



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**

TESIS DOCTORAL

**VARIACIÓN EN EL PERFIL DE MARCADORES DE INFECCIÓN ACTIVA Y
CITOQUINAS TH1/TH2 EN MUJERES VHC POSITIVAS EN EL PERIODO
POSTPARTO Y SU RELACIÓN CON LA TRANSMISIÓN VERTICAL**

VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA GESTACIÓN Y PUERPERIO

Ana Abril Molina

Granada, 5 de Octubre de 2015

Gf kxqt<Wpkxgtukf cf 'f g'I tpcpf c0Vguku'f qevqtengu

Cwqtc<Cpc'Cdtkl'O qrkpc

KUDP < 9: /: 6/; 347/7: 3/;

WTKj wr <lj f rj cpf rjg0pgv326: 3 164: ; 4

A mis queridas maestras, Ángela y Esther.

VARIACIÓN EN EL PERFIL DE MARCADORES DE INFECCIÓN ACTIVA Y CITOQUINAS TH1/TH2 EN MUJERES VHC POSITIVAS EN EL PERIODO POSTPARTO Y SU RELACIÓN CON LA TRANSMISIÓN VERTICAL

Tesis Doctoral presentada por Ana Abril Molina para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada.

Directores de Tesis

Dra. ÁNGELES RUIZ EXTREMERA, Profesora Titular de Pediatría del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Dr. JOSE ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ, Contratado Ayudante del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Área de Apoyo a la Investigación, Complejo Hospitalario de Granada.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por la doctorando Ana Abril Molina con el asesoramiento de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Granada y concluida el 5 de Octubre de 2015.

Fdo. Ana Abril Molina

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

Dra. ÁNGELES RUIZ EXTREMERA, PROFESORA TITULAR DE PEDIATRÍA DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

CERTIFICA: Que la presente Tesis, titulada “VARIACIÓN EN EL PERFIL DE MARCADORES DE INFECCIÓN ACTIVA Y CITOQUINAS TH1/TH2 EN MUJERES VHC POSITIVAS EN EL PERIODO POSTPARTO Y SU RELACIÓN CON LA TRANSMISIÓN VERTICAL”, de la que es autora Dña. Ana Abril Molina, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Apoyo a la Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Granada.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que: AUTORIZO la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 5 de Octubre de 2015.

Fdo. Dra. Ángeles Ruiz Extremera

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

DR. JOSE ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ, UNIDAD DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN COMPLEJO HOSPITALARIO DE GRANADA.

CERTIFICA: Que la presente Tesis, titulada “VARIACIÓN EN EL PERFIL DE MARCADORES DE INFECCIÓN ACTIVA Y CITOQUINAS TH1/TH2 EN MUJERES VHC POSITIVAS EN EL PERIODO POSTPARTO Y SU RELACIÓN CON LA TRANSMISIÓN VERTICAL”, de la que es autora Dña. Ana Abril Molina, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Apoyo a la Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Granada.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que: AUTORIZO la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 5 de Octubre de 2015.

Fdo. José Antonio Muñoz Gámez

Gracias a mi directores de tesis, Ángela y José Antonio, por su paciencia y comprensión. Por el gran entusiasmo con el que desarrolláis vuestro trabajo y que me habéis transmitido en todo momento, muchísimas gracias.

A Dr. Francisco Javier Salmerón Escobar, Catedrático del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada y a todo el grupo de investigación CTS-277; muchas gracias por vuestra encomiable labor, gracias por vuestro apoyo y por concederme el honor de formar parte de vuestro equipo.

Gracias a mi R chica Maria, amiga en la distancia, cuyo trabajo y dedicación han sido para mi una gran motivación y ayuda.

A Esther, mi querida compañera, gracias por saberme llevar en el día a día y por haberme enseñado tanto, de Medicina, de Pediatría y de la Vida.

A los pacientes; madres e hijos. Sin su generosidad no se podría haber realizado este trabajo.

A mi familia y amigos, ellos son el estímulo permanente que hace que cada día me siga proponiendo el conseguir nuevas metas, gracias a ellos estoy hoy aquí.

Abreviaturas

ADPV: Adictos a Drogas por Vía Parenteral

ARN: Ácido Ribonucleico

Ac-VHC: Anticuerpos del Virus de la Hepatitis C

CDC: Centres for Disease Control and Prevention

CH: Cirrosis Hepática

CHC: Carcinoma Hepatocelular

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica

CPA: Célula Presentadora de Antígenos

GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas

HCC: Hepatitis Crónica C

HLA: Antígeno leucocitario humano

IFN: Interferón

IFN-peg: Interferón pegilado

IL: interluquina

NR: No Respondedor

NS: No Estructurales

NK: Células Natural Killer

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PMN: Polimorfonucleares

RBV: Ribavirina

RVP: Respuesta Viroológica Precoz

RVR: Respuesta Viroológica Rápida

RVS: Respuesta Viroológica Sostenida

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

TV: Transmisión Vertical

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

Índice

1. INTRODUCCIÓN..1

1.1. Generalidades del VHC..3

1.1.1. Características virológicas..3

1.1.2. Genotipos y cuasi especies..5

1.2. Epidemiología del VHC..7

1.3. Historia Natural del VHC en el adulto y el niño..11

1.4. Tratamiento farmacológico de la hepatitis crónica por VHC..15

1.4.1. Indicaciones de tratamiento en el niño y en el adulto..16

1.4.2. Fármacos..18

1.4.3. Tipos de respuesta al tratamiento antiviral..23

1.4.4. Eficacia del tratamiento farmacológico en niños..26

1.4.5. Efectos adversos en niños..27

1.4.6. Factores de respuesta al tratamiento..28

1.5. Transmisión vertical del VHC y cronificación del VHC en el niño..32

1.5.1. Epidemiología del VHC en la gestante y el niño..32

1.5.2. Inmunología del embarazo y su relación con el VHC..33

1.5.3. Transmisión vertical del VHC..40

1.5.4. Factores de riesgo en la transmisión del VHC..41

1.5.5. Factores genéticos e inmunológicos en la transmisión del VHC..44

1.5.6. Perspectivas de tratamiento en el embarazo, puerperio y periodo neonatal..46

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS..49

2.1. Hipótesis..51

2.2. Objetivos..52

3. PACIENTES Y MÉTODOS..	53
3.1. Diseño del estudio..	55
3.2. Ámbito de estudio..	57
3.3. Sujetos de estudio..	58
3.3.1. Criterios de inclusión..	58
3.3.2. Criterios de exclusión..	58
3.4. Variables de estudio..	59
3.5. Recogida y análisis de datos..	60
3.6. Métodos..	61
3.7. Estudio estadístico..	63
3.8. Consentimiento informado de las pacientes..	63
4. RESULTADOS..	67
5. DISCUSIÓN..	111
6. CONCLUSIONES..	121
7. BIBLIOGRAFÍA..	125

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la partícula viral..2

Figura 2. Organización genómica del VHC..3

Figura 3. Distribución mundial de los distintos genotipos del virus C..6

Figura 4. Historia natural de la infección del virus C..10

Figura 5. Mecanismo de acción de los distintos grupos farmacológicos antivirales..18

Figura 6. Algoritmo diagnóstico terapéutico en el paciente con hepatitis crónica..19

Figura 7. Resumen del seguimiento evolutivo durante el tratamiento farmacológico..21

Figura 8. Activación del sistema inmune tras una infección viral..29

Figura 9. Células y citoquinas Th1 y Th2..31

Figura 10. Evolución de los niveles de ALT en gestantes anti-VHC positivas..60

Figura 11. Evolución temporal de la ALT, AST y GGT en gestantes VHC-ARN+ tipo A..61

Figura 12. Evolución temporal de la ALT, AST y GGT en gestantes VHC-ARN+ tipo B..61

Figura 13. Medida de la asociación entre el incremento de ALT y la elevación de la carga viral..62

Figura 14. Evolución de la ALT y la carga viral de las gestantes VHC-ARN (+) en parto vs tercer trimestre de gestación y 7–12 meses tras el parto..63

Figura 15. Carga viral en las madres VHC-ARN+ tipo A y B categorizadas en carga viral alta ó baja en el momento del parto..64

Figura 16. Transmisión vertical en función de la carga viral en el parto y del tipo de madre según niveles de ALT..67

Figura 17. Niveles de citoquinas en madres Ac-VHC (+): VHC-ARN (+) vs. VHC-ARN (-)..70

Figura 18. Niveles de citoquinas en madres Ac-VHC (+): VHC-ARN (+) Tipo A vs. Tipo B vs. VHC-ARN..72

Figura 19. Niveles de citoquinas en madres Ac-VHC (+) y VHC-ARN (+) Tipo A vs. Tipo B categorizadas por carga viral alta y carga viral baja..73

Índice de tablas

Tabla 1. Principales cambios en el sistema inmune durante la gestación..**30**

Tabla 2. Clasificación de las citoquinas dependiendo del perfil de linfocito T que las libera..**32**

Tabla 3. Características clínicas y epidemiológicas de las mujeres Ac-antiVHC+..**58**

Tabla 4. Características de las mujeres VHC-ARN+ categorizadas en tipo A y tipo B..**65**

Tabla 5. Características de las mujeres que aclaran el VHC en el periodo posparto..**68**

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del VHC

La historia del virus de la hepatitis C (VHC) es reciente, fue identificado y caracterizado en 1989, cuando se comprobó que la mayor parte de casos de hepatitis no A y no B estaban causados por el mismo virus: VHC. Desde entonces se han llevado a cabo múltiples investigaciones para conocer su biología, los distintos genotipos existentes y sus mecanismos patogénicos.

La prevalencia de la infección por VHC alcanza un 2-3% en nuestro medio, siendo los genotipos más prevalentes en España el 1a y el 1b. También es el genotipo más frecuente en otros países como Estados Unidos o Japón. Los genotipos 2 y 3 se encuentran distribuidos de manera más uniforme por todo el mundo, el 4 es habitual en Oriente Medio y África Central, el genotipo 5 en Sudáfrica y el 6 en Asia principalmente.

El desarrollo de una infección persistente es una de las características más importantes del VHC: más del 80% de los individuos que presentan primoinfección por VHC evolucionarán a la cronicidad. De hecho, el VHC se ha convertido en la causa principal de hepatitis crónica, cirrosis hepática (CH), carcinoma hepatocelular (CHC) y es la indicación más frecuente de trasplante hepático en adultos [1].

1.1.1 Características virológicas

El VHC es un virus ARN que pertenece a la familia *Flaviviridae*. Esta familia incluye patógenos que afectan a humanos y animales y está compuesta al menos por tres géneros: *Pestivirus*, *Flavivirus* y *Hepacivirus*; de éste último grupo el único miembro es el VHC.

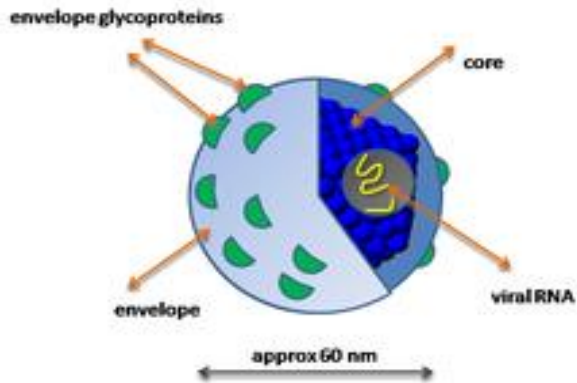


Figura 1. Estructura del VHC

La partícula viral (virión) del VHC es de pequeño tamaño (alrededor de 60 nm de diámetro) y está recubierta por una envoltura lipídica (Figura 1). El genoma del VHC está compuesto por una única cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva, con una longitud aproximada de 9.600 nucleótidos. Este genoma se encuentra rodeado por una nucleocápside icosaédrica (core), que a su vez está recubierta por una envoltura lipídica en la que se encuentran dos glicoproteínas (E1 y E2). Éstas glicoproteínas presentan un alto grado de heterogeneidad genética y están implicadas en la unión del VHC a los receptores de las células del huésped para su posterior fusión y entrada al citoplasma celular [2]. El core y las glicoproteínas E1 y E2, forman el grupo de proteínas estructurales, los genes que las codifican se encuentran localizados en el extremo 5' del ARN viral (Figura 2). Estudios in vitro han demostrado que la proteína del core podría interactuar con protooncogenes de las células del huésped, determinando el desarrollo del CHC en pacientes con infección crónica por el VHC [3].

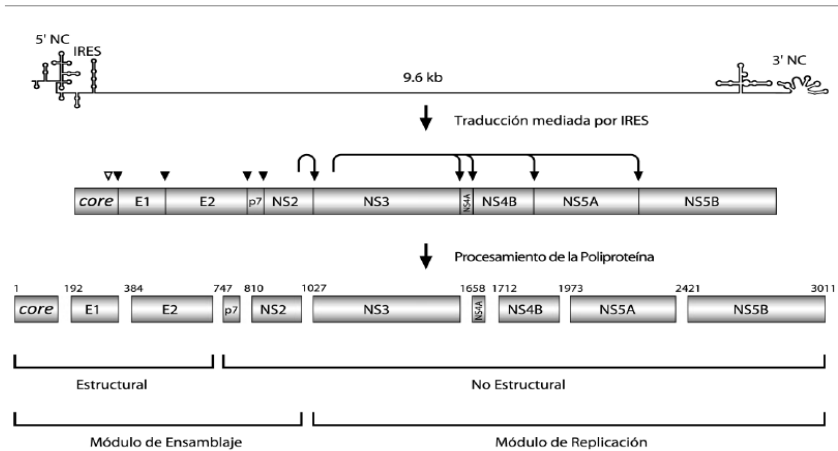


Figura 2. Organización genómica del VHC y procesamiento de las poliproteínas. En la parte superior se esquematiza el ARN+ genómico de 9,6Kb. Los números corresponden a la posición del primer aminoácido de cada proteína madura dentro de la poliproteína. C: nucleocápside. E1 y E2: glucoproteínas de envoltura. NS1 y NS2: proteínas transmembrana. NS3: metaloproteasa-serinproteasa-ARN helicasa. NS4A y NS4B: cofactores. NS5A: proteínas resistentes al IFN. NS5B: ARN Polimerasa.

El grupo de las proteínas no estructurales (NS) está formado básicamente por proteínas con actividad proteasa, helicasa y polimerasa necesarias para la replicación viral.

Por otro lado, la región NS5A se ha relacionado con la modulación de la respuesta antiviral del huésped mediada por el interferón (IFN). En concreto, se ha observado que la acumulación de mutaciones en una determinada región de NS5A, la conocida como ISDR (*Interferon Sensitivity Determining Region*), se relaciona con una mejor respuesta al tratamiento con IFN en pacientes infectados por el genotipo 1b del VHC [4-7].

1.1.2 Genotipos y cuasiespecies

La variabilidad genética del VHC se describe bajo dos conceptos: los genotipos y las cuasiespecies. Se habla de genotipo en referencia a la heterogeneidad de secuencias entre diferentes individuos y de cuasiespecies cuando nos referimos a la heterogeneidad genética en un mismo individuo. En este contexto, se han descrito seis genotipos principales (del 1 al 6) y más de 50 subtipos o subgenotipos (Ej.: 1a, 1b, 2a...).

La distribución de los distintos genotipos varía a nivel de las distintas áreas geográficas: Los genotipos más frecuentes en Estados Unidos y Europa Occidental son el 1a y el 1b, seguidos de los genotipos 2 y 3.

Los genotipos virales no son determinantes de gravedad en la enfermedad, sin embargo si se asocian a distinto grado de respuesta a los fármacos que existen en la actualidad para el tratamiento de la infección crónica. Por tanto en la práctica clínica la determinación del genotipo viral es de gran utilidad, y en función de cual se trate esta indicada una pauta terapéutica específica. Además podremos estimar el grado de respuesta al tratamiento que debemos esperar. La duración del tratamiento también debe ser ajustada como se describirá más adelante en función del genotipo viral [8]. En definitiva, la determinación del genotipo viral posibilita individualizar el tratamiento de cada enfermo y realizar una estimación pronóstica.

Una de las características más importantes y con mayor implicación en la patogenia de la infección por el VHC es su gran heterogeneidad genética a nivel del propio individuo infectado. Este fenómeno es debido a defectos en la actividad reparadora de la ARN polimerasa dependiente de ARN y a la ausencia de actividad exonucleasa 5'-3'. El resultado es la aparición de variantes genómicas que difieren de la población viral original y que se denominan en su conjunto cuasiespecies. La cuasiespecie predominante será aquella que presenta una mayor capacidad replicativa en el huésped.

En los virus ARN, las regiones que presentan mayor variabilidad genética son aquéllas expuestas a la acción del sistema inmune, de tal manera que se ha propuesto que la variación antigénica es el resultado directo de la selección de variantes como respuesta a la inmunidad humoral y celular. En la región codificadora, los genes de envoltura E1 y E2, conocidos como región hipervariable 1 (HVR-1) muestran la mayor variabilidad genética; sin embargo en la región codificadora de la proteína del core, la región 5'-NRT y fragmentos de 3'-NTR, están altamente conservados.

La diversidad de las cuasiespecies del VHC puede por tanto contribuir al desarrollo de la cronicidad durante la infección debido a los rápidos cambios que se suceden en las proteínas de la envoltura viral como mecanismo de escape a la presión inmune ejercida por el huésped. Esta diversidad también tendrá importancia en el diseño y desarrollo de

vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento y diseño e interpretación de los métodos diagnósticos.

1.2 Epidemiología

El VHC es un problema de salud a nivel mundial, con una elevada prevalencia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hoy en día existen más de 185 millones de personas en el mundo infectadas por el VHC, un tercio de estos casos serán enfermos crónicos con un alto riesgo de desarrollar cirrosis o carcinoma hepatocelular y de ellos 350.000 fallecerán cada año a causa de la enfermedad [9].

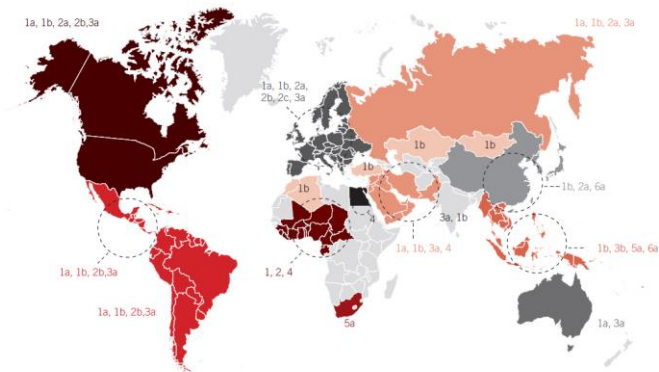


Figura 3: Distribución mundial de los distintos genotipos del VHC.

A pesar de la alta prevalencia a nivel mundial, la mayor parte de los infectados desconocen su situación e incluso a pesar de conocer su enfermedad para muchos de ellos el tratamiento resultará inaccesible. Estos datos contrastan fuertemente con el hecho de que en la actualidad se trata de una enfermedad con altas probabilidades de curación gracias a los importantes avances en investigación que se ha llevado a cabo desde el descubrimiento de la partícula viral.

Los últimos datos epidemiológicos recogidos por el Dr. Lavanchy y publicados en febrero de 2011 [10], indican que la prevalencia de infección es muy variable entre las distintas áreas geográficas: el país que registra una mayor prevalencia de personas con anticuerpos del VHC (Ac-VHC) es Egipto, con un 14% de la población Ac-VHC (+). Sin contar

aquellas áreas donde aunque se sospeche una alta prevalencia, no existen datos suficientes al respecto, por no disponer de la infraestructura y los medios económicos necesarios para su determinación.

Por tanto, la prevalencia real de la enfermedad a nivel mundial seguramente sea mucho mayor de la estimada y sigue siendo necesaria la realización de estudios epidemiológicos universales para conocer cual es el verdadero alcance de la situación (Figura 3).

A nivel mundial, se han identificado tres patrones epidemiológicos diferentes según las distintas regiones geográficas:

1) Países como Estados Unidos y Australia donde las personas infectadas por el VHC tienen actualmente una edad de entre 39 y 40 años. Esto es indicativo de que la principal transmisión de VHC ocurrió en el pasado, de forma predominante entre adultos jóvenes infectados vía parenteral (en adictos a drogas de administración intravenosa);

2) Áreas como Japón o el sur de Europa donde la prevalencia de infección por VHC es mayor en personas de edad avanzada, lo que sugiere que el riesgo de transmisión del VHC fue mucho más elevado en décadas pasadas (hace más de 30 años).

3) Países como Egipto, donde se observan tasas elevadas de infección similares en todos los grupos de edad, lo que sugiere que el riesgo de adquirir el VHC se mantiene en la actualidad similar a décadas pasadas.

En España se ha descrito una prevalencia en la población general de aproximadamente del 2% con algo más de 900.000 personas afectadas y en concreto en la subpoblación de gestantes está alrededor del 0,5-1,4% [11,12]. El genotipo 1 es el responsable en el 70% de los casos en la población española, también en mujeres embarazadas.

El VHC genera un alto coste sanitario. Los estudios realizados en países desarrollados demuestran que el VHC es en la actualidad el agente etiológico implicado en el 20% de las hepatitis agudas en adultos, el 70% de las hepatitis crónicas, el 40% de las cirrosis hepáticas, el 60% de los CHC y el 30% de los trasplantes hepáticos. Se trata por

tanto de una de las principales causas de cirrosis hepática y una de las principales indicaciones del trasplante hepático en adultos.

También hay estudios que describen complicaciones obstétricas asociadas a la infección VHC: rotura prematura de membranas, parto pretérmino, recién nacidos con bajo peso o desarrollo de colestasis. Aunque esta asociación es controvertida y otros autores afirman que en ausencia de cirrosis e hipertensión portal, la mayoría de las mujeres infectadas por VHC no experimentan complicaciones obstétricas.

En la actualidad, aunque los mecanismos de transmisión del VHC no son del todo conocidos, las principales vías de transmisión a nivel mundial son la parenteral en el adulto y la vertical en el niño [13].

- **Transmisión parenteral:** es la vía más efectiva en el paciente adulto y en la actualidad la principal, fundamentalmente en países subdesarrollados. Las transfusiones de hemoderivados antes de la década de los noventa y el uso compartido de jeringuillas fueron también las vías más importantes de transmisión en los países desarrollados, pero gracias a los controles sanitarios actuales para la detección del VHC en hemoderivados casi ha desaparecido el riesgo de contagio mediante esta vía en los países de nuestro medio.
- **Transmisión sexual:** en Estados Unidos el 15-20% de los casos de infección aguda del VHC se atribuyen a esta vía. En Egipto la transmisión sexual ha sido confirmada mediante análisis filogenético del virus en el 15% de las parejas sexuales de individuos con infección aguda del VHC. Diferentes estudios han demostrado que el riesgo de contagio por esta vía se incrementa con el mayor número de parejas sexuales, conductas de alto riesgo y el no usar anticonceptivos tipo barrera. No se sabe con certeza si la coinfección por VIH aumenta el riesgo y son necesarios más estudios epidemiológicos para conocer con más profundidad esta vía de transmisión.
- **Transmisión vertical (TV):** en la actualidad en los países desarrollados es la principal vía de contagio en los niños. Los factores de riesgo conocidos son la alta carga viral en el parto y la coinfección VIH materna. Sin embargo estos dos factores son insuficientes para explicar todos los casos de TV, lo que justifica la necesidad de seguir investigando

con el objetivo de poder establecer en el futuro medidas efectivas y recomendaciones para minimizar el riesgo de TV.

- **Otras vías de transmisión:** técnicas de esterilización inadecuadas de material odontológico, material no desechable ó no desinfectado empleado en barberías, peluquerías y salones de belleza. Todas ellas prácticas de riesgo que continúan siendo muy frecuentes desgraciadamente en países en vías de desarrollo.
- La hepatitis C no se transmite a través de la leche materna, los alimentos o el agua, ni por contacto ocasional con una persona infectada (abrazos, besos, comidas compartidas...)

1.3 Historia natural de la infección por VHC

Historia natural en el adulto

La **infección aguda** por VHC se define como la aparición de una nueva viremia con conversión de VHC-ARN negativo a VHC-ARN positivo. La infección aguda suele ser asintomática, tan sólo un 25% de las hepatitis agudas son clínicamente sintomáticas y suelen manifestarse con clínica inespecífica: astenia, anorexia, náuseas e ictericia. La forma fulminante es excepcional. El ARN se puede detectar en el suero en casi todos los pacientes entre la primera y la segunda semana post-exposición. La seroconversión aparece entre los 2 y los 6 meses post-exposición (período ventana) o más tarde en ciertos grupos de riesgo, por lo que la detección de anticuerpos es menos fiable que la detección de ARN para el diagnóstico precoz.

La fase aguda de la infección se considera como los primeros 6 meses tras el contagio y en esta fase de la enfermedad el aclaramiento del virus es posible: Entre el 15 y 40% de los pacientes con hepatitis aguda consiguen en los primeros seis meses tras el contagio la resolución espontánea de la enfermedad [14], definiéndose ésta como la negativización del ARN-VHC en suero acompañado de la normalización de los niveles de transaminasas.

La positividad de los anticuerpos se desarrolla en la infección aguda y persistirá el resto de la vida. Por tanto cuando se detectan los anticuerpos, es necesario determinar ARN-VHC y si esta determinación es positiva confirma la infección crónica.

De los más de 500.000 nuevos casos de cáncer de hígado que se diagnostican cada año a nivel mundial, el 22% (> 100.000) son atribuibles a infección por el VHC. Los factores predictivos de curación tras una hepatitis aguda son la aparición de ictericia en la fase aguda y el sexo femenino (20%) [15, 16].

Entre el 55-80% de los casos de hepatitis aguda C progresan hacia la cronicidad; el 15-30% de estos desarrollan cirrosis hepática y en dos o tres décadas el 1-5% desarrollará cáncer de hígado. El consumo de alcohol, el sexo masculino, la edad en el momento de la primoinfección, los niveles de transaminasas y la coinfección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) u otros virus hepatotropos como el VHB, parecen estar asociados con una progresión más rápida hacia la fibrosis. Son necesarios nuevos estudios longitudinales prospectivos para determinar si otros factores, como la esquistosomiasis, clonorquiasis o la exposición a disolventes tóxicos (muy frecuentes en muchos países en desarrollo), pueden estar también asociados con la progresión de la enfermedad.

Además la enfermedad puede tener manifestaciones extrahepáticas como crioglobulinemia, glomerulonefritis, tiroiditis, resistencia a la insulina/diabetes tipo II y alteraciones cutáneas como porfiria tarda o liquen plano. También es conocido que las personas con enfermedad crónica tienen mayor riesgo de desarrollar disfunciones cognitivas, fatiga y depresión aunque los mecanismos fisiopatológicos no están claramente establecidos.

Es decir, hay una necesidad urgente de más información sobre la evolución a largo plazo, las consecuencias, el coste y la carga sanitaria de esta enfermedad a nivel mundial.

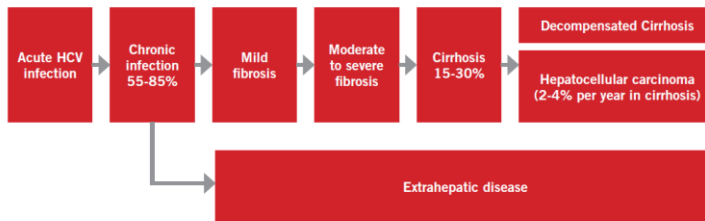


Figura 4. Historia natural de la infección por VHC

Historia natural de la infección por VHC en el niño

La causa más común de hepatitis crónica viral en el niño en los países desarrollados es la infección por VHC. Con las mejoras en la detección de VHC en hemoderivados y la prevención de otros mecanismos de transmisión parenteral, el mecanismo más común de transmisión en este grupo de edad es la transmisión perinatal. Las estimaciones más conservadoras indican que de 10.000 a 60.000 recién nacidos al año pueden ser infectados por el VHC en todo el mundo debido a la TV.

La infección aguda en el niño es fundamentalmente asintomática a diferencia que en el adulto, de manera que no se han descrito casos de hepatitis icterica aguda ni asociada a otra sintomatología importante. El único signo clínico descrito, sin que realmente se haya demostrado que se encuentre directamente relacionado con la infección, ha sido la hepatomegalia.

La eliminación espontánea del VHC puede ocurrir hasta en un 25-30% de los niños y es posible hasta los 3 años de edad. La tasa de eliminación no depende de la vía de contagio (transmisión vertical o parenteral). Sin embargo, una edad más temprana en la normalización de los niveles de ALT, el genotipo 3 y unas transaminasas superiores a 5 veces el valor normal si se han relacionado con una mayor tasa de aclaramiento del virus [17, 18].

Respecto a la evolución de la infección crónica en el niño a largo plazo, no existen suficientes datos que muestren las tasas de carcinoma hepatocelular o cirrosis en pacientes que contrajeron la infección por TV. En un estudio de 80 niños españoles e italianos, las

biopsias hepáticas mostraron los siguientes resultados respecto al grado de hepatitis crónica: hígado normal o lesiones mínimas no específicas (17,5%), hepatitis crónica con bajo grado de actividad (60%) y con alto grado de actividad (21%). En cuanto a la fibrosis: no se apreció fibrosis en el 27,5% de los casos, fue leve en el 55%, moderada en el 16,5% y sólo hubo un caso de CH entre los 80 niños [19]. Estos datos contrastan con los de la población adulta, pues aproximadamente el 10-20% de los pacientes con VHC pueden llegar a desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular.

Las directrices actuales de la CDC para el diagnóstico de TV en el niño recomiendan la determinación por PCR del ARN viral a partir de los 2 meses después del nacimiento, pues a edades más tempranas existe una alta tasa de falsos positivos. La determinación de anticuerpos en niños nacidos de madres infectadas no tiene validez hasta después de los 18 meses de vida, ya que los anticuerpos detectados previamente serán de la madre, adquiridos pasivamente vía trasplacentaria durante la gestación. En este sentido, la Red Europea Pediátrica del VHC estudió de forma prospectiva a 357 niños expuestos al VHC y encontró que la sensibilidad de la PCR para la detección del ARN del VHC fue del 22% al nacer, aumentando espectacularmente al 70-85% después del primer mes de vida. Este estudio también mostró que el valor predictivo positivo de la PCR fue del 33% al nacer, aumentando al 78% a los 9 meses de edad, mientras que el valor predictivo negativo aumentó del 96% al 99% [20]. Éstos resultados podrían atribuirse a una carga viral muy baja y no detectable en el primer mes de vida y por que el período de incubación del VHC es muy variable (desde 2 semanas a 6 meses). Por tanto la negatividad de la PCR al nacer no es un indicador adecuado de transmisión vertical y una PCR negativa después de los 12 meses de edad debe ser confirmada con el nivel de Ac-VHC para detectar a los niños que aunque se infectaron aclaran el virus posteriormente [21].

1.4 Tratamiento farmacológico de la hepatitis crónica por VHC

Tal y como afirma la OMS, todos los adultos y niños con infección crónica por VHC deben de ser asesorados sobre las posibilidades de tratamiento antiviral.

Hasta el año 2011 el tratamiento estándar de la hepatitis C se realizaba con dos fármacos: ribavirina, un análogo sintético de nucleósidos e interferón alfa pegilado (IFN-

peg). Respecto a la eficacia de esta terapia combinada tanto en estudios realizados en Europa como en Estados Unidos fue sólo eficaz en el 42-52% de los pacientes infectados con el genotipo 1. Hasta el 5% de los pacientes infectados en el genotipo 2 ó 3 tienen una nula respuesta al tratamiento sin conocerse las causas. Además este régimen terapéutico tiene elevadas tasas de efectos adversos potencialmente graves.

En niños, una revisión sistemática sobre la respuesta virológica y efectos adversos de la terapia combinada con IFN-peg y RVB, encontró tasas de RVS similar a las de los adultos (entre el 30 y 100%) y como principales efectos adversos los síndromes pseudogripales y la neutropenia [22].

Desde 2011 hasta la actualidad asistimos a una gran revolución en el tratamiento de la enfermedad con los inhibidores de la proteasa NS3/4A: boceprevir, telaprevir y simeprevir y con los inhibidores de la proteasa NSSB (sofosbuvir). Estas nuevas generaciones terapéuticas han supuesto una revolución en el tratamiento de la enfermedad pues aportan numerosas ventajas, fundamentalmente por su alto nivel de eficacia y de respuesta en los pacientes con el genotipo 1 (el más habitual en España) y su menor tasa de efectos secundarios.

Aunque los costes de producción de estos agentes son bajos, los precios actuales fijados por los fabricantes son muy elevados y probablemente dificultarán el acceso a los mismos incluso en países de alto nivel de desarrollo económico.

Desde sofosbuvir (para el que se ha descrito tasas de curación del 90%), solo en 2014 y lo que va de 2015 se han aprobado hasta cinco nuevas terapias para combatir esta enfermedad: simeprevir, daclatasvir, la combinación de lepidipasvir y sofosbuvir y la última de paritaprevir, ritonavir, dasbuvir y ombastasvir. Fármacos revolucionarios cuya efectividad roza el 100 por 100. En niños por el momento no está aprobado el uso de ninguno de estos fármacos.

Además el tratamiento actual se enfoca no solo a la eliminación del virus, sino a detener la progresión de la enfermedad hepática crónica y a disminuir el número de personas infectadas. Para conseguir dichos objetivos es fundamental conocer la cinética viral y los factores implicados en los distintos mecanismos de contagio ya que no existe en

la actualidad vacuna para prevenir la transmisión del virus y la medida preventiva más eficaz continua siendo minimizar el riesgo de exposición al mismo.

1.4.1 Indicaciones de tratamiento farmacológico en el niño y en el adulto

En general, debe ser tratado todo paciente con HCC no tratado previamente que lo desee [22]. Aunque existen contraindicaciones absolutas:

- Depresión o psicosis no controlada.
- Epilepsia o enfermedad autoinmune no controlada.
- Cirrosis descompensada (Child-Pugh \geq B7 ó B6 si coinfección VIH).
- Mujeres embarazadas y las mujeres en edad fértil que se nieguen a usar métodos anticonceptivos durante el tratamiento.
- Mujeres durante el periodo de lactancia.
- HTA, insuficiencia cardiaca u otras condiciones médicas como diabetes mal controladas.
- Pacientes trasplantados de órganos sólidos (excepto hepático).
- EPOC.
- Hipersensibilidad a los fármacos disponibles.
- Pacientes menores de 2 años.

A pesar de que el embarazo es una contraindicación para el tratamiento farmacológico, no están establecidas recomendaciones ni guías de actuación para la prevención de la transmisión vertical (siendo la vía de contagio más frecuente en niños y asociada con una mayor incidencia de enfermedad hepática crónica.) [23].

Además en el niño las indicaciones de tratamiento son todavía controvertidas debido distintas razones: 1) no se conoce a fondo la historia natural de la enfermedad en la

edad pediátrica, 2) la enfermedad tiene buena evolución desde el punto de vista clínico e histológico en este periodo de la vida y 3) el tratamiento no está exento de efectos secundarios potencialmente graves (alteraciones tiroideas, diabetes, pancitopenias...)

Por otro lado, una buena razón para tratar durante la edad pediátrica podría ser el que potencialmente las probabilidades de curación de la enfermedad sean mayores, sobre todo en aquellos pacientes con genotipo no 1 que tienen una mejor respuesta al tratamiento.

Actualmente se recomienda tratar a los niños a partir de los 2 años con enfermedad crónica por VHC y que presenten signos de mal pronóstico (fibrosis hepática establecida). Aunque es necesario independientemente de que se trate o no realizar siempre un estrecho seguimiento de la enfermedad en el niño.

1.4.2 Fármacos

Interferón pegilado (IFN-peg): los IFNs son glicoproteínas producidas por distintos tipos celulares como respuesta a un estímulo, sobre todo a las infecciones víricas. El IFN α es un polipéptido no glicosilado producido por monocitos, leucocitos y linfocitos B como respuesta a infecciones víricas con la función de mediar la respuesta inmune inespecífica.

Posee dos acciones fundamentales:

-Antiviral directa: se manifiesta inhibiendo la replicación viral, transmitiendo señales al interior de la célula a través de receptores situados en la superficie celular.

-Inmunomoduladora: incrementando la expresión de moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA) en la membrana de los hepatocitos y facilitando que los linfocitos T citotóxicos (Linfocitos Tc) reconozcan y eliminen las células infectadas, además de estimular la inmunidad innata (células NK) [24].

La pegilación de una proteína consiste en su unión a una molécula de polietilenglicol para disminuir su aclaramiento y así prolongar su vida media, obteniendo una mejoría considerable tanto en la farmacocinética como en la farmacodinamia. El que se

utiliza específicamente en el tratamiento actual es el IFN pegilado α (IFN-peg), que tiene la ventaja de que se administra sólo una vez por semana, tiene menos efectos secundarios y consigue una mayor y más eficaz supresión de la actividad viral en comparación con la administración del IFN estándar (que además se administraba tres veces por semana).

Hay dos tipos de IFN, el $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$. Son varios los estudios que comparan la eficacia de ambos combinados con RBV. Una revisión sistemática realizada por Cochrane [24] sobre ensayos clínicos aleatorizados en los que se comparaban los dos tipos de IFN-peg con respecto a las tasas de RVS, confirmó las ventajas del IFN $\alpha 2a$, mientras la incidencia y el tipo de acontecimientos adversos descritos son similares [25,26].

Los efectos secundarios más frecuentes del IFN α son los síndromes pseudogripales y la depresión. También puede aparecer neutropenia, anemia y plaquetopenia, alteraciones de la función tiroidea, alopecia, artralgias, anorexia, neumonitis y alteraciones oftalmológicas como retinopatía ó papiledema.

Ribavirina (RBV): es un análogo de nucleósido (guanosina) utilizado también en el tratamiento del VIH. Su incorporación a la terapia frente a VHC mejoró sustancialmente los porcentajes de respuesta viral sostenida (RVS), incrementando por un lado la proporción de casos que aclaraban el virus y disminuyendo por otro el número de recaídas.

La RBV tiene un efecto sinérgico al IFN α aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud. Los hepatocitos infectados producen una liberación de viriones infecciosos y no infecciosos. El IFN inhibe la replicación del VHC y la RBV introduce mutaciones dentro del genoma VHC e incrementa la producción de viriones no infecciosos. Las células diana del virus, los hepatocitos sanos, pueden ser atacadas por los viriones infecciosos pero no por los no infecciosos [27]. Se piensa que al igual que IFN, la RBV favorece la respuesta inmunológica estimulando a los linfocitos NK y linfocitos T (Figura 5).

La RBV también puede actuar a través de un mecanismo no citolítico, facilitando la recuperación de las células infectadas sin destruirlas. Esto explicaría por qué la RBV tiene ese efecto denominado “cosmético” (normalización de las transaminasas).

Su efecto adverso más frecuente es la anemia hemolítica y es teratogénico.

Inhibidores de la proteasa NS3/4A: Son muchos los inhibidores de la proteasa NS3/4A que están en desarrollo para el tratamiento de la infección crónica del VHC. Se ha demostrado que tienen una potente acción antiviral, pero también presentan una baja barrera genética de resistencia, lo que condiciona la selección de mutaciones de resistencia y la recidiva durante la monoterapia. No obstante, las resistencias se pueden eliminar prácticamente si se combinan con IFN-peg y RBV. Los dos fármacos que están ya aprobados para su uso son telaprevir y boceprevir. El telaprevir tiene una potente acción antiviral pero en los estudios en fase 1 se demostró que durante la segunda semana aparecía una recidiva virológica (*breakthrough*) debido a la aparición de mutaciones, por lo que la monoterapia no es efectiva. Afortunadamente estas mutaciones son sensibles al tratamiento combinado con IFN-peg y RBV.

Otro aspecto importante es que la reducción de la carga viral es mucho menor en los pacientes con genotipo 2, 3 y 4 (-3,9, -0,5 y -0,9 log₁₀ UI/ml, respectivamente); por lo que estos fármacos no están indicados para el tratamiento de pacientes con estos genotipos. La reducción de la carga viral con 400 mg cada 8 horas de boceprevir es menor (-2,1 log₁₀ UI/ml); no obstante la dosis recomendada de este fármaco en la práctica clínica es de 800 mg cada 8 horas. Actualmente existen varios ensayos clínicos en fase 2 y 3, tanto en pacientes *naive* no tratados previamente como en pacientes no respondedores con resultados esperanzadores [28]. No hay estudios en niños, por lo que de momento su uso solo está aprobado para mayores de 18 años.

A pesar de que su asociación al tratamiento estándar mejora la eficacia del mismo, también se incrementan las posibilidades de efectos adversos: telaprevir puede causar reacciones cutáneas y /o prurito. Boceprevir se asocia con disgeusia y rash.

Simeprevir también pertenece a este grupo terapéutico y su combinación con IFN-peg/RBV ha demostrado aumentar las tasas de RVS en pacientes infectados con genotipo 1. Su uso está aprobado en la actualidad exclusivamente en Estados Unidos y Canadá y sus indicaciones serían la combinación junto a terapia estándar para pacientes con genotipo 1b ó 1a sin polimorfismo Q80k (la mutación reduce su eficacia y es necesario su determinación antes de indicar el tratamiento, esto supone una dificultad para hacer uso del fármaco en

países con escasos recursos económico-sanitarios). Su efecto secundario más frecuente es la fotosensibilidad, también aumenta el riesgo de neutropenia, anemia y trombopenia.

Inhibidores de la polimerasa NS5B: Sofosbuvir. Este fármaco asociado a RBV +/- IFN-peg presenta tasas más elevadas de RVS en pacientes infectados por los genotipos 1,2, 3 y 4 que la terapia estándar exclusiva. Además sofosbuvir junto con RBV son los únicos fármacos que pueden administrarse vía oral en el tratamiento de la enfermedad crónica por VHC. Las tasas de RVS al asociarlo al tratamiento son superiores al 90%. Su administración en caso de infección por los genotipos 1 y 2 puede beneficiar a los pacientes a una menor duración de tratamiento con IFN-peg y en caso de los genotipos 2 y 3 incluso evitar su administración y las dificultades y toxicidad de IFN. En pacientes en los que se prevé una escasa adherencia al tratamiento podría tratarse de un fármaco a valorar. Su eficacia en los genotipos 5 y 6 esta aun pendiente de ser estudiada.

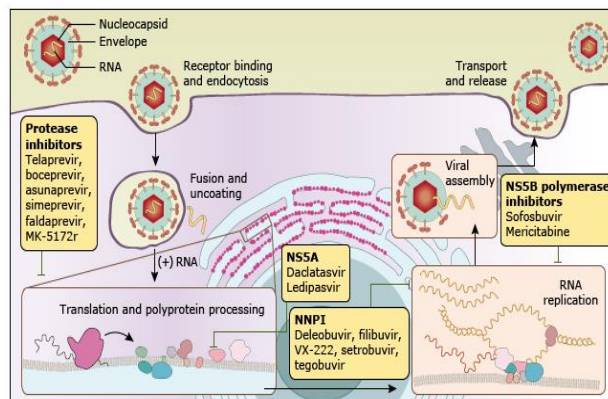


Figura 5. Mecanismo de acción de los fármacos antivirales

Las recomendaciones actuales para utilizar los distintos fármacos disponibles son:

-INF-peg y RVB: tratamiento estándar recomendado para la infección crónica por VHC. Durante 48 semanas para los genotipos 1 y 4 (72 semanas si se produce respuesta virológica retardada ó de 24 semanas si la respuesta virológica es rápida). Para los genotipos 2 y 3 se mantendrá durante 24 semanas y 48 semanas en pacientes con fibrosis o cirrosis avanzada, coinfectados con VIH y en aquellos que se aprecia una respuesta viral enlentecida.

-Telaprevir o boceprevir en combinación con INF-peg y RVB: se recomienda para el tratamiento del genotipo 1 mejor que la terapia estándar exclusiva.

-Sofosbuvir en combinación con RVB con o sin INF-peg se recomienda para los genotipos 1, 2, 3 y 4 mejor que la terapia estándar exclusiva:

-Genotipo 1 y 4: sofosbuvir/RBV/ PEG-IFN durante 12 semanas.

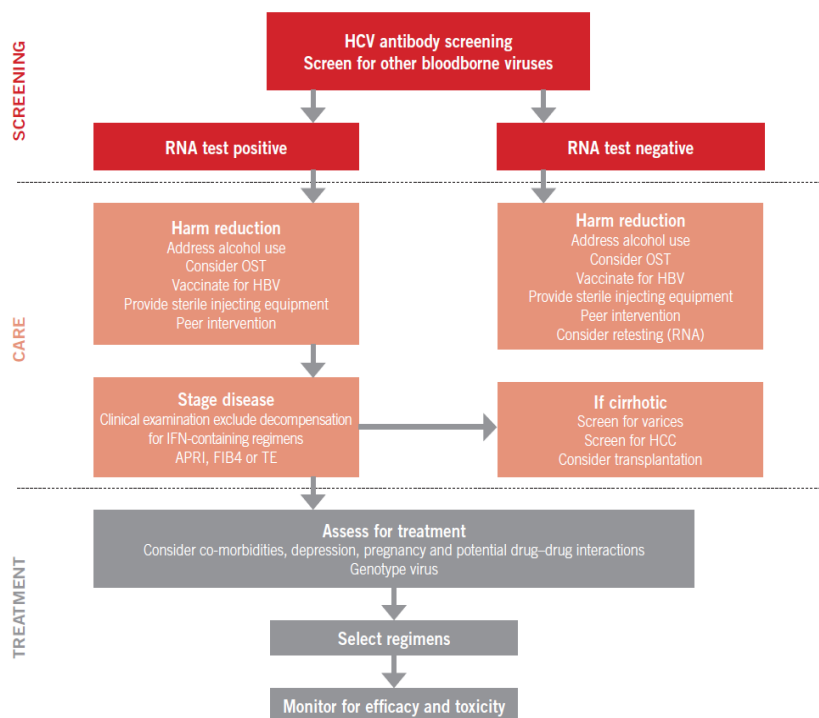
-Genotipo 1 en pacientes intolerantes a IFN: sofosbuvir/RBV durante 24 semanas.

-Genotipo 2: sofosbuvir/RBV 12 semanas.

-Genotipo 3: sofosbuvir/RBV 24 semanas ó PEG-IFN/RBV/sofosbuvir 12 semanas.

-Simeprevir en combinación con la terapia estándar se recomienda para personas con genotipo 1b VHC y genotipo 1 sin el polimorfismo Q80K .

Además todo paciente en tratamiento requiere controles periódicos para monitorizar la toxicidad de los fármacos y su eficacia. Siendo necesario tanto estudios de laboratorio como revisiones clínicas periódicas.



APRI aminotransferase/platelet ratio index; HBV hepatitis B virus; HCC hepatocellular carcinoma; HCV hepatitis C virus; IFN interferon; OST opioid substitution therapy; TE transient elastography

Figura 6. Algoritmo diagnóstico terapéutico de pacientes HCV.

1.4.3 Tipos de respuesta al tratamiento antiviral

La respuesta al tratamiento se define por distintos tipos de parámetros:

- 1) Parámetros bioquímicos, como la normalización de las transaminasas;
- 2) Parámetros virológicos: ausencia de ARN-VHC;
- 3) Parámetros histológicos valorados por la mejoría en los índices de actividad inflamatoria hepática.

La monitorización del grado de respuesta al tratamiento de cada paciente es fundamental para decidir que fármacos utilizar, a qué dosis y qué duración debe tener,

permitiendo de esta manera individualizar la terapia, mejorar su eficacia y reducir los costes.

Respuesta tras 4 semanas de tratamiento ó respuesta virológica rápida (RVR-4s): se define como ARN-VHC indetectable en este periodo de tiempo, y se ha reconocido como uno de los factores predictivos de RVS independientes más importantes [29].

Respuesta tras 12 semanas de tratamiento o respuesta virológica precoz (RVP): definida como la disminución de la carga viral $>2\log_{10}$ o ARN indetectable en la semana 12, se utiliza como el principal factor para tomar decisiones acerca del tratamiento. Así por ejemplo en pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC que han presentado una RVP parcial (descenso $>2\log_{10}$ pero con ARN detectable en la semana 12) lograban una RVS en un 17-29% con IFN-PEG/RBV durante 48 semanas, en cambio, este subgrupo de pacientes “respondedores lentos” se beneficiaban de una ampliación de la duración del tratamiento combinado a 72 semanas [30, 31] (Figura7).

Respuesta tras 24 semanas de tratamiento: los pacientes que cumplen criterios de RVP pero que mantienen niveles de ARN viral detectables en la semana 24 no alcanzarán RVS en el 98-100% de los casos, por lo que se recomienda la interrupción del tratamiento en esta situación (Figura 7).

La RVS es la ausencia de ARN del VHC y normalización de las transaminasas tanto al final del tratamiento como a los 6 meses de seguimiento. Lograr una RVS es sinónimo de curación, que conlleva una mejoría paulatina de la lesión hepática y desaparición del riesgo de desarrollar complicaciones relacionadas con la hepatitis C.

La **recaída** se define como la normalización de los valores antes citados al término del tratamiento, pero con reaparición del ARN-VHC en el control semestral.

Los **no respondedores (NR)** se definen como aquéllos pacientes que presentan un descenso de menos de 2 logaritmos en los valores de ARN-VHC durante las 12 primeras semanas de tratamiento y/o la persistencia del mismo a partir de la semana 24 de tratamiento (Figura 7).

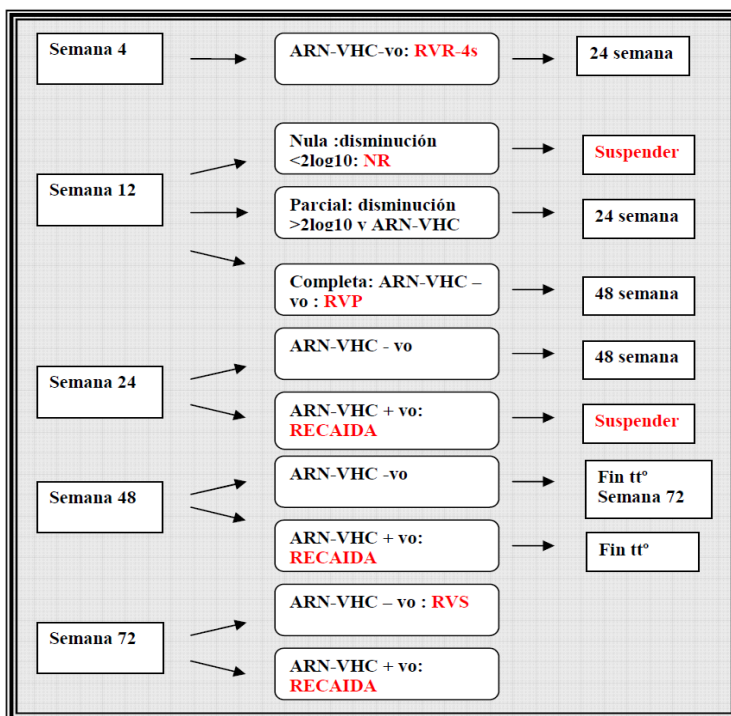


Figura 7. Resumen del seguimiento evolutivo durante el tratamiento

En pacientes con genotipo 1 previamente no tratados (*naive*), el tratamiento combinado con IFN-peg y RBV consigue una RVS del 50-55%. Los pacientes con genotipos 2 y 3 consiguen una tasa de RVS alrededor del 80%, y con menor tiempo de tratamiento [32-34]. Los pacientes no respondedores a los tratamientos previos con interferón convencional en monoterapia o combinado con RBV presentan unas tasas de RVS al tratamiento estándar actual de un 28% y un 12% respectivamente [34-35]. El cumplimiento terapéutico es fundamental en estos pacientes, ya que si no reciben al menos el 80% de la dosis programada la tasa de RVS disminuye de forma significativa.

1.4.4 Eficacia en niños

El tratamiento combinado IFN-PEG/RBV proporciona tasas de RVS similares a los adultos. Los datos disponibles sobre la eficacia y efectos adversos en niños provienen de dos ensayos. Uno fue realizado en España con 30 niños que recibieron IFN-pegα 2b 1μg/kg/semana y RVB 15 mg/kg/día. Otro fue realizado en Alemania, en 61 niños tratados

con IFN-peg α 2b 1,5 μ g/kg/semana y RVB 15mg/kg/día. En ambos ensayos la duración del tratamiento fue de 24 semanas en infecciones por genotipos 2 y 3 y de 48 semanas en infecciones por genotipo 1. Los resultados fueron similares en ambos estudios, indicando que la respuesta se obtiene en un porcentaje igual o ligeramente superior al tratamiento combinado con IFN-peg/RBV.

Los pacientes del estudio español, realizado en el Hospital Infantil Universitario La Paz (Madrid), reunían criterios de inclusión estrictos de infección crónica (más de 3 años desde inóculo) y edad entre 3,5 y 16 años. El 69% de los casos eran debidos a TV, el 86,6% el virus fue genotipo 1 y en el 66,6% la viremia fue $>10^5$ UI/ml. La RVS se obtuvo en el 50% (46,6% con genotipo 1 y en el 100% de 3 pacientes con genotipo 3). En la 4ª semana solamente un paciente negativizó el VHC-ARN. En la 12ª semana de tratamiento, el 51,7% habían negativizado VHC-ARN y el 72% tuvo un descenso >2 log con respecto a la carga viral basal, existiendo una RVS en el 87% y 71% de los casos respectivamente. Ningún caso con descenso <2 log en la semana 12ª obtuvo respuesta. El tratamiento continuado hasta la 48ª semana en 6 niños con viremia positiva a la semana 24ª no obtuvo respuesta sostenida en ninguno de los casos.

En el estudio alemán los niños tenían una edad comprendida entre los 2 y los 17 años. El 40,3% eran debidos a TV y en el 75,8% el virus fue genotipo 1. Hubo respuesta sostenida en el 47,8% (22/46) de los niños con genotipo 1 y 100% (13/13) en niños con genotipo 2 y 3 ($p = 0,0003$). En la semana 12ª el 62,3% de los tratados obtuvieron VHC-ARN negativo. El 91% de los pacientes con genotipo 1 y el 92,3% de los casos con genotipos 2 ó 3, que consiguieron respuesta sostenida, tuvieron viremia indetectable en la semana 12ª de tratamiento.

En estos ensayos no hubo diferencias de respuesta según la edad (menores de 12 años comparado con mayores: 54,8% vs. 63,3% en el estudio alemán, 45% vs. 60% en el estudio español), ni con la cifra de ALT basal o comparando niños con transaminasas normales con los que presentaban alteración funcional previa al tratamiento. La carga viral basal y el índice de Knodell no influyeron en la respuesta en niños españoles. En ambos estudios, la respuesta de los pacientes con adquisición de la infección por vía transfusional

tuvo tendencia a ser superior a la de niños infectados por TV (niños alemanes: 70,4% vs. 48% $p = 0,087$; niños españoles: 78% vs. 38% $p = 0,1$).

Concluyendo, en el grupo de niños que constituyen la población más numerosa: infectados por genotipo 1 por vía madre-hijo, el tratamiento combinado es eficaz en el 37,5% y 35% de los casos (España y Alemania, respectivamente) [36].

1.4.5 Efectos adversos en niños

Los efectos adversos del IFNpeg (asociado a RVB) disminuyen en comparación con el empleo de IFN α , por reducirse el número de inyecciones semanales y de reacciones inmediatas a la inyección. El cambio transitorio de carácter o estado de ánimo se ha observado en el 15-30% de los niños sin ser ninguno de ellos casos graves. La cifra de hemoglobina descendió 1,6-1,4 g/dl respecto al valor basal; en el 5-23% de los casos hubo que reducir la dosis de IFN-peg por neutropenia. Alteraciones significativas de la función tiroidea fueron observadas en 5/61 niños alemanes, precisando tratamiento con L-tiroxina. Dos de ellos siguieron precisando hormona tiroidea a los 12 meses de seguimiento. Hubo un caso de diabetes mellitus. En el estudio español, el tratamiento combinado fue suspendido por hipertiroidismo en 2 niños y las alteraciones se resolvieron en ambos pacientes.

En conclusión, la eficacia del tratamiento combinado en niños avala su aplicación. Sin embargo, deben ser investigadas más profundamente las causas involucradas en el desarrollo de alteraciones endocrinológicas fundamentalmente tiroideas y diabetes que se observan en algunos niños [37].

1.4.6 Factores de respuesta al tratamiento

Características virales

- **Genotipo viral:** determina la dosis y duración del tratamiento, siendo uno de los principales factores a considerar. En general es menor la respuesta del genotipo 1 frente a los no 1. En cuanto a la duración del tratamiento, los genotipos 2 y 3 se

tratarán durante 24 semanas y el genotipo 1 durante 48 semanas. En cuanto a la dosis, el genotipo no 1 se trata con 800 mg de RBV; mientras que en el caso del genotipo 1 se administran dosis máximas de RBV según peso (1.000 mg/día < 75 kg peso y 1.200 mg/día > 75 kg peso).

- **Carga viral elevada:** los pacientes con alta carga viral (> 600.000-800.000UI/mL) responden peor al tratamiento, de manera que en pacientes con genotipo 1 que alcanzan una RVR podría acortarse el tratamiento si presentan una carga viral basal baja. Por otro lado, se ha observado recientemente que los pacientes con genotipo 3, que tradicionalmente se han considerado tener mejor respuesta al tratamiento, si presentan una carga viral basal muy elevada (> 800.000 UI/mL) obtienen una respuesta mediocre, inferior al 50% en muchos casos [38].
- **Cinética viral durante el tratamiento:** tanto el virus, como el sistema inmune del huésped y el tratamiento favorecen la aparición de cuasiespecies. La aparición de nuevas mutaciones se producen mayoritariamente en la región hipervariable E1 y E2 del genoma viral, a más cantidad de cuasiespecies menor RVS [38, 39].
- **Patrón de aminoácidos en la región sensible del interferón:** en la clínica tiene una gran importancia el número de mutaciones en NS5A, sobre todo en las regiones ISDR (o región determinante de la sensibilidad al IFN); a mayor número de mutaciones en NS5A mayor tasa de RVS [40]. Si la secuencia mayoritaria del virus está conservada en estas regiones de la proteína, los pacientes serían resistentes al tratamiento con IFN, lo que en la clínica se correspondería con los NR.

Factores del huésped:

Edad avanzada, sexo masculino, rápida evolución a fibrosis hepática, obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico están relacionados con una peor respuesta al tratamiento.

Factores genéticos IL28B y HLA:

La IL28B o IFN- λ 3 es una citoquina involucrada en la respuesta antiviral, los genes de la IL-28B se encuentran en el cromosoma 19. Su función bioquímica exacta es aún

desconocida. Fue descubierta en 2003 por ZymoGenetics utilizando un proceso de investigación genómica en el que se escanea el genoma humano completo.

Las células productoras de IFN λ son las células dendríticas y macrófagos (células presentadoras de antígenos). Existen tres tipos de IFN λ : IFN λ 1 o IL29, IFN λ 2 o IL28A e IFN λ 3 o IL28B. Todos actúan a través de los receptores de membrana IL28R α /IL10R2, activan las rutas de las JAK-STATs y MAPKs, y desencadenan diferentes tipos de respuestas inmunológicas: antiviral, antiproliferativa y antitumoral.

Respuesta antiviral del IFN λ :

- Presenta actividad antiviral frente al VHB y VHC a través de la inhibición de la replicación viral.
- El IFN λ 1 pegilado provoca menos efectos secundarios hematopoyéticos que el IFN α debido a la limitada expresión de receptores en las células hematopoyéticas: Ensayo clínico en fase I (ClinicalTrials.gov, identifier: NCT00565539).
- Inducen incrementos estables de expresión de los genes diana de IFN, potenciando el efecto antiviral.
- Inducen la sobreexpresión de antígenos HLA clase I.
- IL28A (IFN λ 2) impide específicamente la entrada del ARN del VHC al ribosoma.
- La función específica del IFN λ 3 es desconocida, pero in vitro tienen acción antiviral frente al VHC, aunque es menos potente que la del IFN α .

Recientemente cuatro estudios independientes han identificado varios SNPs, localizados en el cromosoma 19, fuertemente asociados con un incremento en la respuesta virológica sostenida en pacientes de diferente origen étnico crónicamente infectados por VHC genotipo 1 [41-44]. La tasa de respuesta virológica sostenida en los pacientes que presentan el genotipo CC del SNP rs12979860, localizado a 3 kilobases del gen de la IL28B, es del 75-80% comparados con los no-CC (CT/TT). Además, se ha comprobado que los niveles de expresión del ARN mensajero del gen IL28B (que codifica el interferón λ 3) son mayores en los pacientes respondedores comparados con los no respondedores.

Esta citoquina no solo se ha relacionado con la probabilidad de RVS, Thomas y cols. [45] estudiaron la asociación entre este polimorfismo y la cronificación o aclaramiento espontáneo del VHC en dos grupos de pacientes de diferente origen étnico con hepatitis aguda. De estos resultados se concluye que los pacientes con genotipo CC presentan tres veces más probabilidad de aclarar el virus que los genotipos no-CC.

Recientemente se han publicado múltiples artículos donde se ha estudiado la influencia del polimorfismos de la IL28B en la infección aguda y en la RVS tanto en genotipo 1 como no 1 (también en pacientes coinfectados por VIH), comprobándose que el genotipo CC es un factor protector independiente frente al genotipo no CC [46- 49]. Para el genotipo no 1 se ha demostrado que la IL28B se asocia a una mejor respuesta en aquellos pacientes que no alcanzan RVR.

Nuestro grupo ha publicado recientemente los resultados de un estudio respecto al papel de la IL28B y el HLA en la RVS con IFN-peg y RBV. El alelo HLA-DQB1 * 0301 y el genotipo IL28B son factores que se asociaron independientemente con la RVS. Hay una sinergia entre los alelos HLA-DQB1 * 0301 y HLA-A * 0201 con el polimorfismo rs12979860 CC, aumentando la tasa de RVS y es el genotipo IL28B el mejor predictor de RVS [50].

Todos estos datos apuntan a que el avance en el estudio de factores genéticos e inmunológicos y su influencia sobre la respuesta al tratamiento en un futuro podría aportar resultados muy esperanzadores, ya que en la actualidad existen problemas muy importantes como son el elevado coste de los tratamiento y los múltiples efectos secundarios que desarrollan los pacientes. El objetivo sería minimizarlos y poder predecir con mayor exactitud la probabilidad que tiene un determinado sujeto de responder al tratamiento.

1.5 Transmisión vertical del VHC y cronificación del VHC en el niño

1.5.1 Epidemiología del VHC en la gestante y en el niño

La prevalencia del VHC en mujeres embarazadas oscila entre el 0,15% al 2,4% en países desarrollados y es mucho mayor en países en vías de desarrollo como Egipto, donde

se estima una prevalencia del 8,6%. El riesgo de transmisión vertical es del 4-8% y se incrementa hasta el 17-25% en mujeres con coinfección VHC-VIH.

La prevalencia de la infección por VHC en niños en países como Estados Unidos ó países europeos se encuentra entre el 0,05% y el 0,36%. Al igual que ocurre en la población general esta prevalencia es mucho mayor en los países en vías de desarrollo con una estimación de entre el 1,8% y el 5%.

La paridad, la terapia hormonal sustitutiva en la menopausia y el sexo femenino se han descrito como factores protectores frente a la progresión de la enfermedad y evolución a cirrosis. Existen estudios que afirman que las hormonas femeninas (estrógenos y progesterona) pueden retrasar la fibrosis hepática [51-53].

En los países desarrollados la TV es la principal vía de transmisión del VHC en niños. En los Estados Unidos se estima que 240.000 niños tienen anticuerpos contra el VHC, con seroprevalencias del 0,1-0,2% que aumentan hasta el 2% en menores de edad encarcelados junto a sus madres y hasta el 10-20% en niños con otras patologías asociadas como tumores malignos, insuficiencia renal crónica (IRC) sometidos a hemodiálisis o cardiopatas intervenidos quirúrgicamente.

La mayoría de las infecciones por VHC adquiridas en el periodo perinatal cursan de manera asintomática y no es hasta la edad adulta cuando aparecen las complicaciones. Esto supone un alto impacto en la sociedad y una gran carga económica. Con la actual tasa de infección por VHC en los niños, se estima el coste en la próxima década en 26 millones de dólares en la detección, 117-206 millones de dólares en el seguimiento y 56-104 millones de dólares en el tratamiento. El coste total de la enfermedad se ha calculado entre 199 y 335 millones de dólares [21].

1.5.2 Inmunología del embarazo y su relación con el VHC

Ante una infección viral se activa una respuesta inmune inicial inespecífica mediada por células NK, PMN y macrófagos; tras lo cual las células presentadoras de antígeno internalizan los viriones por endocitosis, procesan las proteínas del virus y presentan péptidos antigénicos junto al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

(CMH clase II). Las células T CD4+ cooperadoras reconocen los antígenos asociados al CMH clase II y secretan citoquinas que regulan la actividad de la respuesta celular mediada por las células T CD8+ (respuesta citotóxica) y la producción de anticuerpos por los linfocitos B (respuesta humoral).

Las células T CD8+ reconocen antígenos del virus que se presentan en la superficie celular de los hepatocitos infectados junto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (CMH de tipo I) y pueden controlar la replicación viral mediante histólisis de células infectadas o por mecanismos no citotóxicos, mediante la secreción de citoquinas que inactivan al virus intracelularmente.

Es conocido que si la respuesta de los linfocitos T citotóxicos durante la infección aguda por el VHC es potente, aumenta la lisis de los hepatocitos infectados, disminuye la producción de viriones y se reduce la probabilidad de que la infección se cronifique. Esta respuesta inmune es mediada por linfocitos CD4 tipo Th1 (productores de citoquinas IFN- γ , TNF α e IL2) y es la base del tratamiento de la HCC con IFN-peg. También se sabe que si la respuesta Th1 mediada es débil al inicio de la infección es más probable la evolución a la cronicidad. (Figura 8)

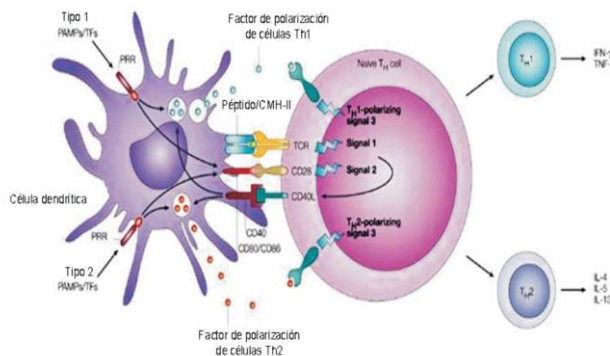


Figura 8. Señales requeridas para la activación de linfocitos T y polarización Th1 y Th2. Para la activación de los linfocitos T se requieren señales derivadas de las células dendríticas: 1ª señal, es antígeno específico y es mediada a través del TCR unido al MHC-II y el péptido procesado del patógeno vía MHC-II, 2ª señal es coestimuladora y finalmente, la señal polarizante mediada por factores solubles o unidos a la membrana, como IL-12 y CCL2.

Los estudios realizados en mujeres infectadas crónicamente por el VHC han demostrado ciertas peculiaridades en la historia natural de la infección: se ha demostrado

que el índice de progresión a fibrosis es menor en las mujeres que han tenido hijos frente a las nulíparas, también resulta inferior la progresión de la fibrosis en las mujeres menopáusicas que reciben terapia hormonal sustitutiva frente a las que no la reciben [46]. Una posible explicación podría ser la influencia de las hormonas sexuales en los fenómenos de inmunomodulación.

Sin embargo a pesar de estos datos tan interesantes, existe poca información sobre la historia natural de la enfermedad crónica en la mujer durante dos periodos muy significativos respecto a los múltiples cambios hormonales que se producen, como son el embarazo y el puerperio.

El periodo del embarazo se caracteriza por múltiples adaptaciones, entre ellas el sistema inmune de la madre debe de desarrollar tolerancia a aloantígenos paternos para salvaguardar la viabilidad del feto. Estos cambios que se manifiestan en el sistema inmune son consecuencia de las variaciones hormonales asociadas a la gestación, de las modificaciones en la actividad de las células del sistema inmune y el cambio en el perfil de citoquinas que se va modificando en cada trimestre del embarazo. De hecho estas adaptaciones son las que generan la tolerancia inmune que permitirá al embrión desarrollarse en el útero. La alteración de estos mecanismos se asocia por contra con abortos espontáneos, preeclampsia y eclampsia entre otras patologías del embarazo.

En condiciones normales los estrógenos y la progesterona favorecen la predominancia de la respuesta inmune humoral, hecho que resulta beneficioso para la gestación. Los estrógenos estimulan la producción de anticuerpos, alteran la actividad de los linfocitos T periféricos aumentando los linfocitos T reguladores, reducen el número y la actividad de células NK, aumentan el número y la actividad de granulocitos y macrófagos, reducen la estimulación osteoclástica mediante la disminución de la IL1 y el TNF α , disminuyen la presentación antigénica por parte de las células dendríticas y aumentan las citoquinas tipo Th2 [54].

La progesterona inhibe la activación y la proliferación linfocitaria, aumenta la apoptosis de linfocitos T y B, inhibe la generación y la actividad de células killer-T, inhibe la producción de anticuerpos, favorece la sobrevida de injertos y reduce las citoquinas de tipo Th1.

En resumen, podríamos decir que los esteroides sexuales durante la gestación favorecen el no rechazo materno-fetal al inhibir la acción de células citotóxicas y aumentar la producción de citoquinas anti-inflamatorias.

Los principales cambios en el sistema inmune durante el embarazo se resumen a continuación (Tabla 1):

Tabla 1. Principales cambios en diferentes componentes del sistema inmune durante el embarazo

Componentes del sistema inmune	Mujer embarazada
Neutrófilos	Muestran una disminución en su quimiotaxis, en la adherencia, así como en la producción de los productos reactivos del oxígeno.
Macrófagos	Favorecen el perfil de citocinas Th2, tienen un papel fundamental en la protección contra las infecciones uterinas.
Células asesinas naturales	Cooperan con el trofoblasto extraveloso, inician el remodelado vascular para formar arterias espirales.
Células dendríticas	Conforma el 1 a 2 % de la población leucocitaria decidual, incrementos en los niveles de esta población se asocia con patologías como HELPP.
Citocinas	Cambio a perfil Th2 durante el 1er trimestre.
Complemento	Existe incremento de anafilotoxinas C3a, C4a, C5a y permanece constante a lo largo de la gestación.
Péptidos antimicrobianos	Son sintetizados por células de la placenta y del trofoblasto. Durante el último trimestre son sintetizadas por células de la decidua y del epitelio amniótico.
Linfocitos T	Aumento población periférica linfocitos en el primer trimestre y disminución durante el tercer trimestre.
Linfocito B	Disminución de niveles periféricos en 1er y 3er trimestres.

Respecto a las citoquinas, un hecho actualmente aceptado es que para el mantenimiento del embarazo, es crucial una regulación inmunológica sobre el equilibrio fisiológico entre las citoquinas Th1/Th2 que se modifica favoreciendo la actividad Th2.

Una de las principales células productoras de citoquinas como ya hemos mencionado, son los linfocitos T CD4 ó “helper”. A partir de un precursor Th0 se distinguen dos subpoblaciones de linfocitos T denominadas Th1 y Th2. Los linfocitos Th1 producen las citoquinas IL1, IL2, IL12, IL15, IL18, IFN γ y TNF α , mientras que los Th2 sintetizan IL4, IL5, IL6, IL10, IL13 y el factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF) (Figura 9).

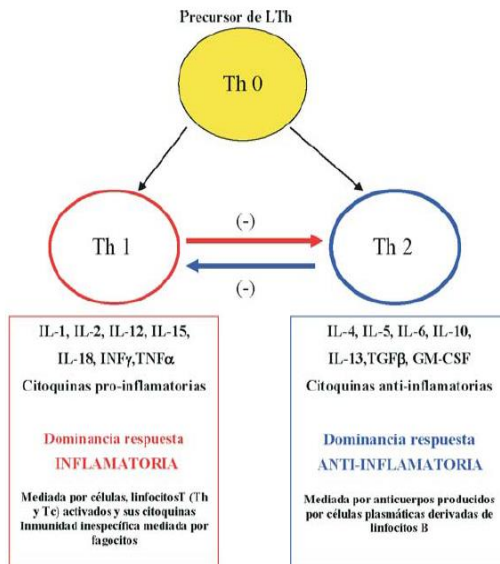


Figura 9. Células y citoquinas Th1 y Th2. Las citoquinas Th1 inducen una respuesta inmune inflamatoria mientras que las citoquinas Th2 favorecen la respuesta anti-inflamatoria. Ambos tipos de citoquinas se interregulan.

En condiciones normales estas citoquinas se hallan en equilibrio, pero dependiendo del tipo de estímulo se promueve una u otra respuesta: las hormonas femeninas aumentan la respuesta de citoquinas tipo Th2 y disminuyen la de citoquinas tipo Th1. Ambos grupos de citoquinas son inhibitorias entre si.

Durante el embarazo, una fuente adicional de citoquinas Th1 y Th2 son el epitelio y el tejido conectivo decidual, el cito y sincitiotrofoblasto, el corion, el amnios y las células de Hofbauer. Sus citoquinas también participan en la inducción de la tolerancia materno-fetal, regulan la inmunidad local contra agentes infecciosos y modulan la producción hormonal placentaria.

Existen estudios que relacionan la actividad de las citoquinas Th1 (IL2, IL12, IFN γ y TNF α), favorecedoras de la inmunidad citotóxica, con distintas patologías del embarazo: por ejemplo un exceso de TNF α o IFN γ se ha asociado con partos pretérmino; mientras que las citoquinas Th2 (IL4, IL5, IL6 e IL10), relacionadas con la inmunidad humoral, son protectoras para el desarrollo del feto y participan en la implantación del embrión y el desarrollo de la

placenta (niveles bajos de IL4 e IL10 se han asociado con abortos espontáneos recurrentes durante el primer trimestre de embarazo) [55].

Concluyendo, durante la gestación normal existe una represión de la respuesta inmune, en especial de la inmunidad Th1 citotóxica (mediada por INF γ , IL2 e IL12 fundamentalmente), frente un predominio de la respuesta humoral Th2 (mediada por IL4 e IL10). Esta adaptación tiene como objetivo proteger al feto del sistema inmune de la madre y está inducido posiblemente por el incremento de progesterona y el estímulo adrenal-corticoideo.

Perfil	Citocinas	Induce
Th1	IL-2, IL-12, INF- γ TNF- α .	Patrón inflamatorio predominante a finales del 3er trimestre lo cual es necesario para el inicio del parto.
Th2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α IL-1 β	Inducción de moléculas de histocompatibilidad HLA-G. Colabora en la implantación del producto y formación de la placenta.
Th17	IL-17A, IL-17F, IL-12, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α , IL-6, GM-CSF.	Patrón pro inflamatorio, aún no se han explorado los cambios en los niveles de estas citocinas durante el embarazo.

Tabla 2. Clasificación de las citoquinas dependiendo del perfil del linfocito T que las libera.

Todos estos fenómenos inmunológicos afectan a la evolución de las poblaciones del VHC, de forma que las mujeres infectadas crónicamente presentan durante el embarazo una tendencia a la normalización de las transaminasas, disminución del número de cuasiespecies y un incremento de la carga viral, alcanzando en el último trimestre y en el parto sus niveles máximos. En los meses siguientes al parto se restituye la inmunidad citotóxica, que conlleva una elevación de transaminasas y una disminución de la carga viral, con tanta expresividad que en algunas mujeres los valores de transaminasas recuerdan a los de una hepatitis aguda. Finalmente hacia el final del primer año posparto, tanto la carga viral como las transaminasas y la relación Th1/Th2 se restituye, recuperando niveles similares a los que tenía la mujer antes del embarazo. En este periodo posparto se han comunicado tasas de aclaramiento espontáneo del virus de hasta el 14%.

Un estudio realizado en Japón con 22 embarazadas VHC-ARN(+), encontró mayores tasas de aclaramiento viral, en comparación con un grupo control de mujeres no

embarazadas de manera significativa. Además, los niveles de la proteína del core del VHC a los 3 meses posteriores al parto eran mucho más bajos entre las pacientes que tuvieron aclaramiento viral frente a los que tuvieron una elevación de la proteína del core VHC de forma persistente. Estudios recientes han confirmado que un aumento en las células T específicas frente al VHC en el tercer trimestre y en el posparto se acompaña de una disminución en la carga viral. En este sentido, Honegger et al encontraron en nueve mujeres con infección crónica que la respuesta específica del IFN γ aumenta cuando se produce una caída de 1,4 log en la carga viral medida por ELISPOT. En el contexto de esta especial modulación de la respuesta inmune y la biología de la infección en el puerperio, algunos autores abogan por iniciar tratamiento farmacológico en este periodo en las mujeres que habiendo sido tratadas previamente fueron no respondedoras.

Tampoco se conoce con exactitud el mecanismo por el cual la mayoría de los niños aclaran el virus y por qué las posibilidades de cronificación son relativamente bajas, lo que contrasta con la alta tasa de cronificación en adultos (80%). Como ya se ha resaltado, la supresión de la inmunidad celular durante la gestación afecta considerablemente en el desarrollo de la enfermedad y el inóculo que infecta al neonato proviene precisamente de un escenario inmunológico muy particular en el que el virus ha tenido que adaptarse y evolucionar.

1.5.3 Transmisión vertical del VHC

Aunque la tasa de TV del VHC es baja: del 1-8% si la madre no tiene coinfección VIH y de un 20-30% si existe coinfección, hay que tener en cuenta que el 90% de los niños infectados han adquirido el virus por TV. Por otro lado, en los primeros meses de vida los niños pueden aclarar el virus y de los niños en los que persiste la viremia positiva sólo un 12% quedarán crónicamente infectados [56]. En este sentido, un estudio publicado por nuestro grupo con una muestra de 73 hijos y 63 madres anti-VHC positivas y anti-VIH negativas, 8 niños tuvieron viremias positivas (11%), pero solamente uno quedó crónicamente infectado (1,3%). Es decir, que de los niños infectados el 12,5% (1/8) cronificó la enfermedad mientras que el 87,5% (7/8) aclararon el virus sin seroconversión [57].

Respecto al momento en el que se produce la TV algunos estudios encuentran que los niños infectados por el VHC positivizan la PCR durante o poco después del parto, este hecho sugiere transmisión intraútero del virus. Sin embargo no se ha demostrado la presencia del VHC en líquido amniótico, y por tanto es posible que la transmisión del virus ocurra directamente a través de la placenta. Esta hipótesis se apoya además en el hecho de que no se haya demostrado relación entre el tipo de parto y el riesgo de TV.

En estudios sobre las regiones hipervariables del VHC en recién nacidos se ha observado una limitada diversidad, lo que indica que es probable que la transmisión quede restringida a unos pocos viriones.

Respecto a otros factores maternos que en la actualidad se están investigando y que podrían tener un papel significativo en la TV del VHC destacar ciertos tipos de HLA ó la presencia del ARN del VHC en las células mononucleares de sangre periférica. En cambio la presencia de anticuerpos neutralizantes de la madre no ha demostrado tener ningún papel en la TV.

A modo de conclusión, podríamos afirmar que en los estudios realizados hasta el momento sobre TV se han encontrado los siguientes resultados: la TV es poco frecuente y se desconoce con exactitud en qué momento ocurre. Es probable que el VHC se transmita por el paso trasplacentario de algunos viriones con poca o ninguna diversidad. La opinión más difundida es que el momento de la transmisión debe ser el parto, aunque el tipo de parto o las horas de bolsa rota no parecen influir. En los últimos años además se han estudiado factores genéticos o inmunológicos como el HLA de la madre y su posible relación con la TV que más adelante se describirán.

1.5.4 Factores de riesgo en la transmisión del VHC

La transmisión perinatal se cree que es la principal causa de transmisión de madre a hijo aunque la prenatal y postnatal son posibles.

Se han estudiado múltiples factores y su relación con el riesgo de transmisión vertical del VHC: la carga viral de la madre en el momento del parto, coinfección materna por el VIH, el genotipo del VHC, anticuerpos neutralizantes, fenómenos de inmunomodulación,

procedimientos como la amniocentesis ó de monitorización fetal invasivos durante el parto, la ruptura de membranas prolongada ó tipo de parto. Pero los únicos factores que han demostrado aumentar el riesgo de TV han sido el presentar una elevada carga viral durante el parto y la coinfección materna por el VIH.

Una de las posibles explicaciones de la baja tasa de TV es la pequeña cantidad de inóculo que el hijo recibiría de la madre, lo que explicaría que la carga viral en el momento del parto sea un factor predictivo importante. No obstante, es muy posible que haya otros factores relacionados con la fisiología del neonato e incluso con la composición de las poblaciones virales presentes en la madre al final del embarazo que también estén implicados.

Coinfección por el VIH

Se ha demostrado que la coinfección materna por VIH se asocia con tasas de TV entre 3 y 4 veces superiores respecto a las madres VIH (-). Polis et al. en un meta-análisis de 10 artículos demostraron que el VIH y la coinfección por el VHC aumentan las probabilidades de TV en un 90%. La incidencia de la transmisión vertical es aproximadamente del 5,3% en madres VHC-ARN positivo y VIH negativas y hasta del 19% en madres coinfectadas por el VIH. Incluso cuando se trata de infecciones VIH controladas se incrementa la probabilidad de TV del VHC en 2,82 veces.

Ruptura prolongada de membranas y otros factores obstétricos

La ruptura prolongada de membranas (de más de 6 horas), el tipo de parto y procedimientos de monitorización invasiva fetal en el parto se han asociado por algunos autores con la TV: Gibb et al. en un estudio en 441 parejas madre-hijo en el Reino Unido e Irlanda informaron de una tasa de transmisión del 7,7% en los bebés que nacieron por parto vaginal, un 5,9% entre los que nacieron por una cesárea urgente y el 0% en los nacidos por cesárea electiva. Paccagnini et al. en un estudio en 70 parejas madre-hijo de alto riesgo (VIH positivo y/o con antecedentes de consumo de drogas) mostraron una tasa del 32% de la transmisión vertical en los bebés nacidos por vía vaginal en comparación con el 6% en los que nacieron por cesárea (sólo había dos bebés que eran VIH positivos y ambos nacieron por cesárea).

Sin embargo, otros muchos estudios no han encontrado ninguna asociación entre el tipo de parto y el riesgo de TV. En este sentido, la Red Europea contra la Hepatitis C Pediátrica demostró en un estudio realizado en 1.758 parejas madre-hijo que no había diferencia significativa ($p=0,16$) en la transmisión vertical entre cesárea programada, parto vaginal o cesárea urgente.

Gravedad de la enfermedad del VHC materna

El papel que desempeña en la TV la actividad del VHC en la madre no se conoce completamente. Dos estudios recientes mostraron que las madres con infección de los monocitos de sangre periférica por el VHC tienen una mayor tasa de transmisión a sus hijos. Esto es similar a lo que ocurre en la transmisión vertical de otros virus como el VIH. También se ha observado que los niveles de ALT persistentemente elevados en el año anterior al embarazo o durante el embarazo se asocian con mayores tasas de transmisión vertical. De hecho, la elevación de transaminasas posiblemente esté en relación con la carga viral más alta y un daño hepático más extenso.

Un pequeño estudio realizado que compara a 12 madres VHC positivas y sus hijos con un grupo control de 16 madres y sus recién nacidos, mostró un aumento en las células natural killer (NK) de la placenta de madres VHC positivas en comparación con el grupo control. También se demostró que estas células tenían una mayor citotoxicidad en las madres VHC positivas. Esto podría explicar las bajas tasas de transmisión vertical, sin embargo, el aumento de la citotoxicidad de las células NK también puede conducir a un mayor riesgo de parto prematuro en las madres VHC positivas [21].

Lactancia materna

El ARN del VHC se ha detectado en la leche materna y el calostro. Sin embargo, sólo existen estudios aislados que muestran algún indicio de infección por el VHC en los bebés de madres con carga viral elevada en la leche y que hayan sido alimentados con lactancia materna.

La mayoría de los estudios indican que a pesar de que la transmisión teórica es posible, la cantidad de virus en la leche materna es muy baja y es probable que se inactive en el tracto digestivo del recién nacido. La Red Europea contra la Hepatitis C Pediátrica en

un estudio realizado en 1.758 niños no observó diferencia en las tasas de TV en bebés alimentados con fórmula respecto a los alimentados con leche materna [58]. Por tanto en la actualidad, sólo para las madres que están coinfectadas por el VIH se recomienda que sigan las mismas directrices que están recomendadas para la prevención de la transmisión del VIH [21].

En el artículo publicado por nuestro grupo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre lactancia materna o artificial en la transmisión vertical, aunque si resultó significativo cuando en las madres la determinación de VHC-ARN fue positiva en la leche materna: cuatro de las 20 madres (20%) que fueron VHC-ARN (+) en suero fueron también VHC-ARN (+) en la leche materna. Además las madres VHC-ARN (+) en leche materna tenían mayores títulos de ARN del VHC en sangre aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. De los 8 niños infectados en 4 se determinó VHC-ARN en la leche materna que recibían y 3 resultaron positivos. El genotipo fue el mismo en la madre, el hijo y la leche materna. [57]

1.5.5 Factores genéticos e inmunológicos en la transmisión del VHC

Distintos estudios realizados en pacientes adultos crónicamente infectados por el VHC han puesto de manifiesto la implicación de distintos factores genéticos e inmunológicos con el aclaramiento viral espontáneo y la respuesta al tratamiento (por ejemplo antígenos leucocitarios humanos (HLA) y el gen de la IL28B como ya hemos comentado previamente).

El papel que dichos factores podrían tener en la TV del VHC es desconocido, aunque si sabemos que no sólo la carga viral y la coinfección por VIH determinan en todos los casos el que se produzca la TV. Por tanto es importante llevar a cabo estudios en los que se valoren el papel de dichos factores para determinar si desempeñan algún papel en la TV e incluso en el curso clínico de la infección en los niños.

HLA y transmisión vertical

El papel del HLA en la respuesta inmune adaptativa, ha sido estudiado ampliamente en la transmisión perinatal de diferentes virus, fundamentalmente el VIH. Sin embargo existen

muy pocos trabajos que estudien este grupo de genes y su relación con la TV del VHC: Azzari y cols. [59] estudian genes HLA clase I (A*, B* y C*), no encontrando diferencias significativas en la concordancia madre-hijo de dichos alelos. Otros tres estudios [60-62] sí encuentran asociación entre los genes HLA clase II (HLA-DRB1*) y la TV del VHC. Bevilacqua y cols. [62] estudian el papel que desempeña el genotipo viral, los polimorfismos de MBL2 y diversas citoquinas. De los resultados que se obtienen en estos trabajos, destacar que si existe concordancia en determinados alelos del HLA (concretamente en DRB1*) entre la madre y el hijo es mayor la probabilidad de transmisión del VHC. Para este hecho, caben dos hipótesis:

1) Cuando las células mononucleares (CMN) de la madre están infectadas por el VHC y pasan al hijo, pueden expresar en su superficie moléculas HLA diferentes a las del niño; la consecuencia es que el sistema inmune de éste tienda a eliminarlas, con la consecuente destrucción viral. En cambio, cuando hay concordancia del HLA, estas células viven más tiempo en el hijo, favoreciendo la infección; esto queda sustentado con los resultados de Azzari y cols. [59] y Billington y cols. [63], los cuales afirman que, por un lado, la infección de CMN maternas se asocia con la TV del VHC, y que las células maternas sobreviven más tiempo en su descendencia cuando ambos presentan idénticos HLA en determinados alelos.

2) La presión selectiva ejercida por la respuesta inmune materna frente al virus (respuesta de células T mediada por HLA) genera una serie de variantes virales, cuasiespecies, capaces de escapar de esta respuesta inmune y de ser transmitidas a los hijos, por ello, los hijos con HLA concordante con su madre al tener cuasiespecies seleccionadas capaces de escapar al sistema inmune tendrían mayor riesgo de infectarse.

IL28B

El papel de la interleuquina IL28B en la TV de la hepatitis C y en el aclaramiento espontáneo viral de los niños infectados ha sido también objeto de estudio por parte de nuestro grupo. Los resultados obtenidos fueron los primeros publicados en relación a este aspecto y muestran que el genotipo de la IL28B, tanto el materno como el del niño, no influyen en transmisión vertical. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto por primera vez que el polimorfismo CC de la IL28B del niño está asociado estadísticamente con un mayor aclaramiento viral espontáneo en los niños verticalmente infectados con VHC genotipo 1.

Así, el 83% de los recién nacidos con genotipo CC de la IL28B infectados verticalmente aclararon el virus frente a solo el 22% de los niños no-CC. Por otro lado, el genotipo de la IL28B de la madre no tuvo influencia en la cronificación viral en el hijo. Como se ha comentado anteriormente, este es el primer estudio que pone de manifiesto tal asociación y por tanto son necesarios más estudios que traten de dilucidar el mecanismo subyacente a este evento así como el impacto clínico que dicho polimorfismo puede tener sobre la infección por VHC en el niño verticalmente infectado. [64].

Concluyendo, podríamos decir que en la actualidad continúa siendo necesario realizar estudios que analicen los factores que puedan estar implicados en la TV pues estos no son del todo conocidos: no todas las madres con carga viral alta transmiten el virus a sus hijos, de hecho se han descrito casos de TV en madres con carga viral baja en ausencia de coinfección por VIH etc. Todo parece indicar que deben existir otros factores implicados que por el momento se desconocen.

1.5.6 Perspectivas de tratamiento en el embarazo, puerperio y periodo neonatal

Hasta 2011 el tratamiento del VHC ha sido la combinación de interferón pegilado (IFN-peg) y ribavirina (RVB). Estos medicamentos tienen efectos secundarios importantes que pueden agravarse durante el embarazo y en el período neonatal: El IFN-peg puede producir efectos secundarios psiquiátricos en estas mujeres, añadida a la alta tasa de depresión posparto, y puede afectar al feto. Del mismo modo, RVB tiene efectos teratogénos y por tanto su uso está contraindicado durante el embarazo.

El niño en el primer año de vida puede padecer una hepatitis aguda que podría ser tratada como en el adulto, con interferón durante seis meses, pero en la actualidad el tratamiento en niños de menos de 2 años esta contraindicado. Las razones en contra del tratamiento se basan en las bajas tasas de transmisión vertical, la alta tasa de resolución espontánea y la ausencia de síntomas en caso de infección aguda.

Como conclusión de todo lo expuesto, para diseñar estrategias de tratamiento más eficaces y que pudieran ser aplicables en el niño y la embarazada es necesario investigar sobre: 1) la infección por el VHC durante el embarazo y la lactancia, 2) la influencia del

embarazo sobre la respuesta inmune frente al VHC 3) el impacto de la IL28B en la TV 4) cómo el VHC infecta el hígado del feto y 5) búsqueda de fármacos no teratógenos.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Debido a que no están claramente definidas las siguientes cuestiones:

- Como es la evolución de la infección crónica por VHC durante la gestación y puerperio y cuales son los factores asociados al desarrollo de inmunotolerancia al virus en la gestación.
- Cual es la influencia de factores clásicamente descritos en la transmisión vertical del VHC (virales, obstétricos, lactancia materna...) o de otros factores descritos más recientemente (fundamentalmente inmunogenéticos: genotipos HLA, citoquina IL28B...).
- Porque y de que depende el que se produzca el aclaramiento viral espontáneo en niños y el porque las tasas de aclaramiento viral espontaneo son superiores respecto al adulto.

Nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

“La evolución de la infección crónica por VHC en la mujer se ve influenciada por la gestación y puerperio y esto puede ser determinante en la transmisión vertical del VHC y el aclaramiento viral tanto en la madre como en su hijo. El hecho de que la respuesta inmune Th1 mediada se encuentre reprimida durante el embarazo para proteger al feto pudiera ser clave tanto en el curso de su propia enfermedad como en tasa de transmisión materno-filial del VHC; de ahí que nos propongamos estudiar los fenómenos de inmunomodulación de citoquinas Th1/Th2 en un grupo de mujeres durante la gestación y el puerperio y su relación con la evolución de la enfermedad durante dichos periodos y la transmisión vertical.”

2.2 Objetivos

Para verificar la hipótesis anterior hemos realizado el trabajo que en esta Tesis se presenta y que resumimos enunciando sus objetivos:

1. Analizar la evolución de la enfermedad viral crónica durante la gestación y puerperio.
2. Analizar los fenómenos de inmunomodulación que se producen durante la gestación y el puerperio y su relación con la transmisión vertical del VHC y el aclaramiento viral del niño y algunas madres.

3 PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

Estudio de cohortes prospectivo realizado en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada entre los años 1991 y 2009. Durante dicho periodo a todas las mujeres embarazadas se realizaba screening serológico del VHC en el primer trimestre de embarazo.

CAPITULO 1: ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD VIRAL CRÓNICA DURANTE LA GESTACIÓN Y PUERPERIO.

1.1 Características clínicas y epidemiológicas de la cohorte de mujeres que participaron en el estudio.

Se recogieron variables clínicas y epidemiológicas de las mujeres que participaron en el estudio cuya descripción se realizará más adelante.

1.2 Comportamiento de las transaminasas y la carga viral en las gestantes Ac-VHC+.

Se analizaron los niveles séricos de ALT y la carga viral en el tercer trimestre de embarazo, en el momento del parto, en el periodo comprendido entre los 3 y 6 meses después del parto y en el periodo comprendido entre los 7 meses y 12 meses del mismo. En función de estas determinaciones se clasificaron a las mujeres en los distintos grupos de estudio: Grupo 1: mujeres ARN-VHC (+) y Grupo 2: mujeres ARN-VHC (-).

No todas las mujeres VHC-ARN (+) (Grupo 1) se comportaron de igual manera respecto a las cifras de ALT en el puerperio (3-6 meses tras el parto) y por tanto se subclasificaron en 2 grupos:

- Las gestantes que presentaron un aumento de ALT superior a 40 UI/L entre los 3 y 6 meses tras el parto: se las denominó ***“Tipo A”***.
- Las madres que no presentaron variaciones en sus niveles séricos de ALT en el puerperio, presentando siempre niveles inferiores a 40 UI/L: se las denominó ***“Tipo B”***.

1.3 Comportamiento de la ALT y carga viral de la madre en el momento del parto y su relación con la transmisión vertical y aclaramiento viral en los niños infectados y en algunas madres.

Se correlacionaron los niveles de ALT y la CV en el parto y a los 3-6 meses del mismo con la TV y el aclaramiento de la infección en el niño y en sus madres.

El seguimiento de los niños se realizó cada dos meses el primer año, cada seis meses el segundo año y anualmente hasta los seis años. En cada una de las revisiones se determinaron los niveles ALT y el VHC-ARN.

El diagnóstico de VHC-TV se basó en la detección de VHC-ARN en sangre periférica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en niños que presentaron VHC-ARN (+) en al menos dos muestras consecutivas de sangre. En esta segunda muestra se realizó el genotipo viral.

Se define como infección crónica los niños que permanecieron VHC-ARN (+) y con seroconversión VHC (+) después de los 18 meses de edad.

Los niños se clasificaron en 3 grupos en función de los resultados obtenidos:

Grupo 1: Niños con viremia transitoria, definida por presentar VHC-ARN (+) en 2 determinaciones consecutivas pero que durante el seguimiento posterior negativizaron la carga viral y no presentaron seroconversión.

Grupo 2: Niños con infección crónica o persistente, definida por presentar VHC-ARN (+) de forma permanente y seroconversión con anticuerpos VHC (+) después de los 18 meses de vida.

Grupo 3: Niños no infectados. En ellos el VHC-ARN fue persistentemente negativo y los niños perdieron los anticuerpos VHC recibidos intraútero de la madre.

CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE LOS FENÓMENOS DE INMUNOMODULACIÓN QUE SE PRODUCEN DURANTE LA GESTACIÓN Y EL PUERPERIO Y SU RELACIÓN CON LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VHC Y EL ACLARAMIENTO VIRAL DEL NIÑO Y DE ALGUNAS MADRES.

2. 1 Estudio de los fenómenos de inmunomodulación durante el embarazo y el puerperio y su relación con el comportamiento de las transaminasas y la carga viral de la gestante.

Se realizó la determinación plasmática de citoquinas Th1 (INF γ , IL12 e IL2) y Th2 (IL10 e IL4) en el momento del parto y el puerperio y se estudió su relación con los niveles de ALT y la carga viral de las mujeres.

2. 2 Fenómenos de inmunomodulación y su asociación con el polimorfismo de la IL28B de las gestantes y del genotipo viral del VHC.

Se relacionaron los niveles de citoquinas presentes en el parto y post-parto con el polimorfismo de la IL28B (genotipo CC frente a genotipo no-CC) y con el genotipo viral (genotipo 1 frente a genotipo no 1).

2.3 Estudio de la influencia de los niveles de citoquinas maternos Th1 y Th2 en el parto y a los 3-6 meses en la TV y el aclaramiento viral en los niños infectados y en algunas madres.

3.2 Ámbito de estudio

Hospital Universitario "San Cecilio" de Granada.

3.3 Sujetos de estudio

Mujeres ELISA Ac-VHC (+) que fueron atendidas en el tercer trimestre de la gestación y/o el parto y posteriormente seguidas junto a sus hijos en la Consulta de Hepatología Infantil del Hospital Universitario San Cecilio desde septiembre de 1991 hasta diciembre de 2009.

3.3.1 Criterios de inclusión

- Mujeres ELISA Ac-VHC (+) y sus hijos.

3.3.2 Criterios de exclusión

- Coinfección VHB ó VIH
- Alcoholismo
- Enfermedad autoinmune

Pacientes

De 145 mujeres que se reclutaron 122 mujeres realizaron el seguimiento clínico y analítico completo. Las pacientes se clasificaron en dos grandes grupos:

Grupo 1: n= 89 fueron ARN-VHC (+)/ VIH (-) y

Grupo 2: n=33 fueron ARN-VHC (-)/VIH (-)/Ac-VHC (+).

No todas las mujeres VHC-ARN (+) (Grupo 1) se comportaron de igual manera respecto a las cifras de ALT en el puerperio (3-6 meses tras el parto) y por tanto se subclasificaron en 2 grupos:

-Las gestantes que presentaron un aumento de ALT superior a 40 UI/L entre los 3 y 6 meses tras el parto: "**Tipo A**".

-Las madres que no presentaron variaciones en sus niveles séricos de ALT en el puerperio, presentando siempre niveles inferiores a 40 UI/L: madres "**Tipo B**".

3.4 Variables de estudio

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Variables maternas:

1. *Polimorfismo IL28B.* Variable cualitativa. rs12979860 genotipo CC vs. genotipo no-CC.
2. *Edad.* Variable cuantitativa expresada en años.
3. *Vía parenteral de contagio.* Variable cualitativa: si/no.

Variables virales:

4. *Genotipo viral de la madre.* Variable cualitativa: Genotipo 1, Genotipo 3, genotipo 4.

Variables del niño:

5. *Edad gestacional.* Variable cuantitativa expresada en semanas.

7. *Tipo de parto.* Variable cualitativa: Cesárea versus parto vaginal.

8. *Peso al nacimiento.* Variable cuantitativa expresada en gramos.

6. *Tipo de lactancia.* Variable cualitativa: lactancia materna vs. Lactancia artificial.

7. *Duración de la lactancia materna.* Variable cuantitativa expresada en días.

VARIABLES RESULTADO:

Capítulo 1

1. *Niveles plasmáticos de ALT maternos en los distintos periodos:* tercer trimestre de la gestación, parto y puerperio (3-6 meses después del parto y a los 7-12 meses tras el parto). Variable cuantitativa expresada en UI/L.

2. *Carga viral en suero de la madre en el parto.* Se determinó en los distintos periodos previamente descritos y simultáneamente a la determinación de ALT. Variable cuantitativa expresada en UI/ml.

3. *Carga viral alta (>600.000UI/ml) vs. Carga viral baja (≤600.000UI/ml).* Variable cualitativa.

4. *Incremento en los valores de ALT durante el periodo posparto* calculando este incremento como la diferencia entre las cifras de ALT ^{3-6 meses posparto} y ALT ^{en el parto}. Variable cuantitativa expresada en UI/L.

5. *Descenso posparto en los valores de ALT:* [ALT ^{3-6meses postparto}-ALT ^{7-12meses postparto}]. Variable cuantitativa expresada en UI/L.

6. *Transmisión vertical del VHC (Madre positiva-Hijo positivo) vs. no-transmisión del VHC (Madre positiva-Hijo negativo).* Variable cualitativa.

7. *Aclaramiento viral espontaneo materno.* Variable cualitativa (si/no)

8. *Aclaramiento viral espontaneo en el niño.* Variable cualitativa (si/no)

Capítulo 2

1. *Niveles de citoquinas Th1 (INF γ , IL12 e IL2) y Th2 (IL10 e IL4)* (en el momento del parto y en el posparto (3-6 meses después). Variables cuantitativas expresadas en pg/ml.
2. *Transmisión vertical del VHC (Madre positiva-Hijo positivo) vs. no-transmisión del VHC (Madre positiva-Hijo negativo)*. Variable cualitativa.
3. *Aclaramiento viral espontaneo materno*. Variable cualitativa (si/no)
4. *Aclaramiento viral espontaneo en el niño*. Variable cualitativa (si/no)

3.5 Recogida y análisis de datos

Los datos clínicos y epidemiológicos para realizar el estudio se tomaron de los cuadernos de recogida de datos de cada una de las mujeres VHC positivas que participaron en el estudio y fueron incluidos en una base de datos anónima y utilizada exclusivamente para el análisis estadístico del estudio. En esta base de datos se incluyeron posteriormente los siguientes resultados analíticos obtenidos: 1) polimorfismo genético IL28B; 2) cargas virales y 3) genotipo viral.

3.6 Métodos

Tanto la carga viral como el genotipo viral se analizaron en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Asimismo, la bioquímica sanguínea general (determinación de ALT) y el hemograma se realizaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos de este hospital.

1. *Obtención de los sueros:*

La muestra de sangre completa se adicionó a un tubo de vidrio de Bioquímica (BD Vacutainer Ref 364915). Se incubó a 37°C durante 1 hora, hasta que la sangre estuvo bien coagulada. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y con una pipeta Pasteur se recogió el sobrenadante (suero) y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2. Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP):

La extracción de CMSP se realizó en gradiente de Ficoll Hypaque (Sigma-Aldrich, Histopaque-1077, Germany). Sobre 3 ml de Histopaque se añadieron 3 ml de sangre heparinizada y se sometieron a centrifugación (400 xg durante 30 minutos a 20°C) y se separó el anillo de células mononucleares con una pipeta Pasteur. Las células se lavaron con PBS (NaCl 0,14 M; KCl 0,003 M; Na₂HPO₄ 0,008 M; KH₂PO₄ 0,0015 M; pH 7,4) y se centrifugaron (400 xg durante 10 minutos a 20°C) para obtener el sedimento celular que fue diluido en medio de congelación isotónico (8 ml de medio de cultivo RPMI, 1 ml de suero fetal bovino y 1 ml de DMSO) almacenado a -80° C hasta su utilización.

3. Determinación del genotipo viral:

El Genotipo viral se determinó tanto en las madres como en los niños y se realizó mediante hibridación inversa (Inno-LIPA II HCV; Innogenetics, SA, Ghent, Belgium).

4. Determinación cuantitativa de la carga viral del VHC en suero:

Esta se analizó mediante COBAS TaqMan HCV Test (Roche Diagnostics).

5. Obtención ADN:

La obtención del ADN genómico se realizó de las células mononucleares almacenadas a -80°C de las madres y de los niños. Para su obtención se utilizó un Kit de extracción y se siguieron las recomendaciones del fabricante (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Germany). 200 µl de la disolución de células mononucleares fue mezclado con 200 µl de Binding Buffer con proteinasa K y se incubó 10 minutos a 70°C. A continuación se añadieron 100 µl de isopropanol y se depositó la muestra sobre las columnas de extracción. Tras centrifugar durante 1 minuto a 8.000 xg, se procedió a lavar el ADN inmovilizado en la cubeta con 500 µl de Wash Buffer. Finalmente se eluyó el ADN utilizando 200 µl de Elution Buffer a 70°C y centrifugando a 8.000 xg durante 1 minuto. Estas muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su utilización.

6. Cuantificación de citoquinas:

Las citoquinas Th1 (INF γ , IL12 e IL2) y las citoquinas Th2 (IL10 e IL4) se determinaron utilizando el kit de immunoassay (Procarta cytokine Assay Kit, Quantitative Biology, Affymetrix), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando la Tecnología Luminex. Los datos cuantitativos se obtuvieron usando el sistema Luminex-200 (Luminex 100 IS v2.3 software). La sensibilidad de los análisis fue de 0,12pg/ml y para aumentar la sensibilidad del kit, el fabricante recomendó introducir una menor cantidad en el analizador. Todas las

madres VHC-ARN (+) presentaron niveles detectables y cuantificables de citoquinas, y solo en algunas madres VHC-ARN (-) no fue así, en estos casos se utilizó la sensibilidad estándar del kit.

7. Genotipado de la IL28B (SNP-Rs12979860):

Se determinó el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) Rs12979860 por medio de un ensayo de discriminación alélica utilizando sondas Taqman (Custom Assay Service, Ref.AHI050J) y utilizando como molde el DNA genómico extraído de las células mononucleares de las madres y de los niños. Los tres polimorfismos descritos para este SNP son los siguientes CC, CT y TT. Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron: Oligo sentido 5'-GCCTGTCGTGACTGAACCA-3' y el antisentido 5'-GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3'. Las secuencias de las sondas Taqman fueron: a) para la detección del polimorfismo C la sonda marcada con el fluorocromo VIC 5'-TGGTTCGCGCCTTC-3' y b) para el polimorfismo T, la sonda 5'-CTGGTTCACGCCTTC-3' etiquetada con el fluorocromo FAM. Las reacciones de amplificación por PCR fueron realizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, con un volumen final de 4 µl, siguiendo el siguiente protocolo térmico: preincubación a 50°C durante 2 minutos, incubación a 95°C durante 10 minutos seguidos de 40 ciclos formados por dos etapas, la primera de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y la segunda de hibridación-elongación a 60°C, 1 minuto. La intensidad de fluorescencia se analizó a tiempo final (transcurridos los 40 ciclos), y la determinación de los polimorfismos se realizó automáticamente mediante la utilización del software de discriminación alélica SDS 2.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.7 Estudio estadístico

Para cumplir los objetivos del estudio se llevó a cabo un análisis estadístico consistente en:

1. Estadística descriptiva: Los resultados de las variables cualitativas se expresaron en valores absolutos con porcentajes y las variables cuantitativas como medias \pm desviación típica.

2. Análisis bivalente: El estudio estadístico fue desarrollado usando el test T de Student para variables cuantitativas distribuidas de forma normal (muestras pareadas/no pareadas) y para las variables con distribución no-normal se utilizó el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas y Wilcoxon para las muestras pareadas. El test de Kolmogorov-Smirnov fue utilizado para la analizar la normalidad de la muestra y la correlación de Pearson para el análisis del grado de relación lineal entre 2 variables.

Para variables cualitativas la comparación entre grupos se realizó mediante el Test Chi² o el Test exacto de Fisher unilateral (variable independiente cualitativa).

3. Análisis multivariante: Todas las variables pronósticas o de riesgo de transmisión del VHC y/o cronificación del VHC en niños, incluidos el polimorfismo genético IL28B, se incluyeron en un análisis multivariante mediante regresión logística, tomándose como medida de asociación la OR (IC 95%).

4. Se consideró significación estadística valores de $p < 0,05$. En todos los casos se empleó el paquete SPSS 15.0 para Windows.

3.8 Consentimiento informado de las pacientes

Se solicitó el consentimiento informado a todas las mujeres gestantes que participaron en el estudio y para el seguimiento de sus hijos.

Según la nueva ley de Investigaciones Biosanitarias, aquellos estudios con muestras biológicas obtenidas con cualquier finalidad con anterioridad a la entrada en vigor de esta Ley, con el propósito de no entorpecer su uso para la investigación y velando al mismo tiempo por los intereses de los sujetos fuente de aquéllas, quedan exentos del consentimiento informado exigiéndose el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación correspondiente. Así, según el Título V, Capítulo III, Artículo 58 de la Ley 14/2007 de Investigaciones biomédicas: 1) la obtención de muestras biológicas con fines de investigación biomédica podrá realizarse únicamente cuando se haya obtenido previamente el consentimiento escrito del sujeto fuente y previa información de las consecuencias y los riesgos que pueda suponer tal obtención para su salud. Dicho consentimiento será revocable; 2) el consentimiento del sujeto fuente será siempre

necesario cuando se pretendan utilizar con fines de investigación biomédica muestras biológicas que hayan sido obtenidas con una finalidad distinta, se proceda o no a su anonimización. No obstante lo anterior, de forma excepcional podrán tratarse muestras codificadas o identificadas con fines de investigación biomédica sin el consentimiento del sujeto fuente, cuando la obtención de dicho consentimiento no sea posible o represente un esfuerzo no razonable en el sentido del artículo 3 de esta Ley. En estos casos se exigirá el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación correspondiente.

La aprobación previa para el estudio fue obtenida del Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

4.RESULTADOS

Capítulo 1

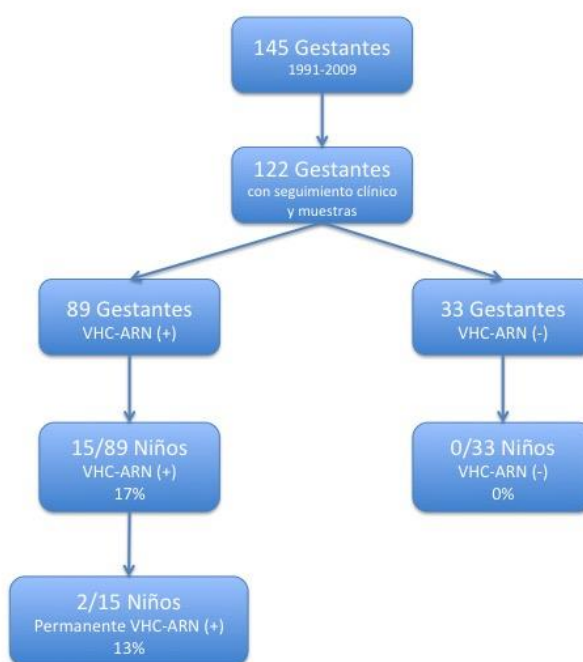
Análisis de la evolución de la enfermedad viral crónica durante la gestación y puerperio

Capítulo 1

1. 1. Características clínicas y epidemiológicas de las mujeres gestantes Ac-VHC (+)

En el periodo entre septiembre de 1992 y diciembre de 2009 se reclutaron 145 gestantes que cumplían con los criterios del estudio. De ellas, 122 realizaron el seguimiento clínico y analítico completo necesario para llevar a cabo el estudio.

El siguiente esquema muestra la distribución de las madres Anti-VHC (+) y sus hijos en función de si presentaron VHC-ARN positivo o negativo.



Los datos clínicos y epidemiológicos de las madres Anti-VHC (+)/VHC-ARN (+) en relación a las Anti-VHC (+)/VHC-ARN (-) incluidas en el estudio se resumen en la tabla 3. En el 74% de las madres VHC-ARN (+) la vía de contagio fue la parenteral. La media de la carga viral en las madres VHC-ARN (+) fue de 2,709,588UI/mL y en el 75% de estas madres se aisló el genotipo 1. Además el 54% de las madres VHC-ARN (+) tenían una carga viral >600.000UI/ml en el momento del parto.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la media de edad, duración de la gestación, tipo de parto, peso al nacimiento del recién nacido, ni resto de variables epidemiológicas estudiadas entre los dos grupos de madres anti-VHC (+).

Un aspecto a destacar son los resultados respecto al polimorfismo de la IL28B (IFNλ3): De las 89 madres Anti-VHC (+) y VHC-ARN (+), sólo 21 (27%) tuvieron el polimorfismo CC y 20 de las 33 (60%) madres Anti-VHC (+) y VHC-ARN (-) presentaron este polimorfismo (p=0,01).

Madres Anti-VHC(+)	Madres VHC-ARN (+)	Madres VHC-ARN (-)	p
n=122	n=89 (73%)	n=33 (27%)	
Variables maternas			
Edad ¹	29.24 ± 0.53	30.56 ± 0.76	ns
ALT ¹ (UI/L en el parto)	38.45 ± 7.66	22.80 ± 1.95	ns
Genotipo IL28B ² (CC) (si)	21 (23)	20 (61)	0.01
Contagio vía parenteral ² (si)	66 (74)	22 (67)	ns
Variables virales			
Genotipo viral ² (Geno. 1) (si)	67 (75)	np	
Genotipo viral ² (Geno. 3) (si)	19 (21)	np	
Genotipo viral ² (Geno. 4) (si)	3 (3)	np	
Carga viral en el parto ¹ (IU/mL)	2.709.588 ± 544.854	np	
Carga viral alta en el parto ² (>600,000 IU/ml) (si)	48 (54)	np	
Variables del niño			
Edad gestacional ¹ (semanas)	38.83 ± 0.25	38.67 ± 0.25	ns
Peso al nacimiento (g) ¹	3148 ± 59	3101 ± 96	ns
Transmisión vertical (si)	15 (17)	0 (0)	0,01
Infección crónica ² (si)	2 (2)	0 (0)	np
Tipo de parto ² (Cesárea)	19 (21)	10 (30)	ns
Lactancia materna ² (si)	65 (73)	22 (67)	ns
Duración de la lactancia materna (días) ¹	53 ± 7	47 ± 10	ns

Tabla 3. Características clínicas y epidemiológicas de las mujeres Anti-VHC (+)

¹ Media ± error estándar de la media (ESM). ² Valores absolutos y porcentajes entre paréntesis. ns= no significativo. np= no procede.

1. 2. Comportamiento de las transaminasas y de la carga viral en la gestante Ac-VHC (+)

Se determinaron los niveles de ALT en 4 periodos concretos: 1º) último trimestre de embarazo, 2º) el parto, 3º) entre los 3-6 meses tras el parto y 4º) entre los 7 y 12 meses posparto. Simultáneamente se determinó en cada uno de los 4 periodos la carga viral de las mujeres VHC-ARN (+). No todas las gestantes presentaron la misma evolución respecto a los parámetros analíticos estudiados. En este sentido, cuando se analizaron los niveles de transaminasas se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 10):

1. Niveles séricos de ALT:

- a) **VHC-ARN (-) vs VHC-ARN (+):** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de ALT entre estos dos grupos de mujeres durante el tercer trimestre de embarazo (desde la 28 semana de gestación al fin del embarazo) ni en el momento del parto. Sin embargo las madres con VHC-ARN (+) presentaron entre los 3 y 6 meses después del parto niveles significativamente superiores de ALT respecto a las mujeres VHC-ARN (-): $98,32 \pm 9,34$ UI/L vs. $17,42 \pm 1,77$ UI/L ($p < 0,001$).

- b) **VHC-ARN (+):** No todas las mujeres VHC-ARN (+) se comportaron de igual manera respecto a las cifras de ALT: el 66% de las gestantes (59/89) presentaron una elevación de ALT superior a 40 UI/L entre los 3 y 6 meses tras el parto (a estas madres se las denominó como "**Tipo A**"). El 34% restante (30/89) no presentó variaciones en sus niveles séricos de ALT en el puerperio, presentando siempre niveles inferiores a 40 UI/L (a estas madres se las denominó "**Tipo B**").

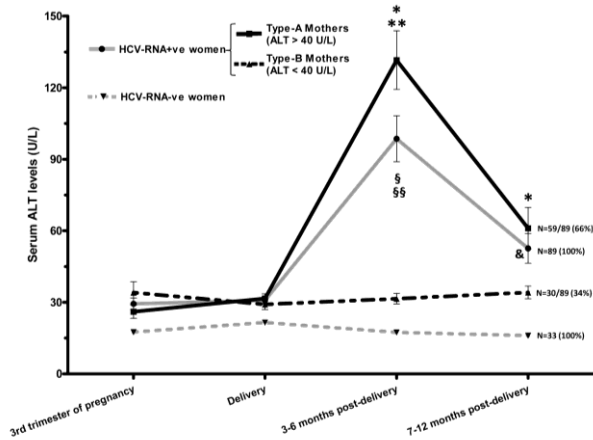


Figura 10: ALT en gestantes Anti-VHC (+). Madres VHC-ARN (+) Tipo A y B. $\$p < 0.01$ VHC-ARN (+) vs. VHC-ARN (-). $\$ \$ P < 0.01$ para las madres VHC-ARN (+) en el parto, a 3-6 meses tras el nacimiento y entre los 7-12 meses tras el parto. $*P < 0.01$ para madres Tipo-A vs Tipo-B. $**P < 0.001$ para madres Tipo-A a los 3-6 del nacimiento, en el parto y a los 7-12 mese..

2. Niveles séricos de AST y GGT:

a) **Madres VHC-ARN (+) Tipo A:** En estas madres se produce un aumento en los niveles séricos de AST entre los 3-6 meses después del nacimiento con respecto a los presentados en el parto (incremento en 38 UI/L, $p=0,01$). Sin embargo los niveles de GGT permanecieron estables en todos los tiempos analizados (Figura 11).

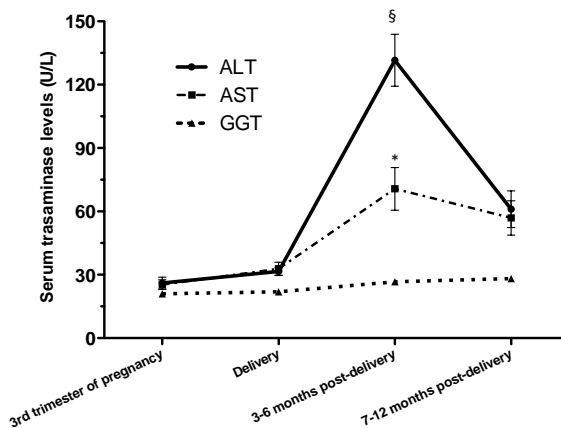


Figura 11: Evolución de la ALT, AST y GGT en gestantes VHC-ARN (+) Tipo A. $\$P < 0.01$ para las madres Tipo-A, en el periodo 3-6 meses tras el nacimiento, en el parto y 7-12 meses tras el parto. $*P < 0.01$ para madres Tipo-A a los 3-6 meses del nacimiento vs. momento del parto.

b) **Madres VHC-ARN (+) Tipo B:** En las madres tipo B no se observa modificaciones ni en los niveles de AST ni en los de GGT en los tiempos analizados (Figura 12).

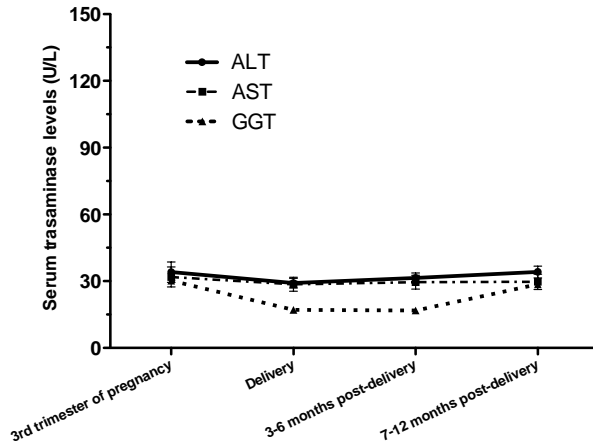


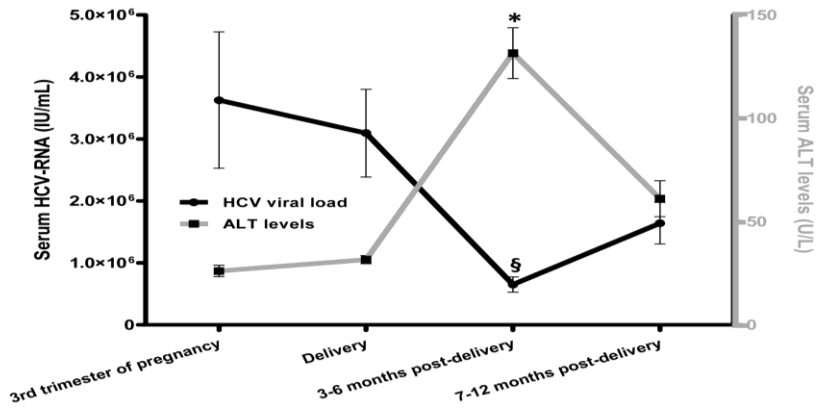
Figura 12: Evolución de la ALT, AST y GGT en gestantes VHC-ARN (+) Tipo-B.

El aumento medio en los valores de ALT durante el periodo posparto en el grupo A fue significativo, calculando este incremento como la diferencia entre las cifras de ALT^{3-6 meses posparto} y ALT^{en el parto}; este valor fue de 100 ± 7 UI/L mientras que en las mujeres Tipo B fue de 2 UI/L ($p < 0,001$). Además las mujeres del Tipo A, a los 7-12 meses posparto también presentaron un descenso significativo en los valores de ALT: $[ALT^{3-6 \text{ meses postparto}} - ALT^{7-12 \text{ meses posparto}}] = 70,52 \pm 10,49$ UI/L ($p < 0,01$). Resulta interesante que las mujeres Tipo B tuvieron un patrón en los niveles de ALT similar al de las mujeres VHC-ARN (-) durante todos los periodos del estudio.

Al realizar el análisis de la relación entre la evolución temporal de la carga viral y los niveles de ALT, los resultados fueron los siguientes:

Como ya se ha descrito previamente, las mujeres VHC-ARN (+) fueron categorizadas en relación a los valores de ALT en el posparto en Tipo A y B y en función de la categoría, la evolución de la carga viral en el tiempo tuvo también un comportamiento distinto:

Mujeres Tipo A



Mujeres Tipo B

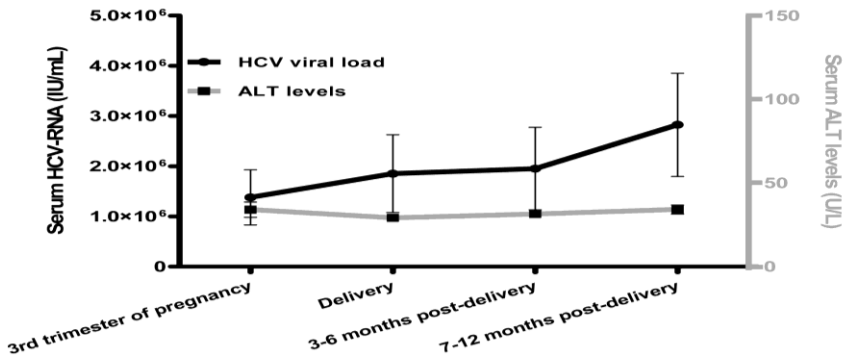
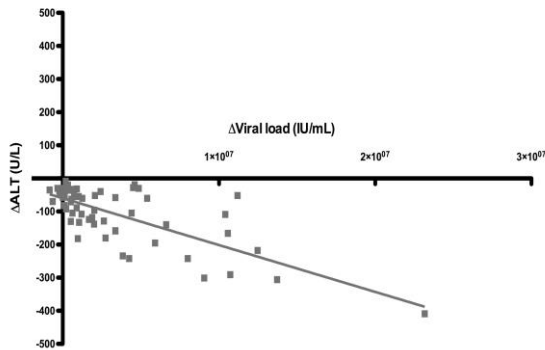


Figura 13: Evolución de la ALT y la carga viral de las gestantes VHC-ARN (+). § $P < 0.001$, parto vs. tercer trimestre de gestación y 7–12 meses tras el parto.

- a) En las madres Tipo A existe una correlación temporal entre los niveles de ALT y la carga viral estadísticamente significativa. Así los niveles de ALT se elevan mientras que la carga viral se reduce entre los 3 y 6 meses después del parto (Figura 14, Pearson $R = -0,740$, $p = 0,0001$).

b) Sin embargo las madres Tipo B no presentaron variación estadísticamente significativa en su carga viral y por lo tanto no existe correlación entre elevación de la ALT y carga viral (Figura 14; $p=0,234$; Pearson's R= 0,234).

Mujeres Tipo A



Mujeres Tipo B

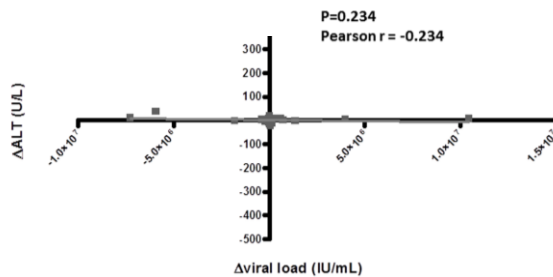


Figura 14: Medida de la asociación entre ΔALT y ΔCVI . Las madres VHC-ARN (+) Tipo-A presentaron una correlación estadísticamente significativa entre dichos parámetros, sin embargo, las madres Tipo-B no mostraron tal asociación. $\Delta CV = CV^{3-6 \text{ meses tras parto}} - CV^{\text{parto}}$; $\Delta ALT: ALT^{3-6 \text{ meses tras parto}} - ALT^{\text{parto}}$.

Además si separamos las madres Tipo A y B en función de su niveles de carga viral en el momento del parto, en madres con alta carga viral (>600.000 UI/mL) y madres con baja carga viral (<600.000 UI/mL) se observa que, independientemente de la carga viral que presentarían en el parto, las madres Tipo A muestran un descenso significativo en sus niveles séricos de carga viral con respecto a la presentada en el momento del parto. Sin embargo,

las madres Tipo B no muestran variación estadísticamente significativa en sus valores de VHC-ARN durante la gestación, parto ni puerperio (Figura 15).

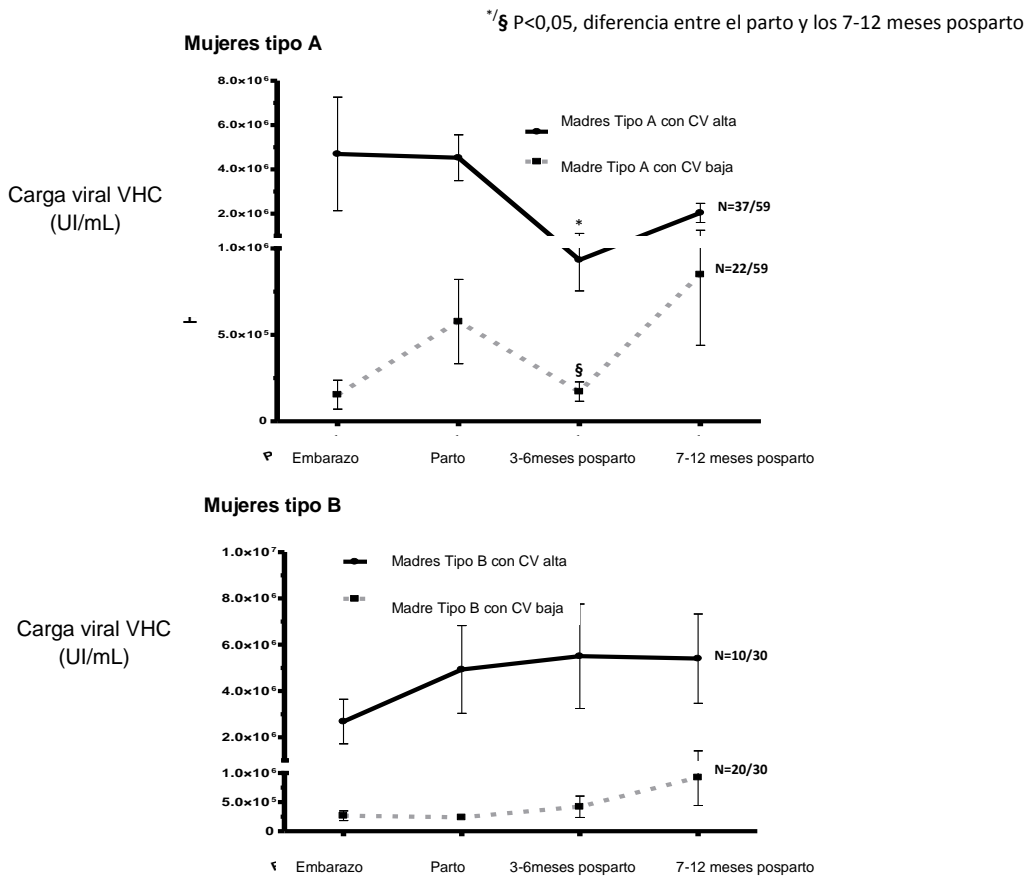


Figura 15. Carga viral en madres VHC-ARN (+) Tipo A y B categorizadas en función de presentar carga viral alta o baja en el parto. #Carga viral alta >600.000 IU/mL .

En la Tabla 4 se recogen los resultados del análisis descriptivo en las madres Tipo A y B. Las características clínicas fueron similares en ambos grupos (edad, genotipo viral del VHC, polimorfismo de la IL28B, tipo de parto, lactancia materna, días de lactancia, epidemiología, edad gestacional, etc.). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en algunos parámetros, como es el caso de los niveles de carga viral en el parto: el 63% de las madres Tipo A (37/59) presentaron alta carga viral en el alumbramiento (>600,00 IU/mL) a diferencia de las Tipo B donde solamente el 33% de las mismas presentó carga viral alta (10/30, p=0,01). Otro dato interesante fue la diferencia en los niveles de citoquinas

presentes en el momento del parto en cada grupo, pero este tema se tratará en el siguiente capítulo.

Madres categorizadas en función de los niveles de ALT posparto n=89	Madres Tipo-A n=59 (66%)	Madres tipo-B n=30 (34%)	P
VARIABLES MATERNAS			
Edad ¹	29 ± 0.7	30 ± 0.9	ns
Genotipo IL28B ² (CC) (si)	15 (25)	6 (20)	ns
Contagio vía parenteral ² (si)	42 (71)	24 (80)	ns
VARIABLES VIRALES			
Genotipo viral ² (Geno. 1) (si)	45 (76)	22 (73)	ns
Genotipo viral ² (Geno. 3) (si)	12 (20)	7 (23)	ns
Genotipo viral ² (Geno. 4) (si)	2 (0.3)	1 (0.3)	ns
CV >600.000 IU/ml ² (si)	38 (64)	10 (33)	0,01
CV ^{en el parto} – CV ^{posparto(3-6 meses)} ¹	-2.438.867 ±	11.288 ± 664.352	0.031
VHC-ARN aclaramiento espontáneo ²	2 (3)	2 (6)	ns
VARIABLES DEL NIÑO			
Edad Gestacional	38.84 ± 0.3	38.80 ± 0.4	ns
Peso (g) ¹	3216 ± 68	3025 ± 105	ns
Transmisión vertical ² (si)	12 (20)	3 (10)	ns
Tipo de parto ² (Cesárea-si)	11 (19)	8 (27)	ns
Lactancia materna ² (si)	42 (71)	23 (77)	ns
Días de lactancia materna ¹	50 ± 8	60 ± 15	ns
NIVELES DE CITOQUINAS (pg/mL) ^{1,3}			
INFγ	14.0±6.6	0.91±1.45	0.06
IL12	1.41±0.51	-0.09±0.16	0.008
IL2	10.69±3.98	-3.38±3.00	0.016
IL10	1.62±0.72	-0.59±0.57	0.037
IL4	2.62±1.60	-1.03±0.96	ns

Tabla 4. Características clínicas y epidemiológicas de las mujeres VHC-ARN (+) categorizadas como Tipo A y B. ¹ Media ± error estándar de la media (ESM). ² Valores absolutos y (porcentajes). ³ Elevación de los niveles de citoquinas posparto: (3-6 meses después del parto – niveles de citoquinas en el parto). ns= no significativo.

1. 3. Comportamiento de la ALT y carga viral de la madre en el momento del parto, su relación con la TV y el aclaramiento viral.

Los datos obtenidos se resumen en la Figura 16. El porcentaje transmisión vertical es del 17% (15/89), sin embargo, el porcentaje de niños con viremia persistente es sólo del 2,2% (2/89). Para un análisis más detallado hemos tenido en cuenta los siguientes parámetros y su relación con la transmisión vertical del VHC:

A) Carga viral y transmisión vertical: Si clasificamos a las madres en función de los valores de su carga viral en el parto en carga viral alta (>600.000 UI/mL) y carga viral baja (<600.000 UI/mL), se observa que el 66% de los niños infectados (10/15) son hijos de madres con carga viral alta ($p=0,02$). Sin embargo, el 33% de las infecciones son producidas en madres con carga viral baja (5/15). Interesantemente los dos niños con viremia persistente (niños crónicamente infectados), nacieron de madres con carga viral alta.

El 83% de los niños verticalmente infectados presentaron aclaramiento viral en algún momento del estudio, este valor es superior al aclaramiento viral observado en adultos.

Es de destacar que estos niños crónicamente infectados presentaron además el genotipo desfavorable de la IL28B (no-CC). El análisis multivariante muestra que la alta carga viral en el parto es una variable independiente en la transmisión vertical (OR: 7,3; IC95%: 1,8-29,4; $p=0,005$).

B) Niveles de ALT en el puerperio y transmisión vertical: se observa una tendencia aunque sin significación estadística, en la que el 80% de los niños infectados verticalmente proceden de madres Tipo A (12/15), y sólo el 20% fueron hijos de las madres Tipo B (3/15).

C) Al tener en cuenta ambos criterios (niveles de ALT y CV en el parto), se observó que las madres Tipo B con carga viral baja presentaban la tasa de transmisión vertical más baja (5%, 1/20) en relación al resto de madres. Así, las madres con alta carga viral presentaron tasas de transmisión vertical similares (en torno al 20%) independientemente de si son Tipo A o B. Estos datos sugieren que las fluctuaciones en los niveles de la ALT o los motivos que la producen (sistema inmune) puedan estar implicados en la transmisión vertical del VHC.

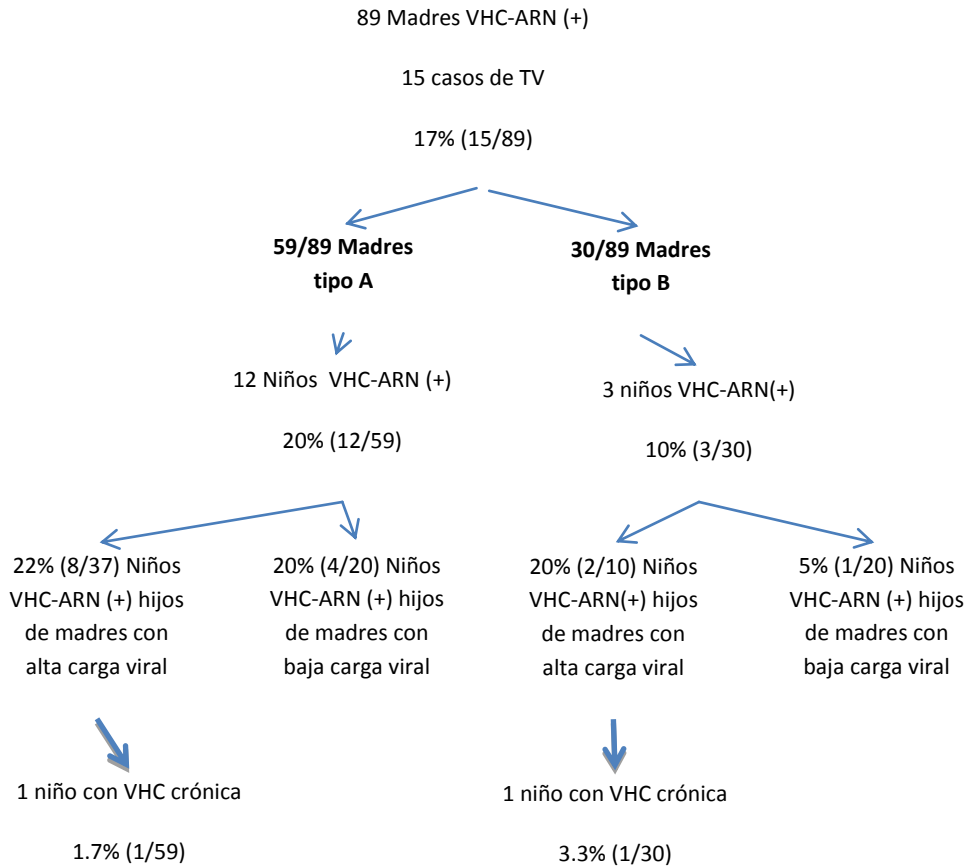


Figura 16. Transmisión vertical en función de la carga viral en el parto y del tipo de madre según niveles de ALT

D) Aclaramiento espontáneo del virus de la hepatitis C en el periodo posparto.

En nuestra población de estudio (89 madres VHC-ARN (+)) 4 madres (4,4%), presentaron aclaramiento viral espontáneo (entre los 3 y 6 meses tras el parto) (Tabla 5), pero los factores implicados son desconocidos. Un posible factor podría estar en relación con la reactivación del sistema inmune tras el parto. Un hecho ya descrito en apartados anteriores parece indicarlo, y es que las madres Tipo A, presentaron una reducción en su carga viral entre los tres y los seis meses tras el parto y como se tratará en el siguiente

capítulo dicho evento podría en relación con los fenómenos de restitución inmunológica tras la gestación (este evento se tratará en el siguiente capítulo).

Otro dato que apoyaría esta hipótesis es que no solo la carga viral esta en relación con el aclaramiento viral como se demuestra en nuestro estudio. Las madres Tipo B fueron las que no presentaron variaciones en los niveles de la carga viral en ninguno de los periodos de estudio (Figura 13). Sin embargo, dos de las madres que aclararon el virus fueron Tipo A y las otras dos Tipo B.

Encontramos que tres de las cuatro madres que aclararon el virus presentaban carga viral baja (<600.000 UI/mL) y genotipo de la IL-28B no TT (dos CC y una CT). Debido al reducido número de madres con aclaramiento viral espontáneo tras el parto, los datos no son estadísticamente significativos.

Nº de caso	Edad	GV	CV	Tipo de madre (ALT)	Genotipo IL28B	EG	Tipo de parto	TV	Contagio	Niño infección crónica	Recidiva
1	33	1	no	B	CC	39	No cesárea	No	ADVP	No	No
2	28	1	no	B	CC	40	No cesárea	Si	Esporadico	No	No
3	35	1	no	A	CT	41	Cesárea	No	Transfusión	No	Si
4	32	3	si	A	TT	41	No cesárea	No	ADVP	No	No

Tabla 5. Características de las mujeres que aclaran el VHC en el posparto. GV: genotipo viral CV: carga viral (>600.000UI/ml si vs no). EG: edad gestacional (semanas), TV: transmisión vertical. Contagio: vía de contagio.

Capítulo 2

Análisis de los fenómenos de inmunomodulación que se producen durante la gestación y el puerperio y su relación con la transmisión vertical del VHC y el aclaramiento viral.

Capítulo 2

2. 1. Fenómenos de inmunomodulación durante el embarazo y el puerperio y su relación con el comportamiento de la ALT y la carga viral de la mujer gestante.

Se realizó la determinación plasmática de las citoquinas Th1 (INF γ , IL12 e IL2) y Th2 (IL10 e IL4) en el momento del parto y el puerperio y se correlacionaron con los niveles de ALT y la carga viral de las mujeres.

Todas las mujeres VHC-ARN (+) incluidas en el estudio presentaron niveles detectables y cuantificables de citoquinas.

Algunas madres VHC-ARN (-) presentaron niveles detectables pero no cuantificables en algunas de ellas: IL12 (6/33), IL2 (5/33) e IL10 (2/33).

Las madres VHC-ARN (+) presentaron un incremento significativo de citoquinas Th1 a los 3-6 meses posparto con respecto a las obtenidas en el parto (Δ INF γ , = $9,1 \pm 2,5$ pg/mL, $p=0,03$; Δ IL-12= 0.85 ± 0.3 pg/mL, $p=0,01$ y Δ IL-2= $5,4 \pm 2,89$ pg/mL, $p=0,07$), mientras que las madres VHC-ARN (-) mantuvieron niveles de citoquinas sin cambios en ambos periodos.

Además las madres VHC-ARN (+) tuvieron niveles más elevados de citoquinas que las VHC-ARN (-) tanto en el parto como a los 3-6 meses del mismo (Figura 17).

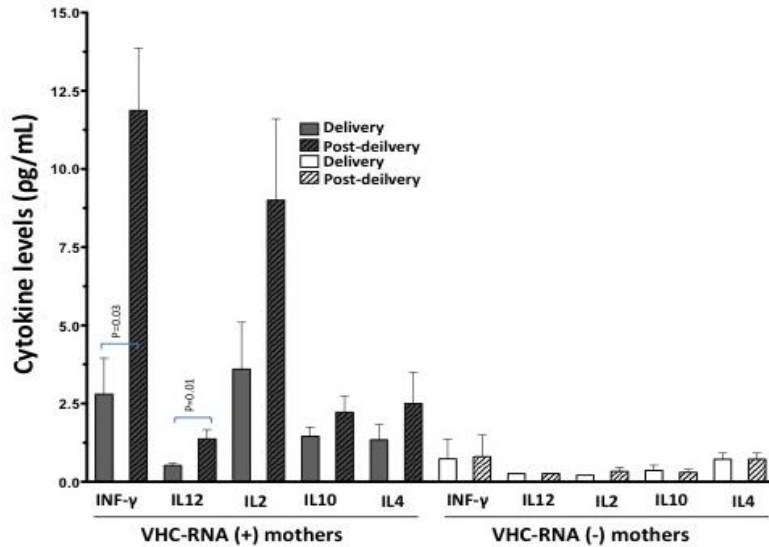


Figura 17: Niveles de citoquinas en madres *Ac-VHC (+)*: *VHC-ARN (+)* vs *VHC-ARN (-)*.

Dentro del grupo de madres **VHC-ARN (+)** también se encontraron resultados interesantes respecto a los niveles plasmáticos de citoquinas en función de que se tratara de madres Tipo A o Tipo B (según sus niveles de ALT en el parto, ver capítulo 1):

Madres Tipo A: presentaron después del parto un incremento en los niveles de citoquinas Th1 (INF γ , IL12 e IL2) así como de IL10 (citoquina Th2). Este incremento se produjo en el periodo de los 3-6 meses después del parto. El mayor incremento de citoquinas se produjo a expensas fundamentalmente de las citoquinas INF γ e IL2 (Figura 18)

Estos datos analizados junto con los descritos en el capítulo 1 (incremento en los niveles de ALT y caída en la carga viral en este mismo periodo), indican que la restitución inmunológica hacia una respuesta Th1 en las mujeres Tipo A durante el puerperio, supone una respuesta defensiva frente al virus que provoca daño hepático (muerte de los hepatocitos infectados por el virus que deriva en la elevación de los niveles de ALT) y una caída en los valores de la carga viral.

Madres Tipo B: Como ya se ha expuesto previamente en el Capítulo 1, no presentaron variación ni en la carga viral ni en las cifras de ALT en ninguno de los periodos de estudio (persistentemente normales). Estas madres presentaron un patrón de producción de

citoquinas muy distinto al de las madres Tipo A o el de las madres Ac-VHC (+) VHC-ARN (-), con un nivel más elevado de citoquinas Th1 (INF γ e IL2) en el momento del parto (Figura 18, p<0,05). Además a diferencia de las madres Tipo A, no se observó un incremento en la producción de citoquinas Th1 en el puerperio respecto al parto.

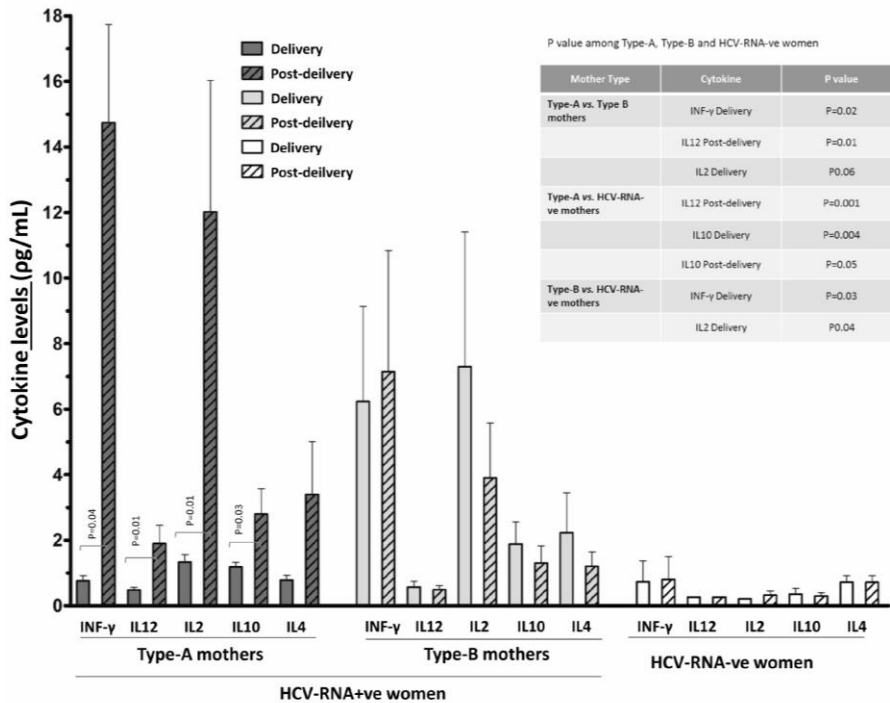


Figura 18: Niveles de citoquinas en madres Ac-VHC (+): VHC-ARN (+) Tipo A vs Tipo B vs VHC-ARN.

Citoquinas Th1/Th2 en madres VHC-ARN (+) Tipo A y B categorizadas por carga viral alta y baja:

Al categorizar a las madres Tipo A y B en función de la carga viral en el parto (Figura 19), se observó que las madres Tipo A con independencia de si tenían alta carga viral o baja en el parto, presentan un patrón similar de producción de citoquinas. Es decir, estas madres muestran un nivel de citoquinas bajo en el parto (ya sean citoquinas Th1 o Th2) y estos niveles se ven incrementados significativamente tras el parto. Este incremento es muy superior en las citoquinas asociadas con respuesta inmunológica Th1 respecto a las relacionadas con respuesta Th2, fundamentalmente de los niveles de las citoquinas INF γ e IL2 (Figura 19).

Por el contrario, las madres Tipo B no presentaron este patrón de citoquinas con independencia de si poseían alta carga viral o baja en el momento del parto. No presentaron incremento en los niveles de citoquinas tras el parto, aunque si que se observaron significativamente elevadas en ambos momentos (parto y puerperio) en relación con las madres Tipo A (con independencia de si poseían carga viral alta o baja en el momento del parto).

Hay que destacar los altos niveles en el parto de las citoquinas $INF\gamma$, IL2 y en menor medida IL10 de las madres tipo B respecto a los que presentaron las madres Tipo A (Figura 19).

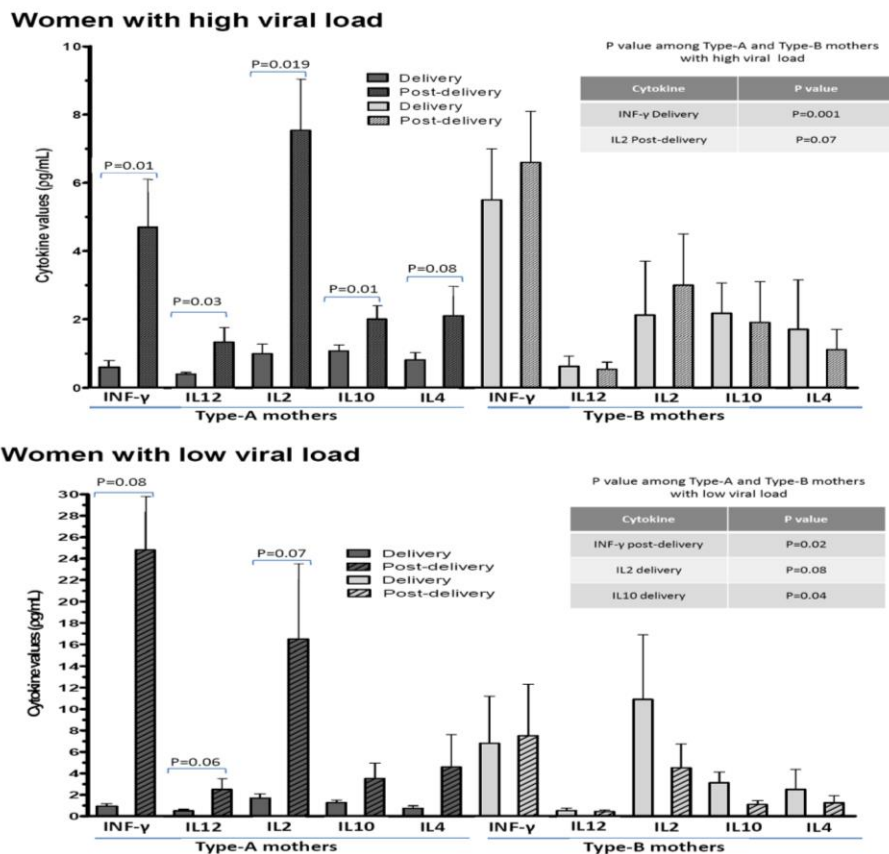


Figura 19: Niveles de citoquinas en madres Ac-VHC (+) y VHC-ARN (+) Tipo A vs Tipo B categorizadas por carga viral alta y carga viral baja. (Madres con alta carga viral: >600.000 UI/mL)

2. 2. Fenómenos de inmunomodulación y su asociación con el polimorfismo de la IL28B de las gestantes y del genotipo viral del VHC.

El estudio de la posible asociación entre los niveles de citoquinas presentes en el parto y posparto y el polimorfismo de la IL28B (genotipo CC frente a genotipo no-CC) y con el genotipo viral (genotipo-1 frente a genotipo no-1), no encontró asociación estadísticamente significativa entre las variables estudiadas.

2. 3. Estudio de la influencia de los niveles de citoquinas maternos Th1 y Th2 en el parto y a los 3-6 meses en la TV y el aclaramiento viral.

El estudio de la transmisión vertical y su posible relación con la producción de citoquinas durante la gestación y puerperio no presentó asociación estadísticamente significativa. El resto de factores analizados y las tasas de transmisión vertical han sido ya analizados en el Capítulo 1, apartado 3.

Capítulo 1

Comunicaciones a congresos

1. Congreso Americano de la AASLD (American Association for the Study of the Liver Diseases) titulado "LIVER MEETING 2011", celebrado en San Francisco, US.

Transaminases and HCV - RNA evolution during pregnancy, delivery and puerperium among women with chronic hepatitis C. A.Ruiz-Extremera^{1,2}; J.Muñoz-Gómez³; M.Salmerón-Ruiz⁴; P.Muñoz de Rueda^{3,2}; R.Quiles^{3,2}; A.Gila^{3,2}; J.Casado³; A.Martín³; L.Sanjuan⁵; A.Carazo³; E.Pavón³; E.Ocete-Hita¹; J.León^{3,2}; J.Salmeron^{3,2}

1. Pediatric Unit, San Cecilio University Hospital, Granada, Granada, Spain; 2. Centro de Investigacion Biomedica en Red de Enfermedades Hepaticas y Digestivas, Ciberehd, Granada, Granada, Spain; 3. Clinical Management Unit of Digestive Disease, San Cecilio University Hospital, Granada, Granada, Spain; 4. Pediatric Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Madrid, Spain; 5. Department of Medicine, Granada University, Granada, Granada, Spain

Program Number: 402

Presentation Time: Saturday, Nov. 5, 2:00 PM - 7:30 PM

Location: Poster Hall

During pregnancy, the Th1 immune response is repressed and it affects to the HCV evolution. Several works have described transaminase level normalization and increase of viral load during gestation, with restitution of original transaminase and viral load levels one year after pregnancy although it does not have been clearly established. The aim of this study was to determine the disease evolution during the pregnancy, delivery and puerperium as a natural model of immune repression and restitution as well as its potential relation with vertical transmission (VT). Between 1991 and 2009, 145 mothers were recruited to this study, out of which, 100 were HCV-RNA+ve/HIV-ve, with 128 children, and 33 were HCV-RNA-ve/HCV antibody+ve, with 43 children. The mothers were tested during pregnancy, delivery and post-delivery at regular intervals until 1 year after the childbirth. The infants were tested for HCV-RNA at birth and at regular intervals until the age of 6 years. In the infants the IL28B (rs12979860) and in the mothers, the IL28B, the serum transaminases (ALT, AST and GGT) and HCV-RNA were determined. No differences in ALT levels were observed during pregnancy (29.4 vs 17.5 UI/mL), and delivery (38.5 vs 23 UI/mL). Between HCV-RNA+ve and HCV-RNA-ve mothers, however, significant differences in ALT levels were observed during the four months after childbirth (98.3 vs 34.5 UI/mL respectively, $p < 0.001$). 67% of the HCV-RNA+ve mothers showed an increase in ALT levels with respect to the delivery and this event was coextensive with a decrease in serum HCV-

RNA with respect to the delivery levels (HCV-RNA was decreased in 2.4×10^6 UI/mL vs 1.1×10^4 UI/mL in the mothers without alteration in ALT, $p < 0.01$). The HCV-RNA+ve mothers were categorized as: (A) Mothers with a decrease in serum HCV-RNA levels between delivery and puerperium (0.5 logarithms), and (B) mothers without decrease. The type A mothers (53%), had higher HCV-RNA levels in the delivery than type B (4.1×10^6 vs 9.4×10^5 ; $p = 0.003$) and in the post-childbirth had higher ALT values (133 vs 63 UI/mL, $p = 0.001$) and AST (76 vs 36 UI/mL, $p = 0.017$). 20% of the infants born of the HCV-RNA+ve mothers acquired HCV infection, but only 7% were chronically infected. 75% of positive infants were born of type A mothers whereas only the 25% of positive children were born of B category mothers ($p < 0.05$). None differences were observed between these groups in regard to GGT levels, viral genotype, age and IL28B (mother and children). Conclusions: The mothers with a decrease in serum HCV-RNA levels between delivery and puerperium exhibited more probability of VT. This decrease was coextensive with an increase in ALT/AST levels.

2.- Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), Madrid, febrero de 2012. (Aceptado)

EVOLUCIÓN DE LA ALT Y DE LA CARGA VIRAL DURANTE LA GESTACIÓN, PARTO Y PUERPERIO EN GESTANTES INFECTADAS CRÓNICAMENTE POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y SU RELACIÓN CON TRANSMISIÓN VERTICAL

Ángeles Ruiz-Extremera^(1,2,3) | José Antonio Muñoz-Gómez⁽⁴⁾ | María Angustias Salmerón-Ruiz⁽⁵⁾ | Paloma Muñoz^(1,4) | Rosa Quiles^(1,4) | Ángel Carazo⁽⁴⁾ | Jorge Casado⁽⁴⁾ | Ana Gila^(1,4) | Ana Martín⁽⁴⁾ | Esther Pavón⁽⁴⁾ | Esther Ocete^(1,2) | Javier Salmerón^(1,4,6)

1-CIBERehd | 2-Hospital Universitario San Cecilio de Granada-Servicio de Pediatría | 3-Universidad de Granada-Fac. Medicina-Dpto. Pediatría. 4-Hospital Universitario San Cecilio-Unidad Clínica de Aparato Digestivo. 5-Hospital la Paz. Unidad de Pediatría. 6-Universidad de Granada-Fac. Medicina-Dpto. Medicina.

Introducción: La evolución de la infección crónica por VHC durante la gestación y puerperio no está claramente definida. En este periodo, la respuesta inmune Th1 se encuentra reprimida y puede afectar al curso de la enfermedad.

Objetivos: Determinar la evolución de la enfermedad viral durante la gestación y puerperio en un modelo natural de represión y restitución de la respuesta inmune, así como su potencial relación con la transmisión vertical del VHC.

Pacientes y Métodos: Se reclutaron 122 madres gestantes seguidas en el Hospital Universitario San Cecilio entre los años 1991 y 2009. 89 madres fueron VHC-RNA+vo y 33 VHC-RNA-vo/VHC antiVHC+vo. Se analizaron los niveles séricos de ALT y carga viral durante

intervalos regulares en el embarazo, en el parto y se finalizó un año después de la gestación. En los recién nacidos se midieron los niveles séricos de VHC-RNA a intervalos regulares desde el nacimiento hasta los 6 años de edad. A los niños positivos se les determinó el genotipo viral. Se asumió transmisión vertical cuando los niños presentaron VHC-RNA+vo en dos muestras de sangre consecutivas. Finalmente, se determinó el polimorfismo de la IL28B en las madres y en sus hijos.

Resultados: Los niveles séricos de ALT permanecieron normales durante la gestación y el parto, tanto en las madres VHC-RNA+vas como en las VHC-RNA-vas (<40UI/mL). Las madres HCV-RNA+vas presentaron un incremento estadísticamente significativo en los niveles séricos de ALT a los 6 meses tras el parto con respecto a las HCV-RNA-vas (98.3 vs 34.5 UI/mL, $p<0.001$). El 67% de las gestantes HCV-RNA+vas, presentaron niveles elevados de la ALT en el post-parto (>40 UI/mL, clasificadas como madres tipo A) y este evento se correlacionó con un descenso en el puerperio de su carga viral con respecto al parto (descenso en madres tipo A = 2.4×10^6 UI/mL vs madres tipo B = 1.1×10^4 UI/mL, $p<0.05$). El 79% de las madres tipo A presentaron niveles altos de la carga viral en el parto (>600.000 UI/mL) frente al 10% de las tipo B ($p=0.01$). La tasa de transmisión vertical fue del 20% pero solo el 7% de los niños permanecieron crónicamente infectados. Las madres tipo B con baja carga viral (<600.000 UI/mL) presentaron una tasa de transmisión vertical del 5% frente al 20% del resto de madres ($p<0.05$). No se observó ninguna diferencia significativa con respecto a la edad, la etiología, el polimorfismo de IL28B y el genotipo viral entre ambos tipos de madres.

Conclusiones: La mayoría de las mujeres VHC-RNA+vas en el puerperio, sufren un aumento de ALT con descenso de la carga viral, posiblemente por la restitución de la inmunidad Th1. Existe una relación directa entre alta carga viral en el parto e incremento en los niveles de ALT. Las madres tipo B con carga viral baja presentan la tasa de transmisión vertical más baja.

Capítulo 2

Trabajo publicado en la Revista PLOS ONE. Volumen 8. Issue 10. Octubre 2013.

FI: 3,543. Q1.

Variation of Transaminases, HCV-RNA Levels and Th1/Th2 Cytokine Production during the Post-Partum Period in Pregnant Women with Chronic Hepatitis C

Ángeles Ruiz-Extremera^{1,2,3}, José Antonio Muñoz-Gómez^{4*}, Ana Abril-Molina⁵, María Angustias Salmerón-Ruiz⁶, Paloma Muñoz-de-Rueda^{2,4}, Esther José Pavón-Castillero⁴, Rosa Quiles-Pérez^{2,4}, Ángel Carazo⁴, Ana Gila^{2,4}, Sergio Manuel Jimenez-Ruiz^{4,7}, Jorge Casado⁴, Ana Belén Martín⁴, Laura Sanjuán-Núñez^{4,7}, Esther Ocete-Hita^{2,3,5}, Julián López Viota⁴, Josefa León^{2,4}, Javier Salmerón^{2,4,7}

¹ Paediatric Unit, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain, ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Ciberehd, Granada, Spain, ³ Paediatric Unit, Granada University, Granada, Spain, ⁴ Clinical Management Unit of Digestive Disease, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain, ⁵ Paediatric Unit, Virgen de las Nieves Hospital, Granada, Spain, ⁶ Paediatric Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Spain, ⁷ Medicine Department, Granada University, Granada, Spain

Abstract

This study analyses the evolution of liver disease in women with chronic hepatitis C during the third trimester of pregnancy and the post-partum period, as a natural model of immune modulation and reconstitution. Of the 122 mothers recruited to this study, 89 were HCV-RNA+ve/HIV-ve and 33 were HCV-RNA-ve/HIV-ve/HCVantibody+ve and all were tested during the third trimester of pregnancy, at delivery and post-delivery. The HCV-RNA+ve mothers were categorized as either *Type-A* (66%), with an increase in ALT levels in the post-partum period (>40 U/L; $P < 0.001$) or as *Type-B* (34%), with no variation in ALT values. The *Type-A* mothers also presented a significant decrease in serum HCV-RNA levels in the post-delivery period ($P < 0.001$) and this event was concomitant with an increase in Th1 cytokine levels (INF γ , $P = 0.04$; IL12, $P = 0.01$ and IL2, $P = 0.01$). On the other hand, the *Type-B* mothers and the HCV-RNA-ve women presented no variations in either of these parameters. However, they did present higher Th1 cytokine levels in the partum period (INF γ and IL2, $P < 0.05$) than both the *Type-A* and the HCV-RNA-ve women. Cytokine levels at the moment of delivery do not constitute a risk factor associated with HCV vertical transmission. It is concluded that differences in the ALT and HCV-RNA values observed in HCV-RNA+ve women in the postpartum period might be due to different ratios of Th1 cytokine production. In the *Type-B* women, the high partum levels of Th1 cytokines and the absence of post-partum variation in ALT and HCV-RNA levels may be related to permanent Th1 cytokine stimulation.

Citation: Ruiz-Extremera Á, Muñoz-Gómez JA, Abril-Molina A, Salmerón-Ruiz MA, Muñoz-de-Rueda P, et al. (2013) Variation of Transaminases, HCV-RNA Levels and Th1/Th2 Cytokine Production during the Post-Partum Period in Pregnant Women with Chronic Hepatitis C. PLoS ONE 8(10): e75613. doi:10.1371/journal.pone.0075613

Editor: Jason Blackard, University of Cincinnati College of Medicine, United States of America

Received: May 15, 2013; **Accepted:** August 15, 2013; **Published:** October 10, 2013

Copyright: © 2013 Ruiz-Extremera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, Instituto de Salud Carlos III), [grant number PI080704]; Consejería de Salud (SAS), Junta de Andalucía, [grant number SAS11213] and Ciberehd (Ciber de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Instituto de Salud Carlos III). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jamunozgomez@gmail.com

Introduction

Infection with hepatitis C virus (HCV) is a worldwide health problem, affecting over 170 million persons, and is the most common cause of cirrhosis, hepatocellular carcinoma and liver transplantation [1,2]. Its prevalence in pregnant women is similar to that found among the general population. In Spain, the incidence of HCV infection among pregnant women is estimated at 0.53–1.4% [3–5], which is in line with values reported for other industrialized countries [6–8]. Although HCV affects a significant number of pregnant women, few studies have actually examined the role of chronic HCV infection on pregnancy outcomes, and the results presented are contradictory. Some studies have reported obstetrical complications in HCV-infected pregnant women (premature rupture of membranes, preterm delivery, low new-born weight, cholestasis) [9–12], but others have concluded

that, in the absence of cirrhosis and portal hypertension, most HCV-infected pregnant women do not experience obstetric complications [6,13,14]. During pregnancy, the treatment of HCV is contraindicated, and therefore there are no antiviral treatment recommendations for HCV-infected women during pregnancy, or guidelines for the prevention of vertical transmission, even though perinatal transmission is associated with a higher incidence of chronic liver disease [15]. Parity, hormone replacement therapy for postmenopausal women and the female sex have all been reported as protection factors against the progression of liver disease to cirrhosis, because the female hormones (oestrogen, progesterone) might play a role in delaying the onset of hepatic fibrosis [16–19]. Nonetheless, the natural history of chronic HCV infection during pregnancy and the puerperium has not been clearly established. In this period, the maternal immune system must develop a tolerance to paternal alloantigens in order to

prevent maternal immune aggressions against the fetus and maintain active immunity against infectious agents to protect both the mother and fetus [20]. For this reason, during pregnancy, the T helper 1 (Th1) associated cellular immune response is repressed and Th2-type immunity is stimulated in response to pathogens [21,22]. These data suggest that the reduced hepatic damage detected in chronic HCV pregnant women (measured as low ALT levels) may be mediated by a modified Th1 immune response during pregnancy [8]; however, it should be noted that very few data have been reported and that many unanswered questions remain in this respect.

The vertical transmission of HCV (HCV-VT) is the major cause of paediatric HCV infection, and in industrialized countries it is the most common cause of chronic liver disease in children. Although the persistent transmission of HCV from infected mothers to their infants is reported in 4–8% of cases (chronically HCV-infected children), transient HCV perinatal infection also occurs, with an incidence of about 14–17% [23,24].

Our clinical experience with pregnant women has shown that not all HCV-RNA+ve mothers have the same ALT pattern; some women appear to be “immune-tolerant” to HCV during pregnancy and the puerperium, presenting non-significant differences in viral load values together with persistently normal ALT levels. This finding led us to analyse the evolution of transaminases, HCV-RNA serum levels and Th1/Th2 cytokine production. Our study provides new insights into changes in ALT and HCV-RNA levels and a better understanding of the modulation of Th1/Th2 cytokine production in pregnant women with chronic hepatitis C.

Materials and Methods

Subjects

A prospective cohort study was conducted at San Cecilio University Hospital in Granada (Spain) from 1991 until 2009, where mothers were routinely tested for HCV during prenatal care (by the same doctors and with the same protocols). All patients included in this study were Caucasian race. The exclusion criteria were evidence of hepatitis B virus, HIV, alcoholism or autoimmune disease. The 122 mothers recruited to this study were classified into two groups: HCV-RNA+ve/HIV-ve (referred to as HCV-RNA+ve, n=89) and HCV-RNA-ve/HIV-ve/HCV-antibody+ve (control group, referred to as HCV-RNA-ve, n=33). No obstetric complications were detected. The mothers were followed up in the Hepatology Unit of our Hospital and during the study period did not receive any immunomodulatory treatment (direct or indirect), such as steroids, IFN therapy, anti-inflammatory therapy, antibiotics or hormonal therapy. The mothers were tested for the study parameters during the third trimester of pregnancy (from week 28 of gestation to the end of the pregnancy), at delivery and during the post-partum period. Of the ALT determinations obtained for each post-partum group, the highest one in each case was used to categorize the women as Type-A or Type-B. The infants were examined by paediatricians and tested for HCV-RNA at birth and at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 and 24 months, and thereafter at 3, 4, 5 and 6 years. IL28B (IFNL3) polymorphism (rs12979860) was determined in the infants and in their mothers. The HCV-RNA+ve women were then classified according to their ALT values in the post-partum period (3-6 months post-delivery) as either *Type-A*: with raised ALT levels in the postpartum period ($ALT_{Postpartum} > 40$ U/L) or as *Type-B*: with unchanged ALT values ($ALT_{Postpartum} \leq 40$ U/L). The normal range of values for ALT was 10–40 U/L. To account for these differences, we studied the levels of HCV-RNA and of Th1 cytokines (INF γ , IL12 and

IL2) and of Th2 cytokines (IL10 and IL4). The diagnosis of HCV-VT was based on detectable HCV-RNA in the peripheral blood by the polymerase chain reaction (PCR), defined as infants who presented HCV-RNA+ve in at least two subsequent blood samples. This criterion was established to minimize the risk of false positives. The persistent infection group of chronically HCV-infected children was defined as those children with persistent HCV-RNA+ve with HCV serum-conversion (detectable anti-HCV). Informed written consent was obtained in all cases (from each mother and by them on behalf of their children), and the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Helsinki Declaration, as reflected in the *a priori* approval granted by the ethics committee of the San Cecilio University Hospital (Granada, Spain).

ALT determination

The Clinical Biochemistry Laboratory at the San Cecilio University Hospital performed serum ALT measurements during the three months before delivery, at delivery and at 3–6 and 7–12 months post-partum.

Virologic assays

HCV genotyping was determined by reverse hybridization (Inno-LiPA II HCV Innogenetics SA Ghent, Belgium) by the Clinical Biochemistry Laboratory of the San Cecilio University Hospital. Quantitative measurement of viral load (cut-off <15 IU/mL) was carried out using the HCV AmpliPrep TaqMan, Roche Molecular System, at the same time as ALT determination.

Cytokine quantification

Th1 cytokine response (INF γ , IL-12 and IL-2) and Th2 (IL-10, IL-4) were quantified at delivery and at 3–6 months post-partum in the serum of the mothers. These parameters were measured simultaneously using multiple immunoassay kits (Procarta[®] Cytokine Assay Kit, Quantitative Biology, Affymetrix[®]), following the manufacturer's instructions and using the Luminex[®] Technology. Quantitative data were obtained using the Luminex-200 system (Luminex Corporation, Austin, TX), and the data were analysed using Luminex 100[™] IS v2.3 software. The sensitivity of the analytes tested was 0.12 pg/mL (High Sensitivity Human Cytokine Panel). To increase the sensitivity of the kit to this value (0.12 pg/mL), the manufacturer advised us to introduce a new standard with a lower concentration of the analyte (they recommended using 9 standards instead of 8). All the HCV-RNA+ve mothers included in the study presented detectable and quantifiable levels of these cytokines. Some of the HCV-RNA-ve mothers presented detectable not quantifiable levels of some cytokines. In these cases, the standard sensitivity of the kit was used. The numbers of the HCV-RNA-ve mothers with unquantifiable levels were: IL12: 6/33, IL2:5/33 and IL10: 2/33.

IL28B (IFNL3) genotyping

Rs12979860 genotyping was performed by means of a Taqman 5' allelic discrimination assay (Custom Assay Service, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described previously [24,25].

Statistical Analysis

Data management and analysis were performed using SPSS 15.0 for Windows. The criterion for statistical significance was P-value \leq 0.05. Qualitative variables are expressed as absolute values with percentages, and quantitative variables are expressed

as mean values \pm SEM (standard error of the mean). Comparisons between groups for categorical variables were made by the χ^2 and Fisher's exact test. For differences in the quantitative variables, the paired/unpaired Student's *t* test for normally distributed variables and the Mann-Whitney Test for variables with a non-normal distribution were applied. The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyse the distribution of the quantitative variables. Pearson's correlation was employed to analyse the degree of linear relationship between two variables.

Results

Study cohort

The characteristics of the mothers included in this study are described in Table S1. There were no significant differences in median age, gestational age (period of time between conception and birth), type of birth, new-born weight, etc. However, of the 89 HCV-RNA+ve mothers, 21 (23%) had IL28B CC polymorphism whereas among the 33 HCV-RNA-ve women (control group), 20 (61%) had IL28B CC polymorphism ($P>0.01$). Accordingly, the mothers with non-CC IL28B polymorphism had a greater probability of being HCV-RNA+ve than did those with CC polymorphism (OR = 3.01; 95%CI: 1.3–5.7; $P=0.02$). 74% of the HCV-RNA+ve mothers had been infected by parenteral route. The mean value of the viral load in the HCV-RNA+ve mothers was 2,709,588 IU/mL and 75% of these mothers had viral genotype 1. Moreover, 54% of the HCV-RNA+ve women had high viral load ($>600,000$ IU/mL) at delivery.

ALT and cytokine evolution in HCV-RNA+ve vs. HCV-RNA-ve mothers

The evolution of ALT in the HCV-RNA+ve and in the HCV-RNA-ve women is shown in Figure 1A. Interestingly, non-significant differences in ALT values were observed between these groups during the third trimester of pregnancy (from week 28 of gestation to the end of the pregnancy), and at delivery. However, after delivery (3–6 months post-partum), the HCV-RNA+ve mothers showed higher ALT levels than did the HCV-RNA-ve mothers (98.32 ± 9.34 U/L *vs.* 17.42 ± 1.77 U/L; $P<0.001$). Moreover, the HCV-RNA+ve mothers presented a significant increase in Th1 cytokines at 3–6 months post-partum (Δ INF- $\gamma = \text{INF-}\gamma^{\text{post-partum}} - \text{INF-}\gamma^{\text{partum}} = 9.1 \pm 2.5$ pg/mL, $P=0.03$; Δ IL-12 = $\text{IL-12}^{\text{post-partum}} - \text{IL-12}^{\text{partum}} = 0.85 \pm 0.30$ pg/mL, $P=0.01$ and Δ IL2 = $\text{IL-2}^{\text{post-partum}} - \text{IL-2}^{\text{partum}} = 5.4 \pm 2.89$ pg/mL, $P=0.07$) whereas in the HCV-RNA-ve mothers the cytokine values in the peripheral blood remained unchanged (however this does not mean that such differences do not exist in the placenta, decidua and umbilical cord). Furthermore, the HCV-RNA+ve mothers had higher cytokine levels than the HCV-RNA-ve mothers, both at delivery and 3–6 months post-partum. On the other hand, in the HCV-RNA+ve mothers there was no significant association between cytokine levels and IL28B polymorphism (CC *vs* non-CC) or between cytokine levels and viral genotype [geno. 1 (1a *vs* 1b) and *vs* geno. non-1 (3 and 4)].

Variations in ALT levels in HCV-RNA+ve mothers: Type-A and Type-B women

Not all the HCV-RNA+ve mothers presented the same patterns with respect to the parameters analysed. Therefore, and as described in the Experimental Procedures section, these women were categorized as either *Type-A* (59/89; 66%): raised serum ALT levels in the post-partum period ($\text{ALT}^{3-6 \text{ months post-partum}} > 40$ U/L and an average increase in ALT level calculated as $\Delta\text{ALT} = \text{ALT}^{3-6 \text{ months post-partum}} - \text{ALT}^{\text{partum}} = 100 \pm 7$ U/L;

$P<0.001$), or *Type-B* (30/89; 34%): unchanged ALT values ($\text{ALT}^{\text{post-partum}} \leq 40$ U/L) (Figure 1A). The *Type-A* women, at 7–12 months post-partum, presented a significant decrease in ALT values ($\Delta\text{ALT} = \text{ALT}^{3-6 \text{ months post-partum}} - \text{ALT}^{7-12 \text{ months post-partum}} = 70.52 \pm 10.49$ U/L; $P<0.01$). Interestingly, the *Type-B* mothers had a similar ALT pattern to that presented by the HCV-RNA-ve women (Figure 1A).

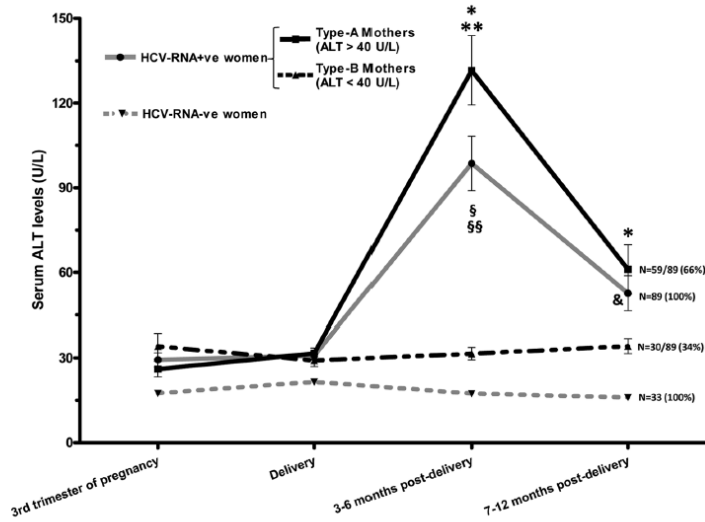
Characteristics of the Type-A and Type-B mothers

The characteristics of the *Type-A* and *Type-B* mothers are described in Table 1. Some clinical characteristics, such as median age, viral genotype, IL28B polymorphism, type of birth, breast-fed infants, breast-feeding days, epidemiology, gestational age, etc., were similar, but important features that might account for the categorization in each case were also found; thus, 38/59 (64%) of the *Type-A* mothers had high HCV viral load at delivery ($>600,000$ IU/mL) in contrast to 10/30 (33%) of the *Type-B* women ($P=0.01$). Furthermore, the *Type-A* mothers presented a significantly lower viral load after delivery than the *Type-B* mothers ($\Delta\text{VL} = \text{VL}^{3-6 \text{ months post-partum}} - \text{VL}^{\text{partum}} = -2,438,867 \pm 643,942$ IU/mL *vs.* $11,288 \pm 664,352$ IU/mL respectively; $P=0.031$). Another interesting aspect is the relation between cytokine levels and type of mother (Table 1 and Figure 1B). Thus, the *Type-A* mothers at 3–6 months post-partum presented higher values for INF γ , IL12 and IL2 (Th1 cytokine), as well as for IL10 (Th2 and anti-inflammatory cytokine). The largest such increases took place in the Th1 cytokines INF γ and IL2. It is known that before and during delivery, the levels of oestradiol and progesterone may vary. In order to determine the possible effect on cytokine production, we studied the Th1/Th2 cytokines in the control group (HCV-RNA-ve mothers). No partum effect was detected (Figure 1B), and therefore whatever change took place in the female hormones during the intra-partum period had no effect on cytokine production. On the other hand, the *Type-B* mothers did not show this cytokine behaviour pattern and no statistically significant data were obtained. These *Type-B* mothers had higher INF γ and IL2 levels at the moment of delivery than did the HCV-RNA-ve and *Type-A* mothers (Th1 cytokines, Figure 1B, $P>0.05$).

ALT and HCV viral load evolution in both types of HCV-RNA+ve pregnant women

Analysis of ALT and HCV viral load revealed a temporal correlation among the *Type-A* mothers (Figure 2); ALT levels had increased and the viral load had decreased at 3–6 months post-partum (Figure S1; $P<0.0001$; Pearson's $R = -0.740$). However, the *Type-B* women did not present this correlation (Figure S1; $P=0.234$; Pearson's $R = 0.234$). Furthermore, analysis of the HCV viral load in the *Type-A* women (Figure S2) showed that both in the mothers with high HCV-RNA viral load ($>600,000$ IU/mL) and in those with low HCV-RNA levels at delivery ($\leq 600,000$ IU/mL), there was a significant decrease in the HCV viral load. This post-partum decrease was independent of the HCV-RNA values at delivery. However, the *Type-A* women, whether with high or low viral load at delivery, presented raised INF γ , IL12 and IL2 levels post-partum (compared with the partum values, Th1 cytokines, Figure S3) and higher levels of IL10 (Th2 and anti-inflammatory cytokines). These data suggest that the cytokine behaviour pattern has a stronger influence on ALT evolution at delivery and 3–6 months post-partum than does the viral load at the same times. On the other hand, the *Type-B* women classified according to viral load at delivery did not present this behaviour pattern with respect to the evolution of cytokine levels in the peripheral blood.

A: ALT evolution in HCV-RNA-ve and HCV-RNA+ve pregnant mothers (Type-A and Type-B)



B: Cytokine levels in HCV-RNA+ve (Type-A vs.Type-B) and HCV-RNA-ve pregnant mothers

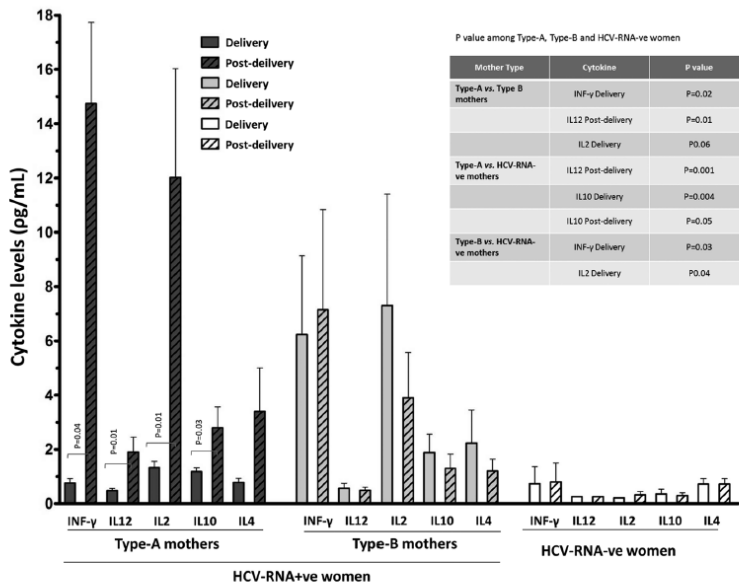


Figure 1. Evolution of ALT (A) and cytokine serum levels (B) in HCV-RNA-ve and HCV-RNA+ve pregnant women (categorized into Type-A and Type-B mothers). Statistical analysis was performed using the paired/unpaired Student's t test for normally distributed quantitative

variables and the Mann-Whitney Test for quantitative variables with a non-normal distribution. The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyse the distribution of quantitative variables. ¹P<0.01 comparing HCV-RNA+ve and HCV-RNA-ve mothers. ²P<0.01 comparing HCV-RNA+ve mothers, 3–6 months post-partum, at delivery and at 7–12 months post-delivery. ³P<0.01 comparing Type-A and Type-B HCV-RNA+ve mothers. ⁴P<0.001 comparing Type-A mothers at 3–6 months post-partum, at delivery and at 7–12 months post-partum. doi:10.1371/journal.pone.0075613.g001

HCV vertical transmission

The analysis of cytokine levels at delivery did not reveal any statistically significant association with HCV vertical transmission (HCV-VT). The categorization of mothers into Type-A and B showed that of the 15 infants suffering vertically transmitted HCV, 12 were born of Type-A mothers and only 3 of Type-B mothers; nevertheless, the difference was not statistically significant (Table 1 and Figure 3). Interestingly, when we categorized the Type-A and Type-B mothers in accordance with their viral load values (high or low), the Type-B mothers with low viral load had the lowest probability of HCV vertical transmission (5% in comparison to 20% in the rest of the HCV-RNA+ve women, Figure 3). In relation to chronically HCV-infected children, only two infants were HCV-RNA+ve at the end of the study (2 of the 89 children were born of HCV-RNA+ve mothers, 2.2%) and no statistically significant data were obtained. It is noteworthy that the IL28B genotype observed in the two chronically HCV-infected infants was non-CC.

HCV-RNA spontaneous clearance in pregnant mothers

In our study cohort, several spontaneous HCV clearances [4 of the 89 women (4.4%)] were observed, at 3–6 months after delivery (Table S2), but the factors involved are unknown. Three of these

four women had low viral load and IL28B genotype non-TT (two women were CC and one was CT). In this respect, no differences were detected between Type-A and Type-B mothers. One mother suffered a relapse some months after the spontaneous clearance.

Discussion

The aim of this study was to determine ALT evolution in women with chronic hepatitis C during the third trimester of gestation, at delivery and in the post-partum period, as a natural model of immune modulation and reconstitution; accordingly, we analysed the relations between serum ALT levels, the HCV-RNA viral load and Th1/Th2 cytokine production.

To date, only a few studies, with small sample populations, have considered the evolution of HCV during both pregnancy and the post-delivery period. Therefore, much remains unknown in this respect. Our study addresses this issue using a representative cohort of HCV-RNA+ve and HCV-RNA-ve pregnant women. The cohort was monitored in regular follow-ups, from the third trimester of gestation until one year after delivery. In the HCV-RNA+ve mothers, during the third trimester of gestation and at delivery, non-significant differences in ALT values were observed. Moreover, the ALT values presented were analogous with those

Table 1. Characteristics of the Type-A and Type-B mothers.

	Variable	Type-A mothers n = 59 (66%)	Type-B mothers n = 30 (34%)	P-Value
Mother characteristic	Age ¹	29±0.7	30±0.9	ns
	Gestational age ¹ (weeks)	38.84±0.3	38.80±0.4	ns
	IL28B genotype ² (CC)	15 (25)	6 (20)	ns
Viral characteristic	Epidemiology ² (Parenteral)	42 (71)	24 (80)	ns
	Viral Genotype ² (Geno. 1)	45 (76)	22 (73)	ns
	Viral Genotype ² (Geno. 3)	12 (20)	7 (23)	ns
	Viral Genotype ² (Geno. 4)	2 (0.3)	1 (0.3)	ns
	Delivery viral load ² (>600,000 IU/mL)	38 (64)	10 (33)	0.01
Child characteristic	VL _{delivery} - VL _{post-childbirth (3–6 months)} ¹	-2438.867±643.942	11.288±664.352	0.031
	HCV-RNA spontaneous clearance ²	2 (3)	2 (6)	ns
	Weight (g) ¹	3216±68	3025±105	ns
Cytokine values³	Vertically transmitted ² (yes)	12 (20)	3 (10)	ns
	Type of birth ² (Caesarean)	11 (19)	8 (27)	ns
	Breast-fed ² (yes)	42 (71)	23 (77)	ns
	Breast-feeding days ¹	50±8	60±15	ns
Cytokine values³	INFγ	14.0±6.6	0.91±1.45	0.06
	IL12	1.41±0.51	-0.09±0.16	0.008
	IL2	10.69±3.98	-3.38±3.00	0.016
	IL10	1.62±0.72	-0.59±0.57	0.037
	IL4	2.62±1.60	-1.03±0.96	ns

¹Mean ± the standard error of the mean (SEM) ns = non-significant

²Values are absolute with percentages in parentheses VL = Viral Load

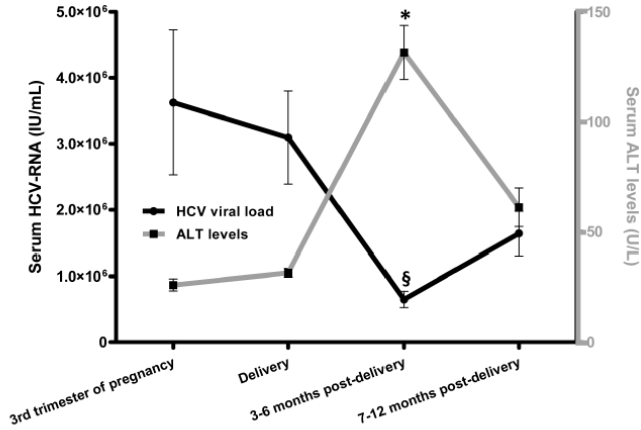
³3–6 months post-partum-delivery; pg/mL

Bivariate analysis: P-value by chi-squared test for qualitative variables and Student's t test for normally distributed quantitative variables and the Mann-Whitney Test for quantitative variables with a non-normal distribution.

doi:10.1371/journal.pone.0075613.t001

Relation between ALT levels and viral load in serum of Type-A and Type-B mothers

Type-A pregnant women



Type-B pregnant women

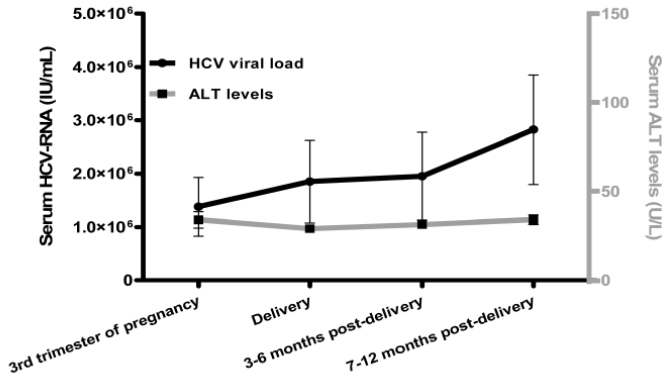


Figure 2. Relation between ALT levels and HCV viral load in the serum of Type-A and Type-B mothers. Statistical analysis was performed using the paired/unpaired Student's t test for normally distributed quantitative variables and the Mann-Whitney Test for quantitative variables with a non-normal distribution. The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyse the distribution of quantitative variables. *, § P<0.001, comparing the third trimester of pregnancy, delivery and 7–12 months post-partum. doi:10.1371/journal.pone.0075613.g002

for the HCV-RNA-ve mothers (ALT ≤ 40 U/L). These data are in accordance with the findings of Gervais et al. [26] and Paternoster et al. [27], who reported decreased ALT levels in serum during the second and third trimesters of pregnancy until normal ALT values (ALT ≤ 40 U/L), together with a corresponding increase in HCV-

RNA levels. We show that not all HCV-RNA+ve mothers present the same behaviour patterns in the puerperium for the parameters analysed (essentially, the ALT levels). For this reason, the women were classified into two groups: Type-A (66%) with increased ALT levels in the post-partum period, and Type-B (34%), with no

HCV vertical transmission in the study cohort

Study Cohort

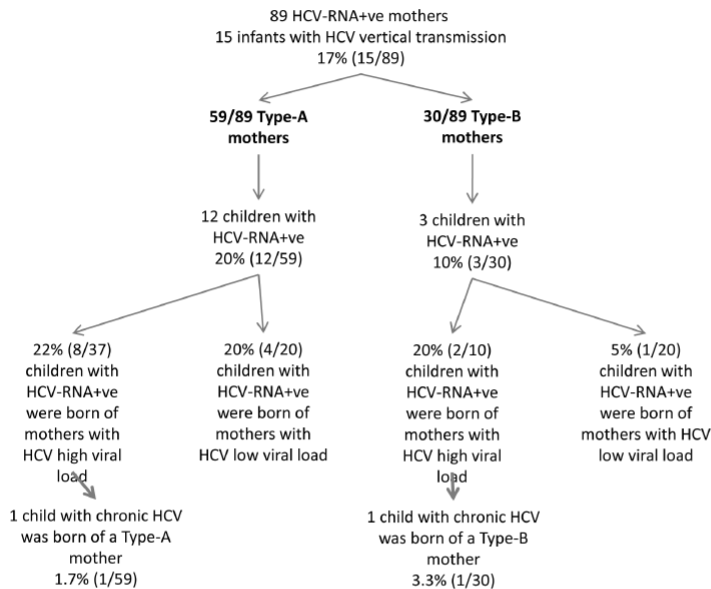


Figure 3. Description of HCV vertical transmission in the study cohort, showing the data for the 89 HCV-RNA+ve women (categorized into Type-A and Type-B mothers).
doi:10.1371/journal.pone.0075613.g003

variation in these ALT values. To account for these differences, we evaluated HCV-RNA and Th1/Th2 cytokine levels in the peripheral blood. The Type-A mothers presented a significant decrease in serum HCV-RNA levels in the post-partum period, and this event was concomitant with an increase in Th1 cytokine levels. Moreover, in the HCV-RNA+ve mothers as well as in each of the two subgroups (Types A and B), there was no significant association between the HCV viral genotype vs. the ALT and vs. cytokine levels. On the other hand, Lin et al. [28], in a study of ten pregnant women, and Hattori [29], who studied 22 pregnant women, found that HCV-RNA levels tend to decrease in the post-partum period. However, neither of these studies provided a definitive immune interpretation of these events. It has been widely reported that in the general population (but not among pregnant women with chronic HCV), the Th1 response is related to viral clearance and treatment response, while that of Th2 is related to HCV chronicity [30]. Thus, in the Th1 immune response against HCV, the IL12 released from dendritic cells promotes a cell-mediated response, eliciting a secretion of INF-gamma by NK and T cells. This event favours neutrophil and

macrophage recruitment and provokes an inflammatory response. Therefore, the post-delivery stimulation of Th1 immune-response observed in the Type-A women may explain the decrease in HCV-RNA viral load and the increase in the ALT levels as the result of a hepatic injury. In our opinion, this period may be an optimal time to initiate antiviral treatment in Type-A women who failed to respond to previous treatment, because this Th1 re-stimulation might augment their natural defence mechanisms. IL10 is a potent anti-inflammatory Th2 cytokine, mainly produced by monocytes, macrophages and T cells, and it is capable of inhibiting the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-2. Moreover, it has been reported that increased levels of IL-4 can promote the conversion of macrophages into an M2 phenotype (also termed repair macrophages or anti-inflammatory M2 macrophages) and inhibit the activation of M1 macrophages (inflammatory M1 macrophages). Increased levels of repair macrophages (M2) are associated with the secretion of IL-10 and TGF- β , which reduce pathological inflammation [31]. Consequently, we consider that the slight increase in IL10 ($P=0.03$) and in IL4 (non-significant, $P>0.05$), might be an

attempt to reduce the intense inflammatory response triggered by Th1 cytokines. These data suggest that treatment with Th1 cytokines might have beneficial results in HCV therapy. Currently, only INF- α is used in the treatment of chronic viral hepatitis because the effectiveness of the exogenous administration of IL12, IL2 and IL10 is unclear [30]. On the other hand, in the HCV-RNA-ve mothers the cytokine values in the peripheral blood remained unchanged because the mothers' immunity was not stimulated in response to HCV.

In the present study, the Type-B mothers were studied in detail. These women presented no variations in any of the parameters analysed and appeared to react as "immune-tolerant" to HCV (women with non-significant differences in their viral load values, together with persistently normal ALT levels). However, when we analysed the Th1/Th2 cytokine production, our initial opinion was modified, because surprisingly, the Type-B women were found to have a stimulated immune system with high levels of INF- γ and IL-2 (Th1 cytokines) both before and after delivery. Interestingly, several studies of the general population of chronically HCV infected persons have reported high baseline levels of Th1 cytokines (IL-2, INF- γ and TNF- α) and the expression of interferon-stimulated genes, together with an absence of post-treatment variation in the serum of patients without sustained viral response (non-SVR) [32–35]. We consider that in the Type-B mothers, as in non-SVR patients, the activation of the endogenous Th1 system is unable to reduce the levels of the HCV infection and that this may be associated with an ineffective or exhausted antiviral response. However, the biological mechanism responsible for the high baseline expression remains unclear. Recent studies have suggested that baseline expression is associated with IL28B polymorphism [36,37], although others have concurred with us in finding no such association [38,39].

In relation to the vertical transmission of HCV, no relation was observed with Th1/Th2 cytokine levels in the peripheral blood. These data are in accordance with the findings of Paternoster et al., who reported that the levels of endogenous interferon- α during pregnancy were not related to the vertical transmission of HCV [40]. However, it was recently reported that the placenta constitutes an active innate immunological organ that provides antiviral protection against HCV transmission [41]. These authors described several locally acting mechanisms in HCV-exposed placenta, such as the increased production of cytokines by NK cells (IFN- β , SLPI, etc.) and the cytotoxicity triggered by NK T cells [41], which protect the foetus against HCV. These data might complement those observed at the systemic level (modulation in the Th1 immune response). Further studies are needed to better understand the complexities of the immune system during the pregnancy and its relation with the vertical transmission of HCV. We identified a group of pregnant women with the lowest HCV-VT rate. These mothers were characterized by low viral load and by the absence of any increase in ALT levels after delivery. These findings are in accordance with those of previous studies, which have identified the main risk factors for perinatal mother-to-child transmission of HCV as the high concentration of HCV-RNA in maternal blood and HIV co-infection [25]. Two studies have shown that high ALT levels in the serum during pregnancy and at delivery are associated with higher rates of HCV-VT [42,43]. Due to the low number of chronically HCV-infected children in our study cohort, no statistically significant data in this respect were obtained; nevertheless, an interesting point was that the IL28B genotype observed in the two chronically HCV-infected infants was non-CC, a finding that is in accordance with our own previously published data [24].

All retrospective analyses have inherent limitations, but we have tried to minimize these effects. The standard method of HCV determination was modified during the patient inclusion period, but this factor was controlled by using the same PCR technique (HCV Ampliprep TaqMan, Roche Molecular System) on all the patients studied, using a stored blood sample. The standard care procedure for HIV and HCV patients was also modified during the patient inclusion period; however, in this study the risk factors for the HIV-ve mothers (Study Cohort) were identified. According to standard protocols for HCV-RNA+ve pregnant women, no HCV treatment should be applied during pregnancy, and thus the changes in standard care for HCV patients do not affect our study.

In conclusion, the different values for ALT (in the post-partum period) and HCV-RNA (at delivery and in the post-partum period) observed in the HCV-RNA+ve women might be due to different ratios of Th1 cytokine production. Thus, the Type-A mothers presented a significant decrease in serum HCV-RNA levels in the post-partum period and this event was concomitant with an increase in Th1 cytokine levels. On the other hand, in the Type B women, the high levels of Th1 cytokines observed at delivery, together with the unchanged levels of ALT and HCV-RNA post-partum, may be related to the existence of permanent Th1 cytokine stimulation. Finally, the cytokine values in the HCV-RNA-ve mothers did not change, because their immunity was not stimulated against HCV. The findings of this study could enhance our understanding of the natural history of chronic hepatitis C infection during pregnancy and the puerperium, and help identify mothers at low risk of vertical HCV infection, which would be useful for the development of prevention strategies.

Supporting Information

Figure S1 Measure of the association between Δ ALT and Δ Viral load. The HCV-RNA+ve mothers exhibited a significant correlation between ALT levels and viral load, while the Type-B women did not present this association. Δ ViralLoad = $VL^{2-6 \text{ months post-partum}} - VL^{\text{partum}}$, Δ ALT: $ALT^{3-6 \text{ months post-partum}} - ALT^{\text{partum}}$. Statistical analysis was performed using Pearson's r to measure the correlation (linear dependence) between the two variables. (TIF)

Figure S2 HCV-RNA+ve women classified according to their viral load. Mothers with high viral load: $>600,000$ IU/mL; mothers with low viral load: $\leq 600,000$ IU/mL. Statistical analysis was performed using the paired/unpaired Student's t test for normally distributed quantitative variables and the Mann-Whitney Test for quantitative variables with a non-normal distribution. The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyse the distribution of quantitative variables. (TIF)

Figure S3 The evolution of the cytokine serum levels in HCV-RNA+ve pregnant women (Type-A vs. Type-B) categorized into high viral load and low viral load according to the serum HCV-RNA levels in the intra-partum period. Mothers with high viral load: $>600,000$ IU/mL; mothers with low viral load: $\leq 600,000$ IU/mL. Statistical analysis was performed using the paired/unpaired Student's t test for normally distributed quantitative variables and the Mann-Whitney Test for quantitative variables with a non-normal distribution. (TIF)

Table S1 Characteristics of HCV-RNA-ve and HCV-RNA+ve mothers. (TIF)

Table S2 Characteristics of the mothers with HCV-RNA spontaneous clearance during pregnancy and/or puerperium. (TIF)

References

- Pol S, Valles-Pichard A, Corouge M, Mallet VO (2012) Hepatitis C: epidemiology, diagnosis, natural history and therapy. *Contrib Nephrol* 176: 1–9.
- Seeff LB (2002) Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36: S35–46.
- Salmeron J, Gimenez F, Torres C, Ros R, Palacios A, et al. (1998) Epidemiology and prevalence of seropositivity for hepatitis C virus in pregnant women in Granada. *Rev Esp Enferm Dig* 90: 841–850.
- Ruiz-Extremera A, Salmeron J, Torres C, De Rueda PM, Gimenez F, et al. (2000) Follow-up of transmission of hepatitis C to babies of human immunodeficiency virus-negative women: the role of breast-feeding in transmission. *Pediatr Infect Dis J* 19: 511–516.
- Ruiz-Extremera A, Lopez-Garrido MA, Barranco E, Quintero MD, Ocete-Hita E, et al. (2005) Activity of hepatic enzymes from week sixteen of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 193: 2010–2016.
- Conte D, Fraquelli M, Prati D, Colucci A, Minola E (2000) Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology* 31: 751–755.
- Agha S, Sherif LS, Allam MA, Fawzy M (1998) Transplacental transmission of hepatitis C virus in HIV-negative mothers. *Res Virol* 149: 229–234.
- Arshad M, El-Kamary SS, Jhaveri R (2011) Hepatitis C virus infection during pregnancy and the newborn period—are they opportunities for treatment? *J Viral Hepat* 18: 229–236.
- Pergam SA, Wang CG, Gardella CM, Sandison TG, Phipps WT, et al. (2008) Pregnancy complications associated with hepatitis C: data from a 2003–2005 Washington state birth cohort. *Am J Obstet Gynecol* 199: 38 e31–39.
- Locatelli A, Roncaglia N, Arreghini A, Bellini P, Vergani P, et al. (1999) Hepatitis C virus infection is associated with a higher incidence of cholestasis of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 106: 498–500.
- Paternoster DM, Fabris F, Palu G, Santarossa C, Braaccante R, et al. (2002) Intra-hepatic cholestasis of pregnancy in hepatitis C virus infection. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81: 99–103.
- Safir A, Levy A, Sikuler E, Sheiner E (2010) Maternal hepatitis B virus or hepatitis C virus carrier status as an independent risk factor for adverse perinatal outcome. *Liver Int* 30: 765–770.
- Florenti A, Paternoster D, Zappala F, Cusinato R, Bombi G, et al. (1996) Hepatitis C virus infection in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 103: 325–329.
- Jabeen T, Cannon B, Hogan J, Crowley M, Devereux C, et al. (2000) Pregnancy and pregnancy outcome in hepatitis C type 1b. *QJM* 93: 597–601.
- Valladares G, Chacaltana A, Sjogren MH (2010) The management of HCV-infected pregnant women. *Ann Hepatol* 9 Suppl: 92–97.
- Lai JC, Verna EC, Brown RS, Jr., O'Leary JG, Trotter JF, et al. (2011) Hepatitis C virus-infected women have a higher risk of advanced fibrosis and graft loss after liver transplantation than men. *Hepatology* 54: 418–424.
- Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang DP, Ide YH, et al. (2010) 17beta-estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol* 54: 684–690.
- Di Martino V, Lebray P, Myers RP, Pannier E, Paradis V, et al. (2004) Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology* 40: 1426–1433.
- Codes I, Aselah T, Cazals-Hatem D, Tabach F, Vidaud D, et al. (2007) Liver fibrosis in women with chronic hepatitis C: evidence for the negative role of the menopause and steatosis and the potential benefit of hormone replacement therapy. *Gut* 56: 390–395.
- Le Campion A, Larouche A, Fautoux-Daniel S, Soudeyns H (2012) Pathogenesis of hepatitis C during pregnancy and childhood. *Viruses* 4: 3531–3550.
- Saito S (2000) Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 47: 87–103.
- Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Ponnampalam S, Teoh TG, et al. (2012) Changes in the Th1/Th2 cytokine bias in pregnancy and the effects of the anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Mediators Inflamm* 2012: 416739.
- Shebl FM, El-Kamary SS, Saleh DA, Abdel-Hamid M, Mikhail N, et al. (2009) Prospective cohort study of mother-to-infant infection and clearance of hepatitis C in rural Egyptian villages. *J Med Virol* 81: 1024–1031.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ARE JAMG JS. Performed the experiments: JAMG EJPC AG AAM EOH MASR JG LSN RQ. Analyzed the data: ARE JAMG PMR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JC SMJR ABM AC JLV JL. Wrote the paper: ARE JAMG.

- Ruiz-Extremera A, Munoz-Gamez JA, Salmeron-Ruiz MA, de Rueda PM, Quiles-Perez R, et al. (2011) Genetic variation in interleukin 28B with respect to vertical transmission of hepatitis C virus and spontaneous clearance in HCV-infected children. *Hepatology* 53: 1830–1838.
- de Rueda PM, Lopez-Nevo MA, Saez-Lopez P, Casado J, Martin-Casares A, et al. (2011) Importance of host genetic factors HLA and IL28B as predictors of response to pegylated interferon and ribavirin. *Am J Gastroenterol* 106: 1246–1254.
- Gervais A, Bacq Y, Bemuau J, Martinot M, Auperin A, et al. (2000) Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 32: 293–299.
- Paternoster DM, Santarossa C, Grella P, Palu G, Baldo V, et al. (2001) Viral load in HCV RNA-positive pregnant women. *Am J Gastroenterol* 96: 2751–2754.
- Lin HH, Kao JH (2000) Hepatitis C virus load during pregnancy and puerperium. *BJOG* 107: 1503–1506.
- Hattori Y, Orito E, Ohno T, Sugauchi F, Suzuki S, et al. (2003) Loss of hepatitis C virus RNA after parturition in female patients with chronic HCV infection. *J Med Virol* 71: 205–211.
- Fallahi P, Ferri C, Ferrari SM, Corrado A, Sansonno D, et al. (2012) Cytokines and HCV-related disorders. *Clin Dev Immunol* 2012: 468107.
- Mercalli A, Calavia I, Dugnani E, Citro A, Cantarelli E, et al. (2013) Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1. *Immunology*.
- Wan I, Kung YJ, Lin YJ, Liao CG, Sheu JJ, et al. (2009) Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected (SVRc) patients treated with interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 855–860.
- Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, et al. (2008) Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7034–7039.
- Kontili S, Yan MY, Reitano KN, Zhang X, Lempicki R, et al. (2009) Human immunodeficiency virus and hepatitis C infections induce distinct immunologic imprints in peripheral mononuclear cells. *Hepatology* 50: 34–45.
- Lempicki RA, Polis MA, Yang J, McLaughlin M, Koratich C, et al. (2006) Gene expression profiles in hepatitis C virus (HCV) and HIV coinfection: class prediction analyses before treatment predict the outcome of anti-HCV therapy among HIV-coinfected patients. *J Infect Dis* 193: 1172–1177.
- Naggie S, Osinusi A, Katsounas A, Lempicki R, Herrmann E, et al. (2012) Dysregulation of innate immunity in hepatitis C virus genotype 1 IL28B-unfavorable genotype patients: Impaired viral kinetics and therapeutic response. *Hepatology* 56: 444–454.
- Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, Fellay J, Schuppan D, et al. (2010) IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 52: 1888–1896.
- Dill MT, Duong FH, Vogt JE, Bibert S, Bochud PY, et al. (2011) Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 140: 1021–1031.
- Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, et al. (2012) Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. *Hepatology* 55: 20–29.
- Paternoster DM, Belligoli A, Nigardoumb NK, Visentin S, Franco R, et al. (2008) Endogenous interferon-alpha level is increased in hepatitis C virus (HCV)-positive pregnant women. *J Clin Gastroenterol* 42: 204–207.
- Hurtado CW, Golden-Mason L, Brocato M, Krull M, Narkewicz MR, et al. (2010) Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C—seropositive mother-infant dyads. *PLoS One* 5: e12232.
- Hayashida A, Inaba N, Oshima K, Nishikawa M, Shoda A, et al. (2007) Re-evaluation of the true rate of hepatitis C virus mother-to-child transmission and its novel risk factors based on our two prospective studies. *J Obstet Gynaecol Res* 33: 417–422.
- Indolfi G, Azari C, Moriondo M, Lippi F, de Martino M, et al. (2006) Alanine transaminase levels in the year before pregnancy predict the risk of hepatitis C virus vertical transmission. *J Med Virol* 78: 911–914.

5. DISCUSIÓN

La infección por VHC es un problema de salud mundial con una elevada prevalencia y alta tasa de cronificación que determinan un impacto considerable en los sistemas sanitarios así como para el propio enfermo y su familia. La prevalencia de la infección por VHC en mujeres embarazadas en países desarrollados está en torno al 1% y es muy similar a la de la población general [65]. La TV es la forma predominante de contagio en la actualidad en niños a nivel mundial [66].

La historia natural de la infección crónica por VHC durante el embarazo ó los factores de riesgo para la TV son hasta el momento prácticamente desconocidos. Igualmente, la información bibliográfica relativa a la biología del VHC durante el puerperio es muy reducida y se limita a documentar que transcurrido cierto tiempo tras el parto (generalmente más de un año) los niveles de transaminasas se restituyen y se asemejan a los que la mujer presentaba previo a la gestación [67].

El objetivo principal en la realización de esta tesis fue profundizar en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad crónica por el VHC en mujeres durante la gestación y el puerperio para poder llevar a cabo en el futuro medidas de prevención que puedan evitar la transmisión vertical del virus.

Para ello en nuestro estudio se incluyó una cohorte de mujeres ARN-VHC (+) y ARN-VHC (-). La cohorte fue monitorizada a intervalos regulares desde el tercer trimestre de gestación hasta un año después del parto. En el grupo de madres VHC-ARN (+), ni durante el tercer trimestre de la gestación ni en el momento del parto, se encontraron modificaciones significativas en sus niveles plasmáticos de ALT. Además los valores de ALT encontrados fueron similares a los de madres ARN-VHC (-) (≤ 40 UI/L). Estos datos concuerdan con lo descrito en los trabajos publicados por Gervais et al y Paternóster et al [68-69], que describen un descenso en los niveles de ALT en suero durante el segundo y tercer trimestre de embarazo hasta niveles en rango de normalidad ($ALT \leq 40$ UI/L) junto con un incremento en la carga viral.

En el Capítulo 1 se describen los cambios en los niveles séricos de ALT y carga viral durante la gestación, parto y puerperio así como su implicación en la TV en gestantes infectadas crónicamente por VHC. Nuestros datos muestran como se produce una elevación significativa en los niveles de ALT entre los 3 y 6 meses tras el parto, incremento que se vio acompañado simultáneamente de un descenso en la carga viral. Dicha elevación fue debida al estímulo viral y no a otros factores propios del embarazo ya que en el grupo de madres

control [madres Ac-VHC (+) y VHC-ARN (-)] las cifras de ALT se mantuvieron estables durante todo el periodo de seguimiento.

En estudios realizados en la población general se ha descrito que los pacientes con infección crónica por VHC pueden sufrir fluctuaciones en la carga viral y en las transaminasas [67], pero estos cambios no suelen ser significativos. Esto difiere de los resultados que obtuvimos en este trabajo. De hecho, la elevación de ALT en la fase de puerperio que presentaron algunas de las mujeres, es tan elevada que recuerda a la que se produce en la infección aguda.

Además encontramos dos patrones de comportamiento claramente diferenciados entre las gestantes infectadas crónicamente por el VHC respecto a los niveles de ALT en el puerperio y esto nos llevó a clasificarlas en dos grandes grupos: mujeres Tipo A (66%), que presentaron un incremento en los niveles de ALT y mujeres tipo B (34%) en las que no hubo variación en cifras de ALT ni en su carga viral durante este periodo. Respecto a las mujeres tipo B es de destacar igualmente que presentaron preferentemente una carga viral baja en momento del parto (<600.000 UI/mL). Estos hallazgos podrían sugerir que la elevación de la carga viral sea importante para que se produzcan cambios significativos en las cifras de ALT durante el puerperio, sin embargo no explicaría que en el grupo de madres Tipo B con alta carga viral no se incrementen las cifras de ALT.

Precisamente en el capítulo 2 de este trabajo pretendemos analizar los fenómenos de inmunomodulación y restitución que fisiológicamente ocurren durante la gestación y el puerperio (mediante el análisis de los niveles de citoquinas Th1 y Th2) y la influencia de dichos fenómenos en la evolución de los niveles de ALT y la carga viral; que no se explican completamente como ya hemos descrito por los factores estudiados en el capítulo 1.

En el capítulo 2 también se analiza la relación entre los fenómenos de inmunomodulación de las mujeres gestantes con el riesgo de transmisión vertical y de cronificación de la infección en los niños y en algunas de las mujeres. Hasta la actualidad son muy pocos los trabajos que ofrecen datos a este respecto, limitándose casi exclusivamente al estudio de distintos polimorfismos del HLA clase II. Recientemente si se han identificado variaciones genéticas en posiciones cercanas al gen de la IL28B que están asociadas con la respuesta viral al tratamiento estándar así como con el aclaramiento viral espontáneo en pacientes infectados por el genotipo viral 1 [69, 70].

Son conocidos los importantes cambios hormonales que se producen durante el embarazo. En concreto los niveles de estradiol y progesterona son los que fundamentalmente se modifican durante este periodo. Llegados a este punto, surgió por tanto la necesidad de descartar que el comportamiento de las citoquinas en las mujeres VHC-ARN (+) hubiera estado influenciado por los cambios hormonales gestacionales.

Para poder aclarar este aspecto, se analizaron los niveles de citoquinas Th1 y Th2 también en el grupo de madres del grupo control y los datos obtenidos demostraron que la gestación y el puerperio no implican per se alteraciones en los niveles de dichas citoquinas. De hecho en las madres VHC-ARN (-) los valores de citoquinas en sangre periférica no sufrieron modificaciones en ninguno de los periodos de estudio debido a que la inmunidad de la madre no se había visto estimulada en respuesta al VHC. Esto implica por tanto que es el estímulo viral el causante de la respuesta inmunológica (elevación de citoquinas) que se obtuvo en las madres Ac-VHC (+) y VHC-ARN (+).

Como ya se ha descrito previamente, no todas las mujeres del grupo Ac-VHC (+) y VHC-ARN (+) se comportaron de igual manera respecto a los niveles de ALT en el periodo posparto distinguiéndose claramente los dos patrones descritos (mujeres tipo A y tipo B). Para intentar conocer las causas que determinaron que se produjera un patrón u otro de comportamiento (madres tipo A frente a madres tipo B), se analizaron la carga viral y los niveles de citoquinas Th1/Th2 en sangre periférica.

Las madres tipo A, presentaron un descenso significativo en la carga viral durante el periodo posparto y este evento además fue simultáneo al incremento en los niveles de citoquinas Th1.

Las madres tipo B no modificaron su carga viral en el puerperio y existía en este grupo una tendencia no significativa a tener una menor carga viral en el momento del parto. Además en ellas se encontraron unos niveles elevados de citoquinas Th1 en el parto.

Ni en las madres VHC-ARN (+) ni en ninguno de los dos subgrupos (Tipo A y Tipo B) hubo asociación significativa entre el genotipo viral y los niveles de ALT ni con los niveles de citoquinas.

La disminución en la carga viral durante el puerperio (encontrada en las madres tipo A), es un hecho que previamente había sido descrito por otros autores: Lin et al en un estudio de diez mujeres embarazadas y Hattori en un estudio con 22 mujeres [71,72].

Ambos autores encontraron que la carga viral tiende a disminuir en el posparto. Sin embargo en ninguno de estos estudios se obtiene una interpretación inmunológica definitiva de los resultados.

Durante el embarazo se producen importantes cambios sistémicos no específicos que regulan la respuesta inmune materna para proteger al feto, pero existen pocos datos con respecto a esta regulación inmunológica en relación con el VHC y gestación. En concreto, se produce un viraje de respuesta Th1 a Th2 frente a la infección viral que posteriormente regresa a las condiciones iniciales Th1 en el puerperio. Éste fenómeno podría explicar en parte los cambios observados en los niveles de ALT y carga viral en el grupo de madres Tipo A de nuestro estudio en el puerperio.

Se ha descrito extensamente en la población general (no así en mujeres embarazadas con VHC crónica), que la respuesta Th1 se relaciona con aclaramiento viral y respuesta al tratamiento, mientras que la respuesta Th2 se asocia con cronificación de la enfermedad [73]. En la respuesta Th1 frente al virus C, la IL12 actúa sobre células dendríticas produciendo una respuesta celular mediada y facilitando la secreción de $INF\gamma$ por células NK y linfocitos T. Este hecho favorece que los neutrófilos y los macrófagos sean reclutados y se desencadene la respuesta inflamatoria.

Además la estimulación Th1 posparto observada en mujeres tipo A puede explicar el descenso de la carga viral y el incremento de los niveles de ALT resultado del daño hepático.

En nuestra opinión este periodo puede ser adecuado para iniciar terapia antiviral en las mujeres tipo A en las que hubiera fracasado el tratamiento previamente, pues la estimulación Th1 podría mejorar sus mecanismos naturales de defensa frente a la infección.

IL10 es una citoquina antiinflamatoria Th2 muy potente, que puede sintetizarse por monocitos, macrófagos y linfocitos T. Su función es la inhibición de la síntesis de citoquinas proinflamatorias como $INF\gamma$ e IL2. Además se ha descrito que niveles elevados de IL4 promueven la conversión de macrófagos en macrófagos M2 (anti-inflamatorios-reparadores) e inhibición de la activación de los macrófagos M1 (pro-inflamatorios). Niveles elevados de macrófagos M2 se asocian con la secreción de IL10 y $TGF\beta$, reduciendo la inflamación patológica [74]. Consecuentemente, consideramos que el ligero incremento de IL10 ($p=0,03$) y de IL4 (no significativo, $P>0,05$), podría ser un intento de reducir la intensa respuesta inflamatoria desencadenada por las citoquinas Th1 (fenómeno de

contrarregulación). Aunque en la actualidad exclusivamente INF α se utiliza en el tratamiento de la HCC, dado el escaso conocimiento sobre la posible eficacia de la administración de otras citoquinas como IL12, IL2 ó IL10, nuestros datos sugieren que el tratamiento de la enfermedad crónica con citoquinas Th1 podría ser beneficioso [73].

En este estudio, las madres Tipo B se estudiaron con mucho detalle. Estas mujeres no presentaron variación en ninguno de los parámetros analizados, parecía tratarse de un fenómeno de “inmunotolerancia” frente al VHC (mujeres sin cambios significativos en su carga viral junto con niveles de ALT persistentemente normales). Sin embargo, cuando se analizaron los niveles de citoquinas Th1/Th2, sorprendentemente esta idea fue desechada: las mujeres tipo B presentaban niveles elevados de INF γ e IL2 (citoquinas Th1) tanto antes como después del parto, es decir, se encontraban en una situación de estimulación inmunológica no suprimida.

En este sentido varios estudios realizados en pacientes infectados crónicamente por VHC han demostrado que en pacientes sin respuesta viral sostenida existen niveles elevados de citoquinas Th1 mantenidos tras el tratamiento farmacológico (IL2, INF γ y TNF α). Nosotros interpretamos estos resultados considerando que tanto en las mujeres tipo B de nuestro estudio como en los pacientes sin respuesta viral sostenida, la activación de citoquinas Th1 endógenas es incapaz de reducir la carga viral implicando la falta de respuesta antiviral. Sin embargo, el mecanismo biológico responsable de esta elevada síntesis de citoquinas se desconoce. Estudios recientes sugieren que pueda estar asociada con el polimorfismo IL28B [74,75], aunque también es cierto que otros estudios no encuentran dicha asociación [76,77].

Otro aspecto poco claro en la literatura científica, es el momento en el que se produce la TV. Se sabe que tras la exposición al virus, se puede determinar si ha habido contagio o no transcurridos solamente unos pocos días del contacto debido a la alta sensibilidad de las técnicas de detección modernas. Sin embargo nuestros datos indican que la transmisión materno-fetal no ocurre durante la gestación, ya que en el momento del parto así como en los primeros meses posteriores las determinaciones de VHC-ARN en los niños fueron negativas y solo se obtuvieron valores de CV positiva transcurridos más de tres meses del nacimiento. La mayoría de los niños infectados estaban asintomáticos a pesar del aumento de ALT. Por otro lado, los niños que aclararon el virus recuperaron los niveles normales de ALT.

En este estudio hemos observado una tendencia en la que el 80% de los niños infectados verticalmente proceden de madres Tipo A, y si tenemos en cuenta ambos criterios (carga viral y tipo de madre en función de los niveles de ALT), se ha identificado por primera vez un grupo de madres (madres Tipo B con carga viral baja) con menor riesgo de transmisión vertical (5%) en relación al resto de madres. Estos datos concuerdan con los de otros estudios publicados que identifican como factor de riesgo fundamental para la TV la carga viral elevada en la sangre periférica materna en el momento del parto (junto con la coinfección VIH) [78]. Además, en nuestra cohorte se ha observado que la infección por VHC no produce efectos deletéreos en el feto ni anomalías durante el proceso de gestación, no observándose un incremento en el riesgo de complicaciones obstétricas.

Dos estudios han demostrado que los niveles de ALT elevados en suero durante el embarazo y en el parto se asocian con tasas más elevadas de TV [79]. Debido al bajo número de niños crónicamente infectados en nuestra cohorte, no se encontraron datos estadísticamente significativos a este respecto, sin embargo si resulta interesante que el genotipo IL28B observado en 2 de los niños con infección crónica fuera no-CC, dato que concuerda con otros datos publicados por nuestro grupo previamente [64].

Además, hemos encontrado cerca de un 5% de aclaramiento viral espontáneo durante el puerperio que junto con la reducción general observada en los niveles de la carga viral nos hace pensar que el puerperio puede ser un buen punto de inicio de tratamiento del VHC con los fármacos clásicos o con los de nueva generación y con prometedoras tasas de respuesta debido a estas particulares condiciones tras la gestación.

No encontramos relación entre la transmisión vertical y los niveles de citoquinas Th1/Th2 en sangre periférica de las madres. Estos datos concuerdan con los de Paternoster et al, que describen que los niveles endógenos de $INF\alpha$ durante el embarazo no se relacionan con la TV del virus C. Sin embargo, publicaciones recientes describen el papel de la placenta como órgano inmunológicamente activo de manera fisiológica y su posible papel protegiendo al feto frente a la transmisión del VHC. Estos autores describen varios mecanismos de acción ante la exposición placentaria al VHC, como el incremento en la síntesis de citoquinas por células NK ($IFN\beta$, SLPI, etc) y de citotoxicidad mediadas por células NK y linfocitos T [80]. Estos datos pueden ser complementarios a los observados a nivel sistémico en nuestro trabajo (modulación en la respuesta Th1). Pero son necesarios más

estudios para entender la complejidad del sistema inmune durante el embarazo y su relación con la TV del VHC.

Todos los análisis retrospectivos suponen limitaciones inherentes, pero estos efectos se han intentado minimizar. El método estandarizado para la determinación del VHC fue modificado durante el periodo de inclusión de los pacientes, pero este factor se controló utilizando la misma técnica de PCR (HCV Ampliprep Taíman, Roche Molecular System) en todos los pacientes estudiados utilizando las muestras de sangre que se habían almacenado previamente.

En conclusión, las variaciones en los valores de ALT (en el posparto) y la carga viral (en el parto y periodo posparto) observadas en las mujeres VHC-ARN (+) puede deberse a los distintos niveles de producción de citoquinas Th1. Así, las madres tipo A presentaron un descenso significativo en la carga viral durante el periodo posparto concomitantemente al incremento en los niveles de citoquinas Th1. Por otro lado, en las madres tipo B, los altos niveles de citoquinas Th1 en el parto junto con los niveles de ALT sin modificaciones y la carga viral posparto podrían estar relacionados con la existencia de una respuesta Th1 mantenida en el tiempo. Finalmente, los valores de citoquinas en las madres VHC-ARN (-) no se modificaron porque su inmunidad no fue estimulada frente al VHC.

Estos hallazgos nos ayudan a entender la historia natural de la hepatitis crónica C durante el embarazo y el puerperio, podrían contribuir a identificar a las madres con menor riesgo de TV, y por tanto ser de gran utilidad para el desarrollo de estrategias de prevención en el futuro.

6. CONCLUSIONES

El análisis y discusión crítica del conjunto de observaciones y resultados experimentales contenidos en este estudio nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

CAPÍTULO 1

1. La mayoría de las mujeres VHC-ARN (+) en el puerperio sufren un aumento de ALT con descenso de la carga viral simultáneamente.
2. Existe una relación directa entre la alta carga viral en el parto y la transmisión vertical de la enfermedad y es el único factor de riesgo asociado a transmisión vertical del VHC encontrado en el estudio. (Destacar que de las 4 mujeres que presentaron aclaramiento viral, 3 de ellas tuvieron CV baja)
3. El menor riesgo de transmisión vertical lo tuvieron las madres con carga viral baja que además no elevaron sus transaminasas en el puerperio.

CAPÍTULO 2

1. La elevación de ALT y descenso de la CV durante el puerperio en mujeres VHC-ARN(+) posiblemente se asocie a la restitución de la inmunidad Th1 durante dicho periodo:
 - a. Por un lado, en mujeres en las que se elevan las citoquinas Th1 a los 3-6 meses del parto presentan una elevación simultánea de la ALT y descenso de la CV.
 - b. Por otro lado las mujeres Tipo B que mantenían elevados los niveles de Th1 (respuesta celular no inhibida) durante el parto y el puerperio, se comportaron como mujeres VHC-ARN (-): sin alteraciones en niveles de ALT ni CV en el puerperio.
2. Las mujeres VHC-ARN (-) no cambiaron sus niveles de citoquinas ya que no existía estimulación inmunológica contra el VHC.
3. No se encontró asociación entre los niveles de citoquinas en el parto con la transmisión vertical del VHC ni el riesgo de cronificación de la enfermedad en la madre o en el niño.

4. La tasa de aclaramiento viral en los niños es claramente superior a la descrita en los adultos.

CONCLUSIÓN FINAL

Los fenómenos de inmunomodulación que se producen en el embarazo modifican la cinética viral y el comportamiento de las transaminasas en las mujeres infectadas crónicamente por VHC.

A su vez, la transmisión vertical del virus está relacionada con la cinética viral de la madre (carga viral en el parto fundamentalmente) pero no se pudo demostrar una relación directa entre dichos fenómenos de inmunomodulación con el riesgo de cronificación ni de aclaramiento viral espontáneo.

PERSPECTIVAS

Aún permanecen desconocidos numerosos aspectos de la transmisión vertical del VHC, por lo que pretendemos continuar investigando otros factores que pudieran verse implicados como los antígenos de histocompatibilidad HLA clase I y II. También sería muy interesante conocer el papel que pueden desempeñar las células mononucleares como reservorio del VHC, estudiar la dinámica de poblaciones del VHC en la gestación y en el puerperio, su papel en la transmisión vertical y en el curso de la infección tanto en las madres como en sus hijos recién nacidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lauer GM, Walter BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001;345(1):41-52.
2. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-54.
3. García-Retortillo M, Forn X. Variabilidad genómica e historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25 (8): 514-520.
4. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *J Clin Invest* 1995; 96:224-230.
5. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334:77-81.
6. Sáiz JC, López-Labrador FX, Ampurdanès S, Dopazo J, Forn X, Sánchez-Tapias JM, et al. The prognostic relevance of the 106 nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1998; 177: 839-47.
7. Muñoz de Rueda P., Casado J., Patón R., Quintero D., Palacios A., Gila A, Quiles R., León J., Ruiz-Extremera A., and Salmerón J. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of Hepatitis C Virus Genotype 1 and Their Relationships to Pegylated Interferon-Ribavirin Treatment Responses. *J Virol*. 2008;82(13): 6644–6653.
8. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000; 132: 296-305.
9. WHO. Guidelines for the screening care and treatment of persons with hepatitis C infection. 10. Ruiz Extremera A, López-Garrido MA, Barranco E, Quintero MD, Ocete-Hita E, Muñoz de Rueda P, Gila A, Salmerón J. Activity of hepatic enzymes from week sixteen of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Dec; 193(6): 2010-6.
10. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 107–115.
11. Ruiz Extremera A, López Garrido MA, Barranco E, Quintero MD, Ocete Hita E, Muñoz de Rueda P, Gila A, Salemerón J. Activity of hepatic enzymes from week sixteen of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2005. Dec; 193 (6): 2010-6.
12. Muñoz-Almagro C, Juncosa T, Fortuny C, Guillén JJ, González-Cuevas A, Latorre C. Prevalence of hepatitis C virus in pregnant women and vertical transmission. *Med Clin (Barc)* 2002; 118(12): 452-4.
13. Kamal SM. Acute Hepatitis C: A Systematic Review. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1283–1297.
14. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2007; 42 :411-423.
15. Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology*. 2001; 33:321-7.

16. Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat.* 2006; 13: 34-41.
17. Resti M, Jara P, Hierro L, Azzari C, Giacchino R, Zuin G, Zancan L, Pedditzi S, Bortolotti F. Clinical features and progression of perinatally acquired hepatitis C virus infection. *J Med Virol.* 2003; 70; 373-7.
18. Bortolotti F, Resti M, Marcellini M, Giacchino R, Verrucchi G, et al, The Italian Observatory for Hepatitis C in children. Hepatitis C virus genotypes in 373 Italian children with HCV infection: changing distribution and correlation with clinical features and outcome. *Gut.* 2005; 54; 852-857.
19. Guido M, Rugge M, Jara P, Hierro L, Giacchino R, et al. Chronic hepatitis C in children: the pathological and clinical spectrum. *Gastroenterology.* 1998; 115 (6):1525-9.
20. The European Pediatric Hepatitis C Virus Network European Paediatric Hepatitis C Virus Network. A significant sex – but not elective cesarean section – effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2005; 192(11): 1872–1879.
21. Arshad M, El-Kamary SS, Jhaveri R. Hepatitis C virus infection during pregnancy and the newborn period – are they opportunities for treatment? *Journal of Viral Hepatitis*, 2011; 18; 229–236.
22. Hu J, Doucette K, Hartling L, Tjosvold L, Robinson J. Treatment of hepatitis C in children: a systematic review. *PLoS One.* 2010; 5(7):e11542
23. Bruguera M, Bañares R, Córdoba J, Jardí R, González Lahoz J, et al. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol.* 2006; 29 Supl: 216-30.
24. Gao B, Hong F, Radaeva S. Host factors and failure of interferon- α treatment in hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 880-890.
25. Awad T, Thorlund K, Hauser G, Stimac D, Mabrouk M, Gluud C. Cochrane Hepato-Biliary Group. Peginterferon alpha-2a may achieve higher sustained virological response than peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis C: a Cochrane systematic review of randomized clinical trials. *Hepatology* 2009; 50(suppl): 707-708A.
26. Ascione A, De Luca M, Tartaglione MT, Tartaglione MT, Lampasi F et al. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin is more effective than peginterferon alpha-2b plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010, 138: 116-122.
27. Hoofnagle JH, Seef LB. Peg-interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2444-2451.
28. Salmerón J, Gila A, Muñoz P. Nuevos tratamientos de hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol.* 2011; 34(Espec Congr 1):58-65.
29. Herrmann E, Lee JH, Marinos G, Mondy M, Zeuzem S. Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* 2003; 37: 1351-8.

30. Fried MW, Hadziyannis SJ, Shiffman M, Messinger D, Zeuzem S. Rapid viral response is more important predictor of sustained virologic response (SVR) than genotype in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2008; 48 (Suppl. 2): 5A.
31. Davis GL, Wong JB, McHutchinson JG, Manns MP, Harvey J, Albretch J. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 645-652.
32. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, et al. Peginterferon alfa 2b plus ribavirin compared with interferon alfa2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001; 358:958-65.
33. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, et al. Peginterferon alfa 2a plus ribavirin for Chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347:975-82.
34. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomised study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004; 140: 346-355.
35. Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KI, Morishima C, Wright EC, Everson GT, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology*. 2004; 126(4):1015-23.
36. Hierro L, Jara P. Hepatitis crónica C. *Tratado de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica aplicada de la SGHNP*. Ergón. 2011; 534-541.
37. Mangia A, Santoro R, Minerva N, Ricci GL, Carretta V, Persico M et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2005; 352:2609-17.
38. Salmerón J, De Rueda PM, Ruiz-Extremera A, Casado J, HuertasC, Bernal Mdel C, Rodriguez L, Palacios A. Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2006;51:960–967.
39. Salmerón J, Casado J, Muñoz De Rueda P, Lafuente V, Diago M, Romero- Gómez M, Palacios A, León J, Gila A, Quiles R, Rodriguez L, Ruiz-Extremera A. Quasispecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C genotype 1, treated with peginterferon-ribavirin. *J Clin Virol*. 2008 Apr; 41(4):264-9.
40. Pascu M, Martus P, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E, Berg T. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut*. 2004 Sep; 53(9):1345-51.
41. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.

42. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML et al, for the Hepatitis C Study. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100-4.
43. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105-9.
44. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T et al. Genetic Variation in IL28B Is Associated with Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-wide Association Study. *Gastroenterology* 2010; 41: 1338-45.
45. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'huigin C et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis Nature. 2009; 461(7265):798-801.
46. Di Martino V, Lebray P, Myers RP, Pannier E, Paradis V, Charlotte F, et al. Progression of Liver Fibrosis in Women Infected With Hepatitis C: Long-Term Benefit of Estrogen Exposure. *Hepatology* 2004; 40:1426 –1433.
47. Lutz P, Wasmuth JC, Nischalke HD, Vidovic N, Grünhage F, Lammert F, et al. Progression of liver fibrosis in HIV/HCV genotype 1 co-infected patients is related to the T allele of the rs12979860 polymorphism of the IL28B gene *Eur J Med Res.* 2011 Aug 8;16(8):335-41.
48. Lindh M, Lagging M, Färkkilä M, Langeland N, Mørch K, Nilsson S, et al. Interleukin 28B gene variation at rs12979860 determines early viral kinetics during treatment in patients carrying genotypes 2 or 3 of hepatitis C virus. *J Infect Dis.* 2011 Jun 15; 203(12):1748-52.
49. Knapp S, Warshow U, Ho KM, Hegazy D, Little AM, Fowell A, Alexander G, Thursz M, Cramp M, Khakoo SIA polymorphism in IL28B distinguishes exposed, uninfected individuals from spontaneous resolvers of HCV infection. *Gastroenterology.* 2011 Jul;141(1):320-5.
50. de Rueda PM, López-Nevot MÁ, Sáenz-López P, Casado J, Martín-Casares A, Palomares P, et al. Importance of Host Genetic Factors HLA and IL28B as Predictors of Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Am J Gastroenterol.* 2011 Jul;106(7):1246-54.
51. Lai JC, Verna EC, Brown RS, Jr, O'Leary JG, Trotter JF, et al. (2011). Hepatitis C virus-infected women have a higher risk of advanced fibrosis and graft loss after liver transplantation than men. *Hepatology* 54:418-424.
52. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang DP, Ide YH, et al (2010) 17 β -estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbial Immunol* 54:390-395.
53. Codes L, Asselah T, Cazals-hatem D, Tubach F, Vidaud D, et al (2007). Liver fibrosis in women with chronic hepatitis C: evidence for the negative role of the menopause and steatosis and the potential benefit of hormone replacement therapy. *Gut* 56: 390-305.
54. Barañao RI. *Immunología del embarazo.* (2011). *Invest clin* 52(2): 175-194.

55. Arementa OA, Espinosa N, Arroyo JC, Soto E (2011). Modulación de la respuesta inmunológica durante el embarazo. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 37(2): 277-287.
56. Ceci O, Margiotta M, Marello F, Francavilla R, Loizzi P, Francavilla A, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus in a cohort of 2,447 HIV-seronegative pregnant women: a 24-month prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33(5): 570-5.
57. Ruiz-Extremera A, Salmerón J, Torres C, De Rueda PM, Giménez F, Robles C, Miranda MT. Follow-up of transmission of hepatitis C to babies of human immunodeficiency virus-negative women: the role of breast-feeding in transmission. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(6): 511-6.
58. Pembrey L, Newell ML, Tovo PA; EPHN Collaborators. The management of HCV infected pregnant women and their children European paediatric HCV network. *J Hepatol* 2005; 43: 515-25.
59. Azzari C, Indolfi G, Betti L, Moriondo M, Massai C, Becciolini L et al. Vertical hepatitis C virus transmission is not related to mother-child class-I HLA concordance. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol* 2007; 20, 827-831.
60. Bosi I, Ancora G, Mantovani W, Miniero R, Verucchi G, Attard L et al. HLA DR13 and HCV vertical infection. *Ped. Res* 2002; 51: 746-749.
61. Martinetti M, Pacati I, Cuccia M, Badulli C, Pasi A, Salvaneschi L, et al. Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol* 2006; 19: 369-378.
62. Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, Pembrey L, Newell ML, Tovo PA, Amoroso A, and EPHN collaborators. Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. *Virology* 2009; 390: 64-70.
63. Billington WD. Transfer of antigens and antibodies between mother and fetus. In: Coulam, C, Faulk, W, McIntyre, J (Eds.), *Immunological obstetrics* 1992. Norton, New York, p. 290.
64. Ruiz Extremera A, Muñoz Gámez JA, Salmerón Ruiz MA, Muñoz Rueda P, Quiles Pérez R, Gila Medina, et al. Genetic Variation in Interleukin 28B with Respect to Vertical Transmission of Hepatitis C Virus and Spontaneous Clearance in HCV-Infected Children. (2011) *HEPATOLOGY*, Vol. 53, No. 6. (1830-1838).
65. Indolfi G, Resti M. Perinatal transmission of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Medical Virology*. (2009); 831: 836-843.
66. Jhaveri R, Grant W, Kauf TL, McHutchison J. The burden of Hepatitis C Virus infection in children: estimated direct medical costs over a 10-year period. *J Pediatr*. 2006; 148:353-358.
66. Moran-Sánchez S, Pons-Miñano JA, Baños-Madrid R, Ramirez P, Parrilla-Paricio A. Fallo hepático agudo por el virus de la hepatitis C en el puerperio. *Gastroenterol Hepatol*.2005; 28(8): 447-9.
67. Gervais A, Bacq Y, Bernuau J, Martinot M, Auperin A, Boyer N, Kilani A, Erlinger S, Valla D, Marcellin P. Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*.2000; 32: 293-299.

68. Paternoster DM, Belligoli A, Ngaradoumde NK, Visentin S, Franco R, Fagioli S et al. (2008) Endogenous Interferon –alfa level is increased in hepatitis C virus (HCV)-positive pregnant women. *J Clin Gastroenterol*. Volume 42, Number 2.
69. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010;52:421-429.
70. Ahlenstiel G, Booth DR, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J Gastroenterol* 2010;45:903-910.
71. Lin HH, Kao JH (2000). Hepatitis C virus load during pregnancy and puerperium. *BJOG* 107: 205-211.
72. Hatori Y, Orito E, Ohno T, Sugauchi F, Suzuki S, et al (2003). Loss of hepatitis C virus RNA alter parturition in female patients with chronic HCV infection. *J Med virol* 71: 205-211.
73. Fallahi P, Ferri C, Ferrari SM, Corrado A, Sansonno D, et al (2012). Cytokines and HCV-related disorders. *Clin Dev Immunol* 2012: 468107.
74. Naggie S, Osinusi A, Katsounas A, Lempicki R, Herrmann E, et al (2012). Dysregulation of innate immunity in hepatitis C virus genotype 1 IL28B-unfavorable genotype patients: impaired viral kinetics and therapeutic response. *Hepatology* 56: 444-454.
75. Urban TJ, Thompson AJ, Bradick SS, Fellay J, Schuppan D, et al (2010). IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 52: 1888-1896.
76. Dill MT, Duong FH, Vogt JE, Bibert S, Bochud PY, et al (2011). Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 140: 1021-1013.
77. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, et al (2012) Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. *Hepatology* 55: 20-29.
78. Hayashida A, Inaba N, Oshima K, Nishikawa M, Shoda A, et al (2007). Reevaluation of the true rate of hepatitis C virus mother-to child transmission and its novel risk factors based on our two prospective studies. *J Obstet Gynaecol Res* 33: 417-422.
79. Indolfi G, Azzari C, Moriondo M, Lippi F, de Martino M et al (2006) Alanine transaminase levels in the year before pregnancy predict the risk of hepatitis C virus vertical transmission. *J Med Virol* 78: 911-914.
81. Hurtado CW, Golden-Mason L, Brocato M, KrullIM, Narkewicz MR, et al (2010). Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C-seropositive mother-infant dyads. *PLoS One* 5: e12232.



