 170A.

- Takada N, Takase S, Enomoto N, Takada A, Date T. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J. Hepatol.* **1992**; 14: 35-40.

- Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, et al. Demonstration of a hepatitis C virus-specific antigen predicted from the putative core gene in the circulation of infected host. *J Gen Virol* **1992**; 73:667-72.

- Takehara T, Hayashi N, Mita E, et al. Detection of minus strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: implicaciones for hepatitis C virus replication in infected tissue. *Hepatology* **1992**; 15: 387-390.

- Thompson CB. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* **1995**; 267: 1456-

1462.

- Tsukuma H, Hiyama T, Tomaka S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N. Engl. J. Med.* **1993**; 328:1797-801.

- T'Sang-T'Ang Hsieh MD, Ding-Shyan Yao, BS; I-Shyan Sheen MD, Yun-Fan Liaw MD, and Chia C. Pao Ph.D. Hepatitis C Virus in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Clin Microbiology and Infec Diseases*, **1992**; 98 (4): 392-396.

- Vaglia A, Niedin R, Puro V, Ippolite G, Bettini C, de lalla F. Needlestick hepatitis C virus seroconversion in a suegeon. *Lancet* **1990**; 336: 1315-1316.

- Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet* **1994**; 334: 1475-9.

- Vincent MD, Raymond T, Chung MD and Lee M Kaplan, MD; Ph.D. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* **1992**; 327: 1490-5.

- Wang JT, Wang TH, Lin JT, Shev JC, Lin SM, Chen DS. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with post-transfusion hepatitis C infection. *The Lancet* **1991**; 337: 48.

- Weidle U, Weissmann C. The 5'-flanking region of a human IFN-alpha gene mediates viral induction of trnascription. *Nature* **1985**; 303: 442-5.

- Weissmann C, Weber M. The

interferon genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **1986**; 33: 251-300.

- Wong GHW, Groeddel DV. Tumor necrosis factor- α and β inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* **1986**; 323: 819-22.

- Wong et al. Falta de especificidad de los análisis antiVHC en los estudios epidemiológicos. *The Lancet* **1991**; 18, 2: 119-120.

- Wright TL, Donegan E, Hsu H.H. et al. Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology* **1992**; 103: 317-322.

- Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, Higashi Y, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction

and response to interferon- α therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **1992**; 16: 293-299.

- Zaaije HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winked IN, Gerken G, Lelie PM. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* **1993**; 341: 722-724.

- Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. Expression cloning of 2'-5' A-dependent RNase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* **1993**; 72: 753-65.

- Zignego AL, Macchia D, Monti M, et al. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J. Hepatol.* **1992**; 15: 382-386.

TESIS DOCTORAL

7.- ANEXOS

ANEXO I

ABREVIATURAS

- 2'-5' OAS: sistema 2'-5' oligoadenilato sintetasa.
- Ac: anticuerpo
- ADVP: adictos a drogas por vía parentera
- Ag: antígeno
- Ag-Ac: unión antígeno-anticuerpo
- Ag-rTc: complejo antígeno- receptor
- AIM: molécula iniciadora de activación
- AINES: antiinflamatorios no esteroídicos
- ALT: alanil aminotransferasa
- AMV Transcriptasa Inversa: transcriptasa inversa del virus de los mieloblastos del pollo
- Anti VHC: anticuerpo anti virus de la hepatitis C
- Anti-GOR: anticuerpos antiGOR
- Anti-LKM: anticuerpos antimicrosomales de hígado y riñón
- AST: aspartato aminotransferasa
- AZT: Azatiopirina
- Bcl-2 y ced-9: genes que inhiben la apoptosis
- C, E NS1: dominios estructurales del genoma viral VHC
- C17, C19, C22, gp35, gp72: proteínas y glicoproteínas estructurales y no estructurales del - CD: fenotipos de membrana denominados "cluster designation"
- CD3-rTc: complejo célula CD3- receptor
- cDNA: DNA complementario
- CDT: transferrina deficiente en carbohidratos
- Ced-3 y Ced-4. Genes que promueven la apoptosis
- Células NK: células natural killer o asesinas
- CPTT: crioprecipitado
- dATP, dTTP, dCTP y dGTP: desoxinucleótidos trifosfato de adenina, timina, citosina y guanina-

- DMSO: dimetil sulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DNA-VHB: genoma viral DNA del virus de la hepatitis B
- EIA: enzimoimmunoensayo
- eif-2: cofactor esencial en la síntesis proteica. Factor de iniciación peptídica eucariótica
- ELISA: enzimoimmunoensayo
- EUROHEP: grupo europeo de expertos en hepatitis virales
- G-CSF: factor estimulador de colonias tipo G.
- GGT: gamma glutamil transpeptidasa
- GOT: transaminasa glutámico oxalacética
- GPT: transaminasa glutámico pirúvica
- HA: Hepatitis aguda
- HA Ag: antígeno del virus de la hepatitis A
- HBcAc: Anticuerpo anti antígeno core (núcleo) del virus de la hepatitis B
- HBcAg: Antígeno core (núcleo) del virus de la hepatitis B
- HBeAc: Anticuerpo anti antígeno e (mutado) del virus de la hepatitis B
- HBeAg: Antígeno e (mutado) del virus de la hepatitis B
- HBsAc: Anticuerpo anti antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
- HBsAg: Antígeno de superficie (antes australia) del virus de la hepatitis B
- HC: Hepatitis crónica
- HCA: hepatitis crónica activa
- HCAi: hepatitis crónica autoinmune
- HCH: hepatocarcinoma
- HCP: hepatitis crónica persistente
- HDAg: antígeno del virus D de la hepatitis
- Hepatitis NoANoBNoC: Hepatitis no A, no B no C
- Hepatitis NoANoB: Hepatitis no A no B
- HLA-I: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
- HLA_II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
- HPT: hepatitis postransfusional

- ICAM-I: molécula de adhesión intracelular
- ICSBP: Interferón consensus sequence binding protein
- IFN: interferón
- IgA: Inmunoglobulina tipo A
- IgD: inmunoglobulina tipo D
- IgG: Inmunoglobulina tipo G
- IgM: Inmunoglobulina tipo M
- IL-2: interleukina 2
- IRF1, IRF2: factores reguladores de interferón
- KDa: kilodaltons
- LDL: enzima láctico deshidrogenasa
- LFA-1: molécula de adhesión cuya expresión es restringida a los leucocitos
- LGL: linfocitos granulares grandes
- mRNA: RNA mensajero
- Mx: proteína inducida por el IFN
- NS2, NS3, NS4 y NS5: dominios no estructurales
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ORF: región de lectura abierta, con capacidad codificadora
- p-53, myc y ras: genes que regulan la apoptosis
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PCT: porfiria cutánea tarda
- PKR: proteína quinasa RNA dependiente
- PRDI, PRDII y PRDIII: dominios reguladores positivos I, II y III
- RI: células de respuesta inmune
- RIA: radioinmunoensayo
- rIL2: receptor de la interleukina 2
- RNA: ácido ribonucleico
- RNA-VHC: genoma viral RNA del virus de la hepatitis C
- RNAsin inhibidor: inhibidor de la enzima que inhibe el RNA
- RT-PCR: transcripción inversa y posterior PCR
- rTc: receptor antígeno específico de las células T

- rTr: receptor para transferrina
- Taq DNA polimerasa: polimerasa obtenida de *Thermus aquaticus*
- TGF β : factor de crecimiento beta
- TNF α : factor de necrosis tumoral alfa
- UTR: región ultraconservada del genoma viral
- VCAM-I: molécula de adhesión intracelular vascular
- VEB: virus einstein barr
- VHA: Virus de la hepatitis A
- VHB: Virus de la hepatitis B
- VHC: Virus de la hepatitis C
- VHC-I: virus VHC aislado en EEUU
- VHC-JI: virus VHC aislado en Japón
- VHD: Virus de la hepatitis D
- VHE: Virus de la hepatitis E
- VHF: Virus de la hepatitis F
- VHG: Virus de la hepatitis G
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
- VP0, VP1, VP2, VP3, VP4, : proteína viral 0, 1, 2, 3, 4
- VRE: elemento respondedor a virus

ANEXO II

TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES RNA-VHC (+) CON IFN-ALFAr

Centro Hospitalario (Clave): N°-----

TC = Tratamiento clínico

TP = Tratamiento prolongado

Fecha-----

-

HISTORIA CLINICA

Datos de Identificación : N° de Historia:-----

N° S.S.-----

Apellidos y Nombre-----

Edad:-----Profesión-----Teléfono-----

-

Domicilio-----

ANTECEDENTES PERSONALES

Enfermedades anteriores (Hepatopatía, Nefropatía, Hemopatía, DM, Cardiopatía.....)

S N: Intervenciones Quirúrgicas:-----

-

S N: Transfusiones

S N: ADVP

S N: Tatuajes

S N: Tratamiento Odontológico

S N: Homosexualidad

S N: Ingesta crónica de Medicamentos:-----

S N: Antecedentes de ictericia o hepatitis

S N: Contacto próximo con enfermos con hepatopatías

S N: Familiares cercanos (padres, hermanos) con hepatopatía

S N: Tratamiento anterior con IFN:
 Tipo/dosis/tiempo-----

Tabaco (cg/día/años):-----Alcohol (g/día/años):-----

Tiempo de Hipertransaminemia:-----

--

Observaciones:-----

EXPLORACION FISICA

Exploración Neurológica:

Exploración cardio-respiratoria: TA: FC

- Auscultación:
- Adenopatías:

Exploración Abdominal:

- Estigmas de Hepatopatía Crónica:
- Hepatomegalia:
- Ascitis:
- Edemas distales:
- Ictericia:
- Otros:

Biopsia Hepática:

- Fecha:
- I. De Knodell =
- Informe Histológico:

Serología:

HBsAg:	antiVHA IgG:	antiVHC (RIBA III):
antiHBs:	antiVHA IgM:	(C100, NS5, C22, C33)
antiHBc:	antiVIH:	RNA-VHC suero:
antiHBc IgM:	antiCMV:	RNA-VHC CMSP:
HBeAg:	VEB:	
antiHBe:	Crioglobulinas:	

Autoanticuerpos

- anti-nucleares:
- anti-músculo liso:
- anti-mitocondriales:
- anti-LKM:
- anti-LSA:

ANEXO III
HOJA ANALITICA-INICIAL Y TC

			Tratamiento				Seguimiento		
	-12	0	1M	2M	4M	6M	9M	12M	15M
fecha									
Hematíes									
Hemoglobina									
Hematocrito									
Act. Protrom.			X	X	X	X	X	X	X
Leucocitos									
Plaquetas									
Glucosa			X	X	X	X	X	X	X
Urea									
Creatinina									
B. Directa									
B. Indirecta									
GOT									
GPT									
GGT									
F. Alcalina									
T₃/TSH			X	X	X		X	X	X
T ₄ total/T ₄ libre			X	X	X		X	X	X
anti-tiroglobul.			X	X	X		X	X	X