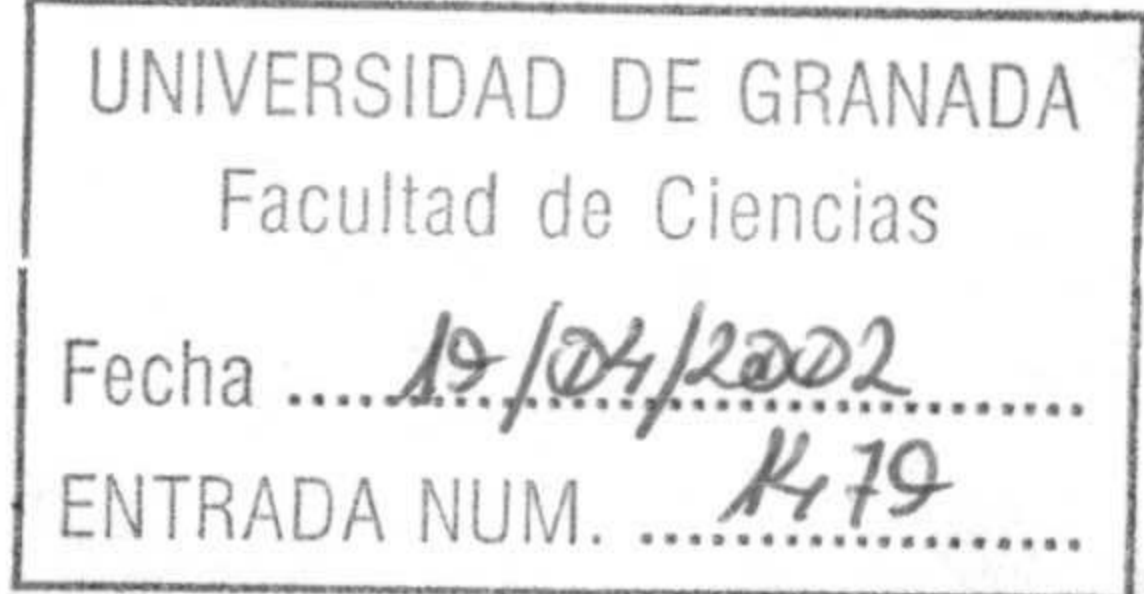
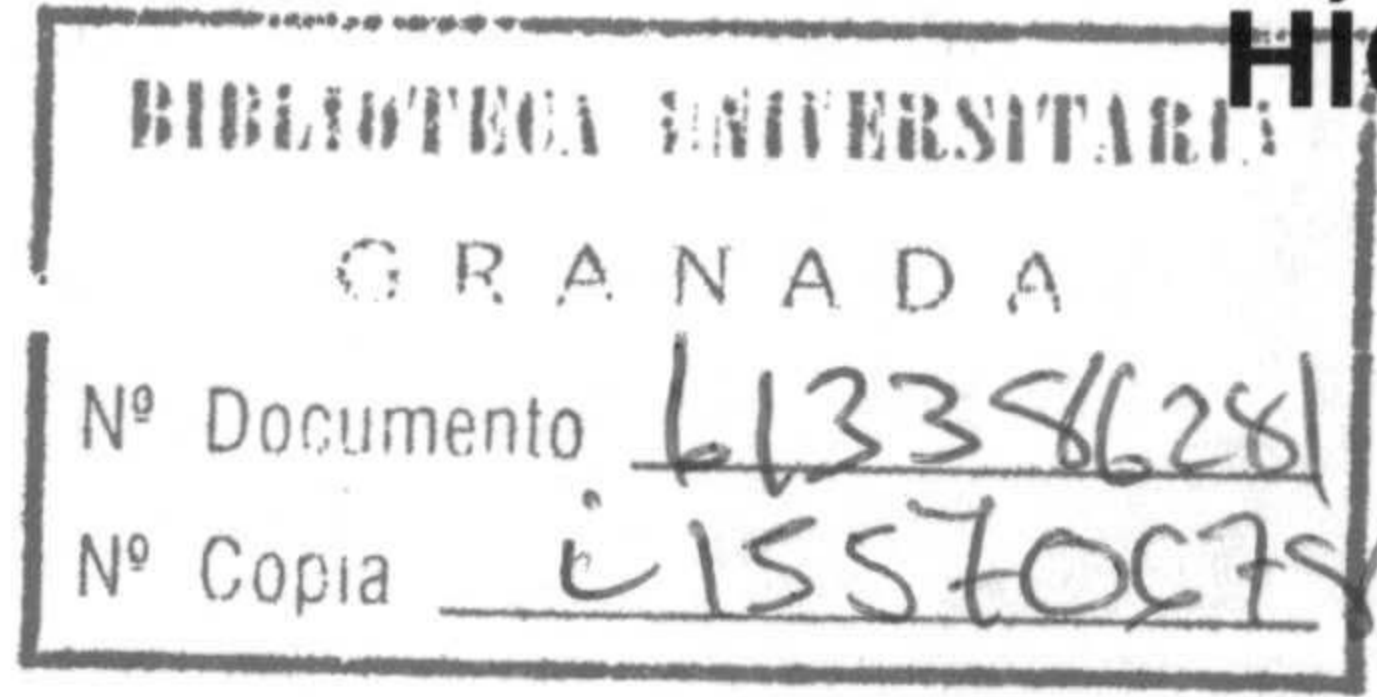


T-5146

TESIS DOCTORAL



“ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS G Y DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN SUERO, CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA E HÍGADO”



CRISTINA TORRES FERNÁNDEZ-PIÑAR

Granada, 2002

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

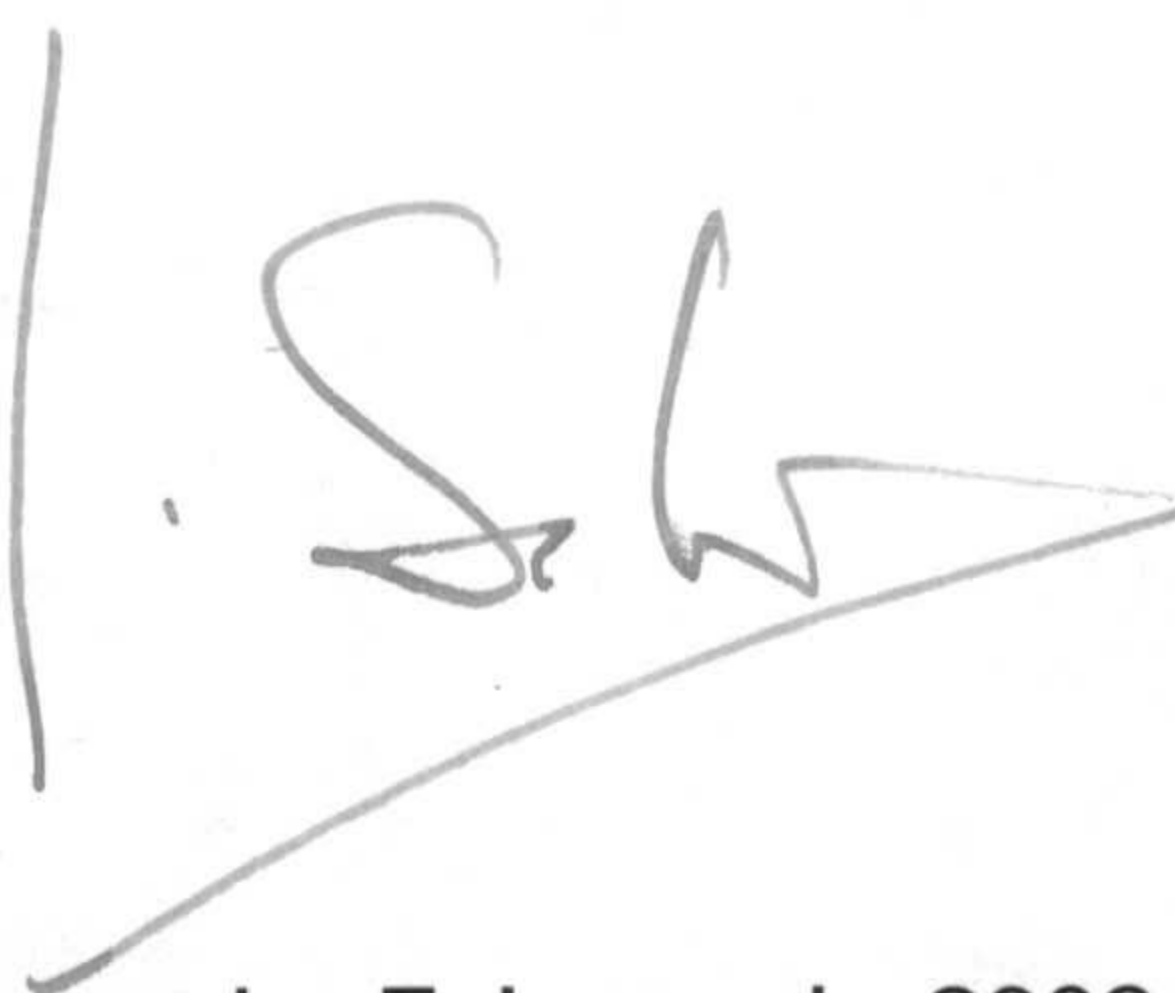
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Don FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR, Doctor en Medicina y Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Granada, Director de la Tesis **“Estudio de la replicación del virus de la hepatitis G y del virus de la hepatitis C en suero, células mononucleares de sangre periférica e hígado”**, de la que es autora Doña CRISTINA TORRES FERNÁNDEZ-PÍÑAR.

Programa de Doctorado: Bioquímica y Biología Molecular, con autorización por la Comisión de Doctorado para realizar la Tesis Doctoral en el Departamento de Medicina (sesión del 30/03/98, con registro de salida nº 7018)

AUTORIZA la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 185/1985, de 23 de enero, emitiendo el siguiente informe:

La Tesis Doctoral referida ha sido realizada bajo mi dirección y supervisión, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones que le hacen acreedora del título de Doctora en Ciencias Biológicas por esta Universidad, siempre que así lo considere el Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.




Granada, Febrero de 2002

Doña ÁNGELES RUIZ EXTREMERA, Doctora en Medicina y Profesora Titular del Departamento de Pediatría de la Universidad de Granada, Directora de la Tesis **“Estudio de la replicación del virus de la hepatitis G y del virus de la hepatitis C en suero, células mononucleares de sangre periférica e hígado”**, de la que es autora Doña CRISTINA TORRES FERNÁNDEZ-PÍÑAR.

Programa de Doctorado: Bioquímica y Biología Molecular, con autorización por la Comisión de Doctorado para realizar la Tesis Doctoral en el Departamento de Medicina (sesión del 30/03/98, con registro de salida nº 7018)

AUTORIZA la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 185/1985, de 23 de enero, emitiendo el siguiente informe:

La Tesis Doctoral referida ha sido realizada bajo mi dirección y supervisión, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones que le hacen acreedora del título de Doctora en Ciencias Biológicas por esta Universidad, siempre que así lo considere el Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Granada, Febrero de 2002

Doña PALOMA MUÑOZ DE RUEDA, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora de Apoyo del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, Directora de la Tesis **“Estudio de la replicación del virus de la hepatitis G y del virus de la hepatitis C en suero, células mononucleares de sangre periférica e hígado”**, de la que es autora Doña CRISTINA TORRES FERNÁNDEZ-PÍÑAR

Programa de Doctorado: Bioquímica y Biología Molecular, con autorización por la Comisión de Doctorado para realizar la Tesis Doctoral en el Departamento de Medicina (sesión del 30/03/98, con registro de salida nº 7018)

AUTORIZA la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 185/1985, de 23 de enero, emitiendo el siguiente informe:

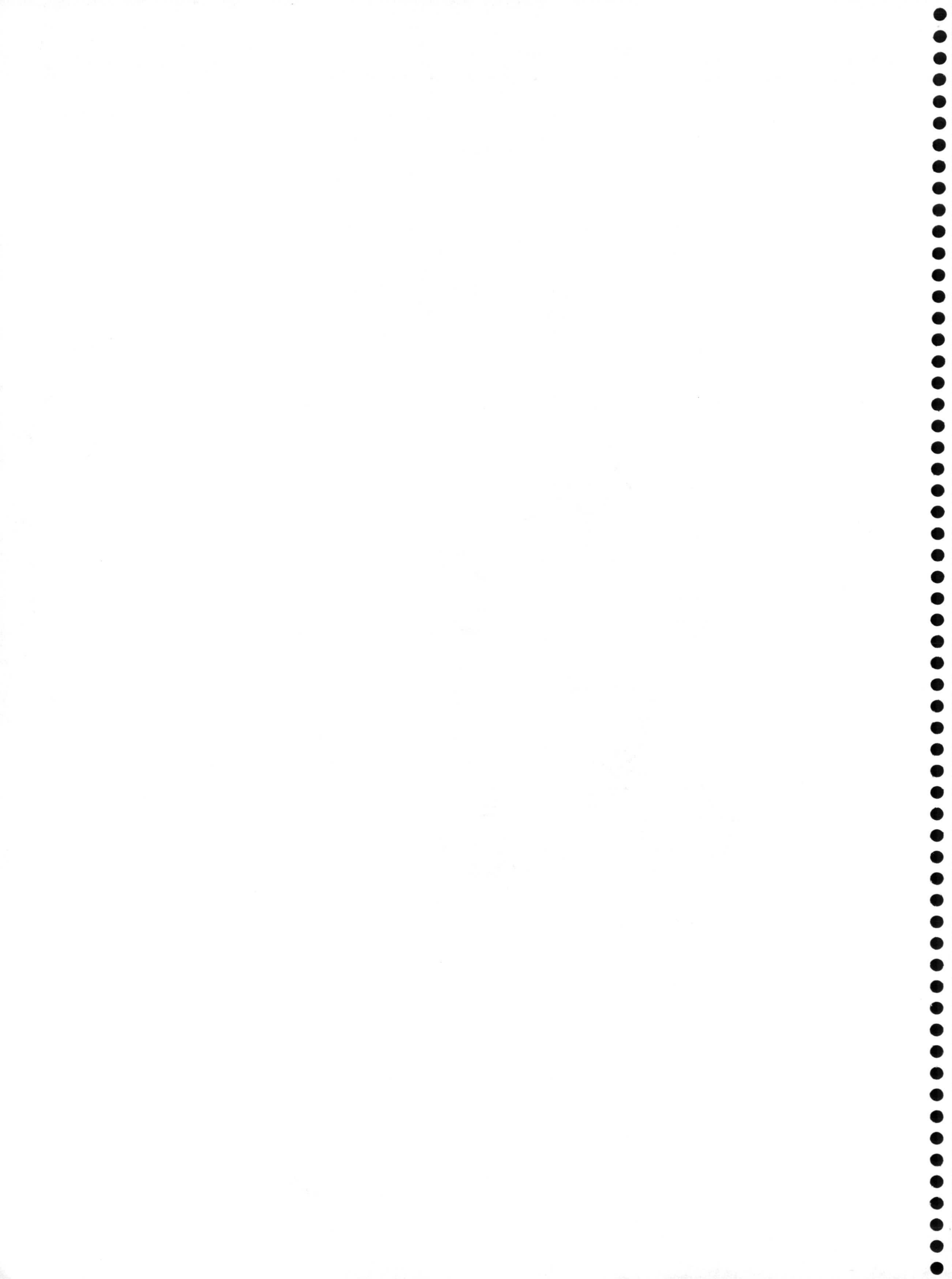
La Tesis Doctoral referida ha sido realizada bajo mi dirección y supervisión, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones que le hacen acreedora del título de Doctora en Ciencias Biológicas por esta Universidad, siempre que así lo considere el Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.



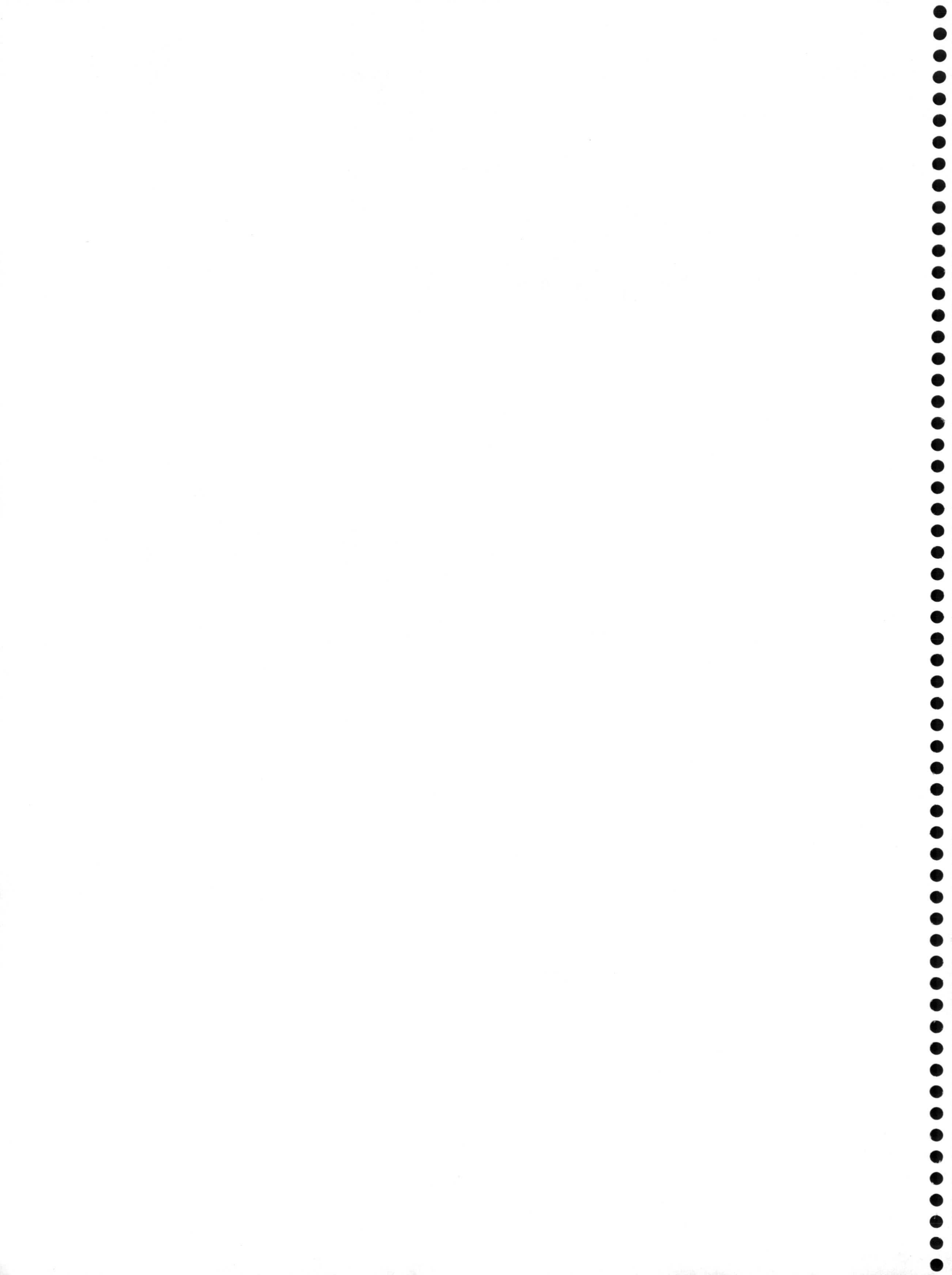
Granada, Febrero de 2002

A Pepe y Carlos

A mi familia



AGRADECIMIENTOS



Es necesario dejar patente mi reconocimiento y gratitud hacia las personas e instituciones que han hecho posible que este trabajo saliera adelante por su colaboración, estímulo y apoyo constante.

A mis directores de Tesis Javier Salmerón, Ángela Ruiz y Paloma Muñoz por su sabia dirección y entrega.

A Javier Salmerón por su amistad, su experiencia y su incansable estímulo.

A Ángela Ruiz por su gran apoyo moral, su cariño y su ayuda con la estadística.

A Paloma Muñoz de Rueda por su colaboración diaria en el laboratorio, su paciencia en determinados momentos y sobretodo por la gran amistad que nos une.

A la Fundación Hospital Clínico por su colaboración y el gran esfuerzo que lleva a cabo para que la investigación en este hospital sea de primera línea.

Al personal del Servicio de Medicina Nuclear por su generosidad y su apoyo. Especialmente a Lourdes, por compartir el espacio y haberse convertido en una buena amiga.

A los compañeros del Servicio de Digestivo, con especial afecto a Dolores Quintero, Ángel Palacios y Luis Rodríguez, por su amistad y ayuda desinteresada.

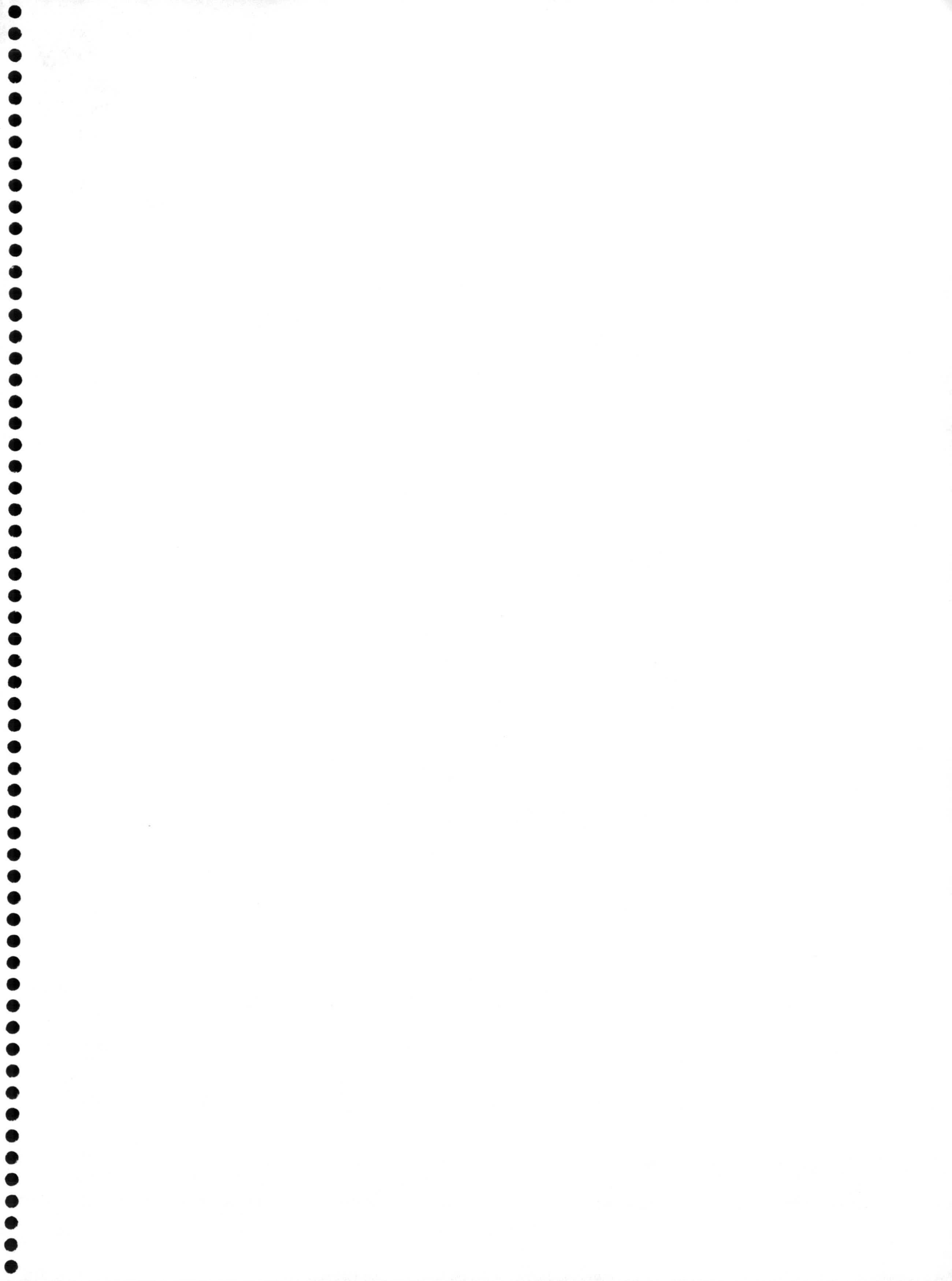
A mi familia y amigos, que desde el primer momento estuvieron a mi lado dándome su cariño y confianza. Especialmente a mi padre, por sus consejos cargados de experiencia y a mi madre, por su esfuerzo diario en favor de sus hijos.

A Pepe, por estar conmigo día a día y ayudarme más de lo que puede.

A Carlos, lo mejor que me ha pasado en la vida.

Finalmente no puedo dejar pasar la ocasión de tener un cariñoso recuerdo para Inma, a la que siempre echaré de menos.

ABREVIATURAS



ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADVP: adicción a drogas por vía parenteral

ALT: alanina aminotransferasa

AMA: anticuerpos antimitocondriales

AML: anticuerpos antimúsculo liso

ANA: anticuerpos antinucleares

Anti-E2: anticuerpos frente a la proteína E2 del virus de la hepatitis G

ARN: ácido ribonucleico

AST: aspartato aminotransferasa

BD: bilirrubina directa

BI: bilirrubina indirecta

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

CMV: citomegalovirus

dNTPs: deoxinucleótidos trifosfatos

ELISA: técnica de enzimoimmunoanálisis

ELISA 3: ELISA de tercera generación

E. coli: *Escherichia coli*

FA: fosfatasa alcalina

GBV: virus GB de la hepatitis

GBV-A: virus GB-A de la hepatitis

GBV-B: virus GB-B de la hepatitis

GBV-C: virus GB-C de la hepatitis

GGT: gamma-glutamil transpeptidasa

HCA_L: hepatitis crónica activa leve

HCA_M: hepatitis crónica activa moderada

HCA_G: hepatitis crónica activa grave

HCC: hepatitis crónica C

HCP: hepatitis crónica persistente

HPT: hepatitis postransfusional

HVR: región hipervariable

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

IK: índice de Knodell

IS: índice de Scheuer

IFN: interferón

LM: lesiones mínimas

NANB: no A no B

NANC: no A no C

NANE: no A no E

5 NC: 5' no codificante

NS: no significativo

NS3: no estructural 3.

NS4: no estructural 4.

NS5: no estructural 5.

ORF: región de lectura abierta

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PT: proteínas totales

RDA: análisis de la diferencia representativa

RIBA 3: ensayo recombinante de inmunoprecipitación de tercera generación

RT: transcripción en reverso

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SIA: ensayo de tira inmunoabsorbente

SOD: superóxido-dismutasa

VEB: virus de Epstein-Barr

VHA: virus de la hepatitis A

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VHD: virus de la hepatitis D

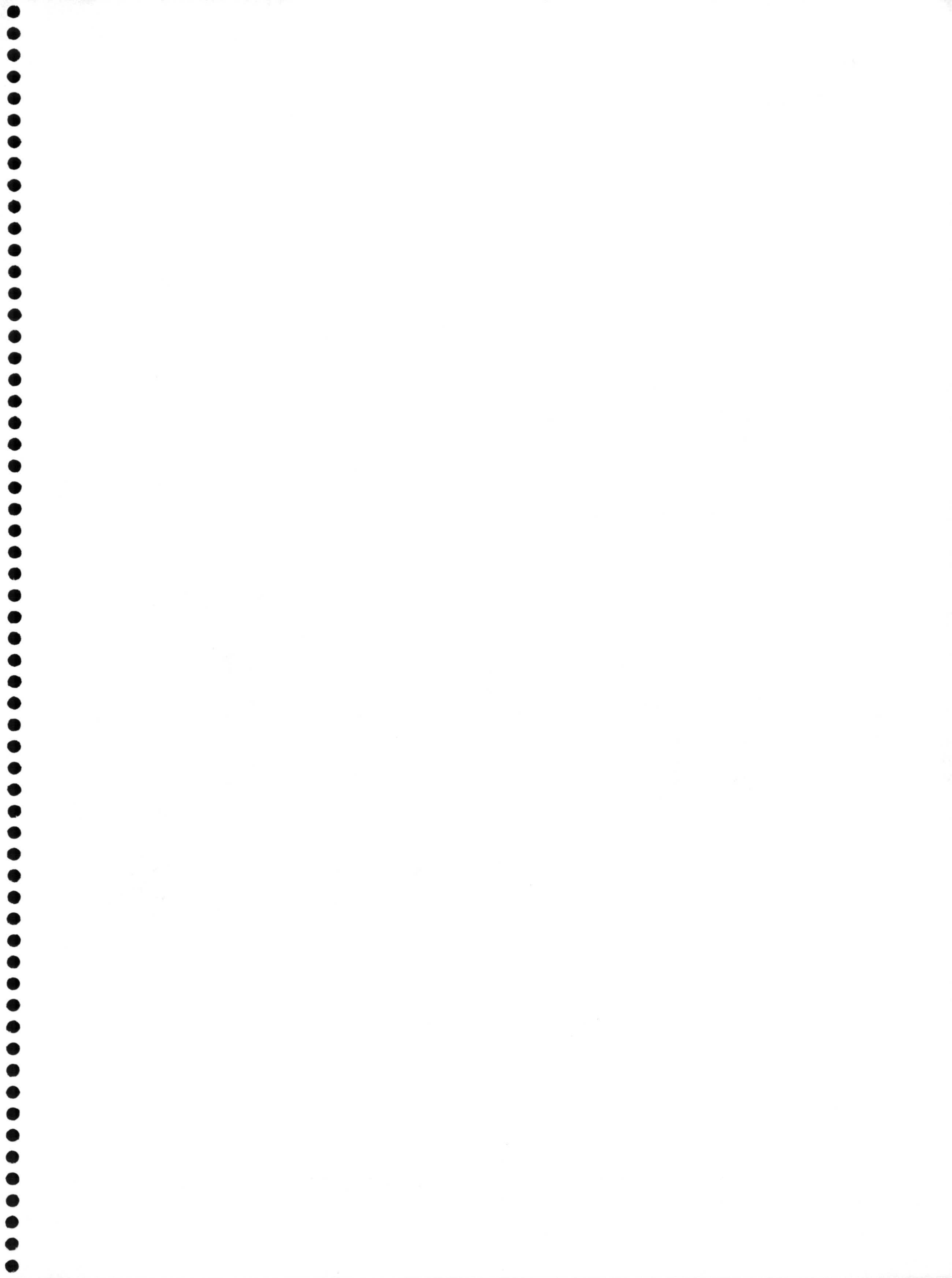
VHE: virus de la hepatitis E

VHG: virus de la hepatitis G

VHNANB: virus de hepatitis no A no E

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE



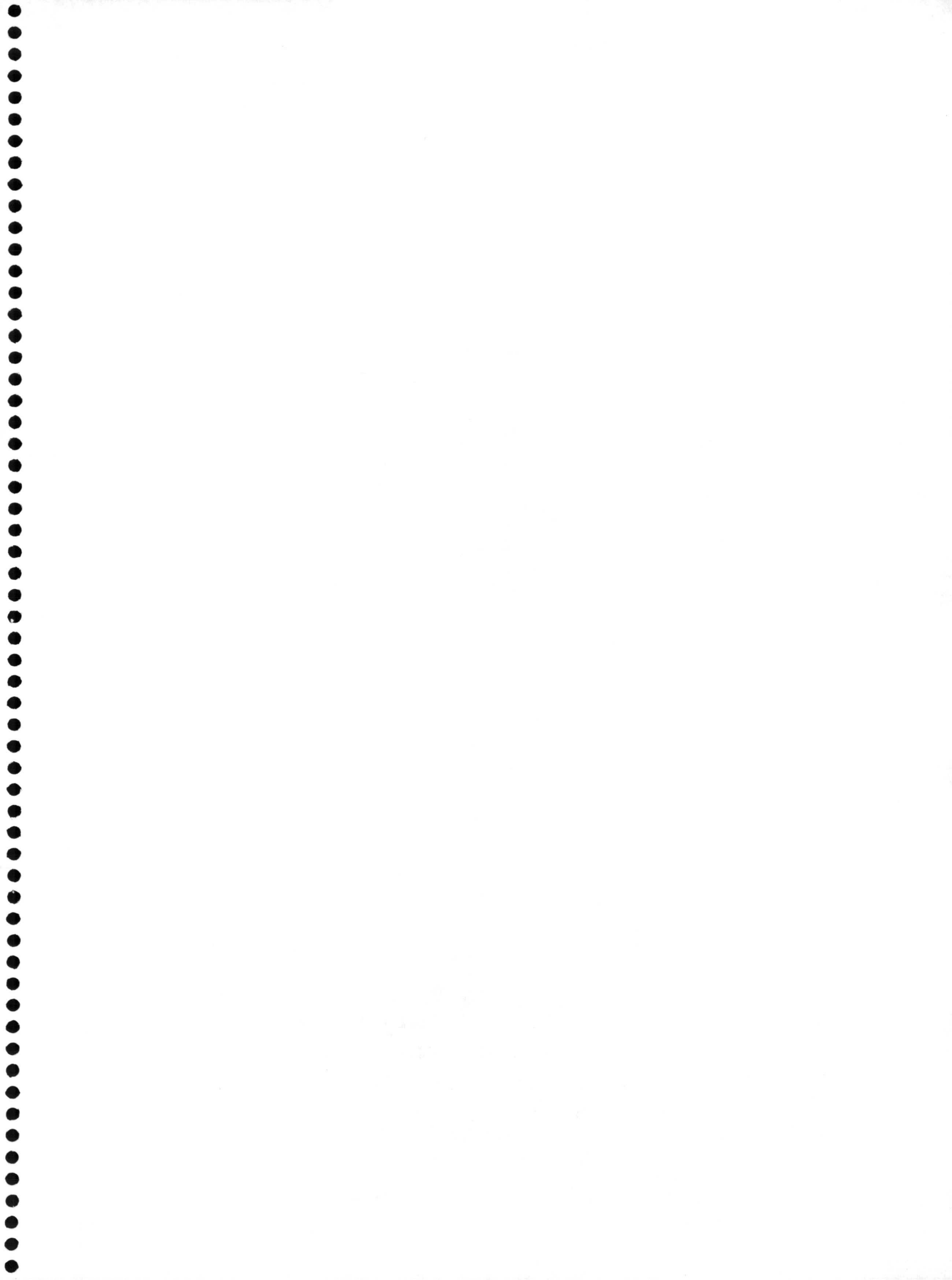
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. VIRUS GB DE LA HEPATITIS.....	5
1.1.1. EL AGENTE GB.....	5
1.1.2. LOS VIRUS DE LA HEPATITIS GB.....	7
1.1.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS GBV.....	16
1.1.4. PREVALENCIA EN HUMANOS DE ANTICUERPOS ANTI-GB Y DE ARN-GBV-C.....	18
1.2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS G (VHG).....	20
1.2.1. CLONACIÓN DEL VIRUS G.....	20
1.2.2. ESTRUCTURA GENÓMICA DELVHG.....	22
1.2.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	25
1.2.3.1. Prevalencia de la infección por VHG.....	25
1.2.3.2. Hepatitis aguda y fallo hepático fulminante.....	30
1.2.3.3. Hepatitis crónica, cirrosis, carcinoma hepatocelular y otras hepatopatías.....	30
1.2.3.4. Prevalencia del VHG en pacientes trasplantados.....	32
1.2.3.5. Prevalencia en otras enfermedades.....	33
1.2.3.6. Mecanismo de transmisión.....	33
➤ Transmisión parenteral.....	33
➤ Transmisión vertical.....	38
➤ Transmisión sexual.....	41
➤ Desconocido.....	42
1.3. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VHG.....	43
1.3.1. DETECCIÓN DEL GENOMA VÍRICO.....	43
1.3.2. MÉTODOS SEROLÓGICOS.....	43
1.4. TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VHG.....	46
1.5. VHG Y HEPATOPATÍA CRÓNICA POR VHC.....	50

1.6. REPLICACIÓN DEL VHC.....	57
1.6.1. DETECCIÓN DE LA CADENA ANTIGENÓMICA DEL VHC.....	59
1.6.2. CADENA ANTIGENÓMICA EN TEJIDO HEPÁTICO.....	61
1.6.3. CADENA ANTIGENÓMICA EN HEPATOCARCINOMA.....	62
1.6.4. CADENA ANTIGENÓMICA EN CMSP.....	63
1.6.5. PRESENCIA DEL VHC EN OTROS TEJIDOS Y FLUIDOS.....	69
1.7. REPLICACIÓN DEL VHG.....	72
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	77
2.1. INTRODUCCIÓN.....	79
2.2. OBJETIVOS.....	80
3. PACIENTES Y MÉTODOS.....	81
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	83
3.1.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL VHG.....	86
3.1.2. ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL VHG Y DEL VHC.....	86
3.2. MÉTODOS CLÍNICOS.....	87
3.2.1. BIOPSIA HEPÁTICA.....	87
3.2.1.1. Técnica.....	87
3.2.1.2. Lesión histológica.....	87
3.2.1.3. Índice de Knodell.....	88
3.2.1.4. Sistema de gradación de la actividad inflamatoria y de la fibrosis de Scheuer.....	89
3.3. MÉTODOS DE LABORATORIO.....	91
3.3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	91
3.3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	91
3.3.2.1. Separación de CMSP.....	91
3.3.2.2. Preparación para la extracción de ARN.....	92
3.3.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	92

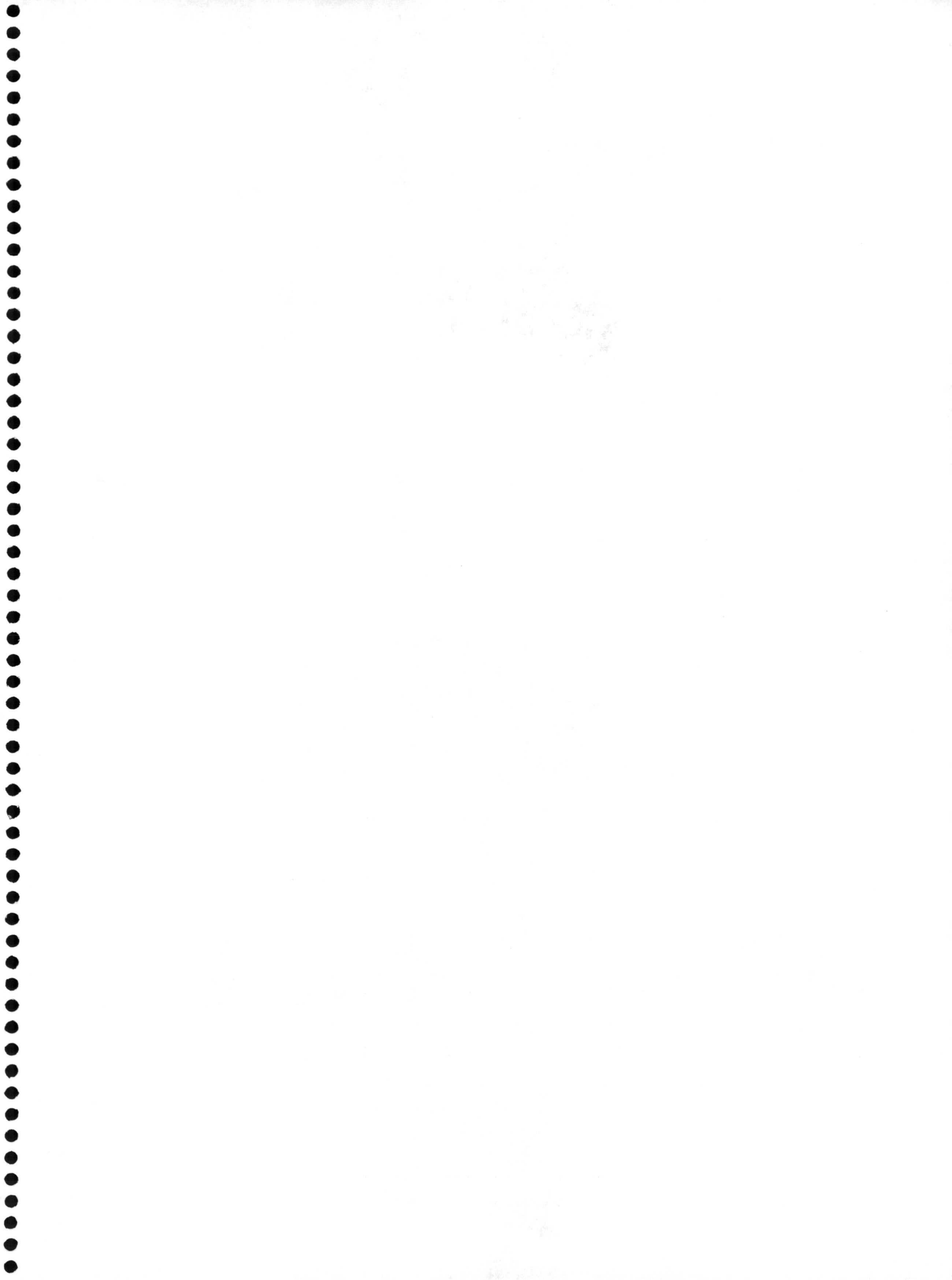
3.3.3.1. Pruebas Serológicas.....	92
3.3.3.2. Pruebas genómicas.....	94
◆ Extracción de ARN.....	94
➤ Determinación del ARN del VHG (Boehringer Mannheim).....	96
◆ Preparación de la muestra.....	96
◆ Reacción de RT.....	97
◆ Reacción de amplificación y marcaje.....	97
◆ Detección de los productos amplificados.....	98
◆ Interpretación de los resultados.....	98
➤ Detección específica de las cadenas genómica y antigenómica del VHC.....	98
◆ Reacción de RT.....	99
◆ Nested-PCR.....	99
◆ Detección del producto amplificado.....	100
➤ Detección específica de las cadenas genómica y antigenómica del VHG.....	100
◆ Reacción de RT.....	101
◆ Nested-PCR.....	101
◆ Detección del producto amplificado.....	102

➤ Controles aplicados.....	102
➤ Determinación de la concentración de ARN-VHC en suero.....	103
➤ Determinación del genotipo del VHC.....	104
3.4. MÉTODO ESTADÍSTICO.....	105
3.4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	105
3.4.2. ESTADÍSTICA COMPARATIVA.....	105
4. RESULTADOS.....	107
4.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	110
4.2. DATOS ANALÍTICOS.....	111
4.3. AUTOANTICUERPOS.....	113
4.4. DATOS HISTOLÓGICOS.....	113
4.5. ESTUDIO VIROLÓGICO.....	116
4.5.1. ESTUDIO DE LAS CADENAS GENÓMICA Y ANTIGENÓMICA DEL VHC EN LOS GRUPOS I Y II.....	119
4.5.1.1. Estudio de las cadenas del VHC en suero.....	119
4.5.1.2. Estudio de las cadenas del VHC en CMSP.....	120
4.5.1.3. Estudio de las cadenas del VHC en hígado.....	121
4.5.2. ESTUDIO DE LAS CADENAS GENÓMICA Y ANTIGENÓMICA DEL VHG Y DEL VHC EN EL GRUPO I.....	122
4.5.2.1. Estudio de las cadenas del VHG y del VHC en suero..	122
4.5.2.2. Estudio de las cadenas del VHG y del VHC en muestras de CMSP.....	123
4.5.2.3. Estudio de las cadenas del VHG y del VHC en hígado	124
4.5.3. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN Y EL GENOTIPO DEL VHC EN LOS GRUPOS I Y II.....	125
4.5.4. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN Y EL GENOTIPO	

DEL VHC SOBRE LA PRESENCIA DE GENÓMICA Y ANTIGENÓMICA DEL VHC EN CMSP Y EN HÍGADO.....	127
4.5.5. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ALT Y LA PRESENCIA DE CADENA ANTIGENÓMICA DEL VHC EN SUERO.....	128
4.5.6. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ALT Y LA PRESENCIA DE CADENA ANTIGENÓMICA DEL VHC EN CMSP.....	128
4.5.7. RELACIÓN ENTRE LA LESIÓN HISTOLÓGICA Y LA REPLICACIÓN DEL VHC EN HÍGADO.....	129
5. DISCUSIÓN.....	131
6. CONCLUSIONES.....	147
7. BIBLIOGRAFÍA.....	149



1. INTRODUCCIÓN



Los primeros datos sobre hepatitis no A no B (NANB) se remontan a principios de los años setenta, cuando se constató que la mayoría de las hepatitis postransfusionales (HPT) no eran debidas a los dos virus de la hepatitis conocidos hasta entonces; el virus de la hepatitis B (VHB) y el de la A (VHA) (Alter y cols., 1972; Feinstone y cols., 1975).

El concepto de hepatitis NANB surgió en ese momento, ya que no se tenía la certeza de que el cuadro de HPT estuviese relacionado con otros agentes. De hecho, estudios realizados en animales con el objetivo de demostrar la transmisibilidad de "el/los virus de la hepatitis NANB", pusieron de manifiesto que al menos dos agentes podían estar involucrados (Tabor y cols., 1979; Hollinger y cols., 1980; Yoshizawa y cols., 1981; Bradley y cols., 1983).

En 1989, Choo y cols. clonaron parte del genoma del virus de la hepatitis C (VHC), desarrollándose pruebas serológicas capaces de detectar anticuerpos frente a diversos epitopos víricos (Hollinger y cols., 1980) y pruebas virológicas (Houghton y cols., 1991), que posibilitaban la detección del genoma vírico tanto en suero (Garson y cols., 1990), como en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (Zignego y cols., 1992) y en tejido hepático (Weiner y cols., 1990). El uso a gran escala de estas técnicas de diagnóstico confirmó que la mayoría de las HPT (Esteban y cols., 1990) y una proporción importante de casos de hepatitis agudas esporádicas (Alter y cols., 1990) y hepatitis crónicas, estaban relacionadas con este nuevo virus.

Por tanto, el descubrimiento del VHC mediante técnicas de

biología molecular ha supuesto un hito en la historia de la hepatología, que viene reflejado por la gran cantidad de información que se publica al respecto. El gran interés despertado por este descubrimiento desvió momentáneamente el interés por otros agentes causantes de hepatitis. No obstante, aún existen casos de hepatitis supuestamente víricas, en los que la investigación de todos los virus conocidos es negativa. Este problema ha mantenido activa la búsqueda de nuevos agentes capaces de ocasionar hepatitis en humanos y hace unos años se logró identificar un nuevo agente, el virus G (VHG).

1.1. VIRUS GB DE LA HEPATITIS

1.1.1. EL AGENTE GB

Los antecedentes históricos de los virus GB de la hepatitis (GBV) hay que buscarlos en los trabajos de Deinhardt y cols. (1967), que describieron el primer modelo primate no humano para la hepatitis vírica. Utilizando tamarinos (pequeños primates de América del Sur del género *Sanguinus*) consiguieron transmitir una hepatitis a partir de la inoculación de los mismos con dos fuentes de origen humano; plasma (WW55) de un varón obtenido tres días antes de la aparición de un cuadro de hepatitis icterica y suero de un cirujano, cuyas iniciales eran GB, que desarrolló una hepatitis aguda.

Más tarde, se ensayaron otros inóculos de origen humano capaces de inducir hepatitis en tamarinos. El MS-1 procedía de un conjunto de 22 muestras de niños con hepatitis A (Krugman y cols., 1967).

El agente Berlín se obtuvo de sueros de pacientes con hepatitis aguda. Mediante experimentos de inoculación cruzada, se trató de caracterizar la relación antigénica de estos inóculos. La reinoculación con el mismo agente que había inducido anteriormente hepatitis no provocaba un nuevo brote de ésta. Es decir, había resistencia a la reinfección con inóculos autólogos. Se comprobó que el agente GB estaba relacionado antigénicamente con el agente Berlín y con el WW-

55, ya que la inoculación previa por uno de ellos protegía de una posterior infección con los otros. El MS-1 no parecía estar relacionado con los otros tres agentes.

Se realizaron una serie de experimentos para tratar de dilucidar cuáles eran las posibles vías de transmisión de la infección. El agente GB transmitido por vía parenteral a los tamarinos no parecía contagiarse de unos a otros (Parks y cols., 1969), si bien se comprobó que los animales alimentados con material infeccioso procedente del suero GB desarrollaban hepatitis (Deinhardt y cols., 1975). La administración intravenosa de extractos fecales obtenidos de un tamarino con hepatitis aguda a otro animal sano no provocaba enfermedad (Karayiannis y cols., 1989). Por lo tanto, parecía que la infección se transmitía por vía parenteral y, aunque el agente GB fuera también infeccioso por vía oral, no se excretaba por las heces.

Mediante experimentos de filtración, se comprobó que el agente GB era un virus pequeño, ya que los animales inoculados con suero tras pasarlo por un filtro de 50 y 25 nm desarrollaban hepatitis en un 100 y 80% respectivamente. El tratamiento del inóculo mediante una solución de éter al 50% durante 18 horas a 4°C, reducía su infectividad en un 75%, lo que hizo pensar que el agente GB era un virus con envuelta (Parks y cols., 1969).

A mediados de la década de los 70 se realizaron estudios de microscopía electrónica con el agente GB que resultaron contradictorios. Se detectaron partículas de entre 20 y 36 nm en plasma infeccioso de tamarinos, heces y homogeneizados de hígado

durante la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, no se pudieron asociar estas partículas con el agente GB (Almeida y cols., 1976; Dienstag y cols., 1976).

Parks y Melnick (1969) cuestionaron el origen humano del agente GB, ya que observaron la aparición de un caso espontáneo de hepatitis en un tamarino, que podía ser transmitida a otros animales de manera similar al agente GB. Además, una muestra obtenida de uno de estos tamarinos, el WSP-5, tenía el mismo efecto que el agente GB en estudios de inoculación cruzada.

Por otra parte, observaron que no todos los tamarinos inoculados eran susceptibles a la infección, lo que sugería que los animales resistentes podrían haber adquirido inmunidad frente al agente GB por una exposición natural previa. Estos hallazgos ponían en entredicho la teoría defendida por otros autores acerca del origen humano del agente GB. Sin embargo, no fueron corroborados por estudios posteriores.

Con la identificación de los virus VHA y VHB a principios de la década de los 70, los estudios sobre el agente GB quedaron relegados a un segundo plano hasta la década de los 80.

1.1.2. LOS VIRUS DE LA HEPATITIS GB

La clonación del agente GB fue posible gracias a la utilización del análisis de la diferencia representativa (RDA), que es una técnica de biología molecular basada en la amplificación del genoma vírico

mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por primera vez por Lisitsyn y cols. en 1993. La PCR es una reacción enzimática realizada *in vitro* en la que se amplifican secuencias específicas del ADN utilizando secuencias cortas de nucleótidos sintéticos, llamados cebadores o iniciadores, que hibridan de forma específica con cada una de las cadenas de ADN y definen los dos extremos del fragmento a identificar. Este método permitía obviar las dificultades que planteaba el empleo de las técnicas convencionales de biología molecular para el aislamiento de genes que habían sido empleados para la identificación del VHC y del virus de la hepatitis E.

En 1995 Simons y cols. (1995a) consiguieron clonar el agente GB empleando este método. Los pasos que llevaron a cabo fueron los siguientes: 1) obtuvieron muestras de plasma de un tamarino infectado por GB (T-1053) antes y después de la inoculación; 2) debido a que no conocían si el genoma vírico era ADN o ARN y de cadena doble o sencilla, hicieron una copia de ADN complementario (ADNc) mediante una transcripción en reverso (RT), utilizando oligonucleótidos con secuencias aleatorias; 3) a continuación sintetizaron cadenas complementarias a éstas, mediante una enzima polimerasa y deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), obteniendo cadenas dobles de ADN; 4) sometieron estas dobles cadenas a la acción de la enzima de restricción *Sau3A I* (que corta 4 pares de bases); 5) utilizando un cebador específico, el R-Bgl, realizaron la hibridación entre el producto resultante y los ácidos nucleicos obtenidos del plasma antes y después de la inoculación y 6) mediante PCR realizaron una amplificación selectiva de las secuencias obtenidas.

Tras repetidos pasos de hibridación y amplificación selectiva, fueron eliminando los ácidos nucleicos que presumiblemente pertenecían al animal, es decir, los que estaban presentes en el plasma pre y post inoculación, permaneciendo los ácidos nucleicos víricos. Se aislaron un total de 76 productos de PCR que posteriormente fueron clonados. Mediante hibridación cruzada, se comprobó que 10 clones obtenidos por RDA no estaban presentes en el genoma humano, tamarinos no infectados, *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*. Este hecho apoyaba la hipótesis de que estos clones derivaban de un agente exógeno. Mediante RT-PCR, se detectó la presencia de estas secuencias en el plasma del tamarino inoculado con el agente infeccioso, pero no en el plasma previo a la inoculación ni en el de tamarinos sanos.

De la misma forma, fue posible detectar las secuencias investigadas en el material que se empleó como inóculo para infectar al animal (H205 GB pasaje 11). La detección de las secuencias sólo fue posible tras la RT de los ácidos nucleicos, lo que sugería que el clon investigado derivaba de un virus ARN. En 5 de los clones aislados se apreciaban similitudes con otros flavivirus, concretamente con las regiones no estructurales del VHC.

Para la clonación del genoma vírico completo se emplearon técnicas de PCR usando iniciadores con secuencias específicas de los clones ya aislados y amplificando secuencias presentes entre los clones obtenidos por RDA.

Tras el análisis de las secuencias obtenidas, pudo comprobarse

que en el plasma del tamarino T-1053 en fase aguda coexistían dos moléculas de ARN, es decir, dos genomas diferentes, pero con cierta identidad entre sus secuencias y con miembros del grupo del VHC. Los dos genomas aislados se denominaron GB virus A (GBV-A) y GB virus B (GBV-B) (Karayiannis y cols., 1989).

El genoma del GBV-A consiste en una hebra de ARN formada por 9.493 nucleótidos y contiene las secuencias encontradas en 5 de los 7 clones que se obtuvieron por RDA. El GBV-B tiene al menos 9.143 nucleótidos y contiene las secuencias de los dos clones restantes (Muerhoff y cols., 1995). Ambos virus presentan una única región de lectura abierta (ORF) que codifica para una poliproteína putativa de una longitud aproximada de 3000 aminoácidos.

Mediante Northern-blot pudo comprobarse que en el hígado del tamarino T-1053 había una alta concentración de ARN del GBV-B, pero no del GBV-A. En el plasma de fase aguda se demostró la presencia de GBV-B, mientras que el GBV-A podía no estar presente. Se confirmó la existencia de dos virus por estudios que demostraban que las dos especies de ARN presentes en el inóculo del agente GB podían ser filtradas, diluídas y transmitidas independientemente a tamarinos. La naturaleza vírica de estos dos agentes se demostraba al poder ser detectados mediante RT-PCR en sueros de tamarinos, que previamente habían sido inoculados con GBV-A y GBV-B, tras ser pasados por un filtro de 0,1 μm (Schaluder y cols., 1995).

La viremia producida por el GBV-B, demostrada por RT-PCR, provocaba elevación de enzimas hepáticas, mientras que esto no se

demostró en viremias producidas exclusivamente por el GBV-A. En tamarinos infectados por ambos virus, podía detectarse la presencia de los dos tipos de ácidos nucleicos en plasma extraído en fase aguda, pero solamente se detectaba el ARN del GBV-B en el hígado (Simons y cols., 1995a).

Esto sugería que era el GBV-B el que causaba hepatitis en los animales inoculados. Probablemente, los estudios iniciales basados en la observación de hepatitis bioquímica estaban referidos exclusivamente al GBV-B (Simons y Mushahwar, 1996).

Mediante la determinación por RT-PCR de estos dos nuevos agentes víricos en el suero original del cirujano GB, obtenido tres días después de la aparición de la ictericia, habría sido posible comprobar si alguno de ellos había causado el cuadro de hepatitis aguda, pero este suero ya no existía en el momento en que se identificaron estos virus. Los ensayos realizados en los inóculos que se habían obtenido a las 3 y 8 semanas tras la aparición de la hepatitis, resultaron repetidamente negativos a la determinación por RT-PCR para el GBV-A y GBV-B (Schalauder y cols., 1995).

No obstante, esto no excluye a estos virus como causantes de hepatitis en humanos, ya que la ausencia de ARN en estos sueros puede deberse a la degradación del mismo durante el largo periodo y las condiciones de almacenaje (casi 30 años a -20°C). En el suero correspondiente a la octava semana de enfermedad se pudo demostrar una relación indirecta con el GBV-A. Pilot-Matias y cols. (1996) encontraron una reacción débil entre anticuerpos del suero del cirujano

GB y dos proteínas codificadas por la región NS5 del GBV-A mediante análisis de Western-blot, pero no encontraron reactividad con proteínas de GBV-B. Al no contar con suero basal del cirujano GB, no pudieron determinar si esta seroactividad era debida a un proceso de seroconversión o a reacciones cruzadas con anticuerpos inducidos por algún antígeno no relacionado con el virus. De cualquier forma, estos dos nuevos virus podrían estar implicados en algunas formas de hepatitis NANB.

Tras la clonación del genoma completo de los GBV, fue posible desarrollar técnicas de ELISA para determinar la seroprevalencia frente a estos virus en distintas poblaciones humanas. Para ello, se expresaron regiones de los genomas del GBV-A y GBV-B como proteínas recombinantes en *E. coli*. Las regiones antigénicas se identificaron por Western-blot usando plasma de tamarinos convalecientes, plasma del cirujano GB convaleciente y diversos plasmas de individuos de alto riesgo o con hepatitis NANE (Pilot-Matias y cols., 1996).

Se desarrollaron 9 ELISAs diferentes: para el GBV-A utilizaban proteínas codificadas por los genes no estructurales, mientras que para el GBV-B se empleaban proteínas codificadas por las regiones putativas del core, NS3, NS4 y NS5 (Muerhoff y cols., 1995). En los animales inoculados con GBV-B o con ambos virus, se detectó mediante ELISA la presencia de anticuerpos frente a regiones putativas del GBV-B, pero no frente al GBV-A. Ello probablemente fuera debido a la menor capacidad inmunogénica del GBV-A y más concretamente de los antígenos seleccionados. Esto podría explicar los resultados

iniciales en tamarinos infectados, en los que se comprobaba que existía protección frente a la reinfección por GBV-B, pero no frente a GBV-A (Fagan y cols., 1987).

Para estudiar la seroprevalencia del GBV-A y GBV-B en poblaciones humanas se emplearon dos grupos: uno considerado de bajo riesgo, constituido por donantes sanos, y otro de alto riesgo, formado por un grupo de adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) y por individuos de África Occidental. En las muestras de donantes sanos de EEUU, que eran negativas para VHB y VHC, la seroprevalencia frente a GBV-A fue del 0,3%, frente a un 1,2% para el GBV-B. En ningún caso hubo positividad para ambos virus. La seroprevalencia total de anticuerpos para cualquiera de estos dos virus en los donantes voluntarios de sangre fue del 1,5%.

La población considerada como de alto riesgo estaba constituida por 102 individuos ADVP, con una alta seroprevalencia frente al VHC (99%) y VHB (76%). Demostraron la existencia de anticuerpos frente al GBV-A en el 3% y en el 11% para GBV-B, siendo la seroprevalencia total del 14%.

También fue considerada población de alto riesgo un grupo constituido por 1.300 individuos de África Occidental, una región geográfica donde la infección por agentes causantes de hepatitis es relativamente elevada (6% para VHC y 14% para VHB). Se detectó una seroprevalencia total para GBV-A y GBV-B del 19,9%. En 40 casos, las muestras resultaron positivas para ambos virus. El análisis estadístico de estos datos demostraba que en los grupos considerados como de

alto riesgo, la seroprevalencia frente al GBV-A y GBV-B era estadísticamente superior a la hallada en el grupo de donantes de sangre sanos (Simons y cols., 1995b).

En algunas de las muestras que habían resultado positivas frente a ambos virus, observaron que eran positivas para anticuerpos de tipo IgG e IgM. En los sueros que resultaron positivos para IgM, trataron de detectar mediante RT-PCR la presencia del virus. Sin embargo, no pudieron identificar ARN vírico en ninguna de las muestras estudiadas. Esto podía ser debido a un bajo título vírico, a que el agente ya hubiese sido aclarado del suero o a que los cebadores utilizados no fueran los adecuados. Otra posibilidad era que estos resultados serológicos se debieran a una inmunidad cruzada con proteínas codificadas por otro tipo de virus. Para comprobar esta posibilidad, Simons y cols. (1995b) diseñaron una RT-PCR utilizando oligonucleótidos degenerados que amplificaban un fragmento del gen putativo de la helicasa (NS3) del GBV-A, del GBV-B o del VHC genotipo 1.

En una de las muestras IgM positiva del grupo de África Occidental sometida a RT-PCR con los iniciadores degenerados para la región helicasa, se consiguió amplificar un producto con el tamaño esperado. El análisis de la secuencia de este producto mostró una homología limitada, tanto en lo referente a los nucleótidos (59%, 53,7% y 47,9%) como a los aminoácidos (64%, 2% y 50,4%) con los virus GBV-A, VHC-1 y GBV-B respectivamente. De los 42 aminoácidos presentes en esta región, 39 también lo estaban en el producto amplificado de la muestra de África Occidental. Entre estos 39

aminoácidos, algunos se localizan además en todo el supergrupo II de ARN helicasas (Koonin y Dolja, 1993).

Estos datos sugerían que el producto obtenido procedía de una región similar a la helicasa, pero de un virus parecido al GB y VHC. El análisis filogenético de estas secuencias, junto con secuencias de otros miembros de los flavivirus, reveló que derivaban de un virus que estaba más estrechamente relacionado con el GBV-A que con el GBV-B o que con los diferentes genotipos del VHC. Este nuevo virus fue inicialmente denominado GBV-C por su similitud con el GBV-A (Simons y cols., 1995b).

El GBV-C era un virus tipo ARN, ya que para detectar su genoma mediante PCR se requería un paso previo de RT, que estaba relacionado con el grupo de los flavivirus. No se detectaron secuencias de GBV-C por PCR en ADN humano, *Rhesus*, *S. cerevisiae* ni *E. coli*, por lo que se presumía su origen exógeno. Todo esto confirmaba que el GBV-C derivaba de un virus tipo ARN (Simons y cols., 1995b).

Con los mismos métodos que se habían usado para analizar las secuencias del GBV-A y GBV-B se obtuvo el GBV-C (Leary y cols., 1996a). El análisis de las secuencias mostraba que el GBV-C poseía un genoma de unos 9.126 nucleótidos. Al igual que los otros GBV, el GBV-C tiene una única ORF que codifica para una poliproteína putativa de unos 3.000 aminoácidos. Comparando la secuencia de aminoácidos comprobaron que el GBV-C presentaba una mayor homología con el GBV-A (48%), que con el GBV-B y VHC-1 (aproximadamente 28%).

1.1.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS GBV

La organización genómica de los GBV es similar a la de otros miembros de la familia *Flaviviridae*, con genes estructurales y no estructurales cuya posición también es similar a la de los otros miembros de la familia. Codifican poliproteínas en las que las proteínas estructurales se localizan en el extremo amino terminal, mientras que las no estructurales lo hacen hacia el extremo carboxilo terminal. El análisis de la secuencia de aminoácidos demuestra que los GBV codifican para ARN helicasas y ARN polimerasas tipo II. También hay secuencias relacionadas con una función proteasa y sitios de corte para la proteasa (Muerhoff y cols., 1995; Leary y cols., 1996a).

Muerhoff y cols. (1995) comprobaron que el GBV-B estaba más relacionado con el VHC que el resto de GBV. Observaron que presentaba una proteína del core de carácter básico, sus poliproteínas tenían un alto número de aminoácidos potencialmente glicosilables y que su región 5' no codificante (5'NC) presentaba secuencias conservadas, también presentes en las regiones 5'NC del VHC y de los pestivirus.

El GBV-A y el GBV-C no se parecían estructuralmente al VHC. En las regiones 5'NC de ambos virus existían secuencias conservadas, pero no en relación con el VHC y pestivirus. No era posible discernir con claridad si presentaban proteínas core de tipo básico, y sus poliproteínas tenían un número relativamente bajo de aminoácidos fácilmente glicosilables (Muerhoff y cols., 1995; Leary y cols., 1996a). Todo ello, junto con el análisis de secuencias, indicaba que el GBV-A y

GBV-C eran diferentes estructuralmente al GBV-B y VHC.

Los árboles filogenéticos generados mediante alineación de las secuencias de la ARN helicasa y de la ARN polimerasa permiten poner de manifiesto las relativas distancias evolutivas entre los GBV y los otros miembros de la familia *Flaviviridae*.

Los genotipos del VHC están localizados en una rama principal (género hepacivirus), al igual que los flavivirus y pestivirus. Los GBV se sitúan en una o dos ramas principales. El GBV-A y el GBV-C presentan un ancestro común distinto al del GBV-B. El estudio filogenético muestra que hay un significativo grado de divergencia de los GBV a partir del ancestro, que es común para el linaje VHC y el linaje GB. La divergencia existente entre el GBV-A y GBV-B con los otros flavivirus, incluyendo al grupo del VHC, demuestra que los GBV no pueden ser considerados como genotipos del VHC. Aún está por determinar si el GBV-A y el GBV-C pueden ser considerados como distintos genotipos de un mismo virus. Estos análisis sugieren que los GBV deben clasificarse como un género aparte dentro de la familia *Flaviviridae* o como un subgénero dentro del género hepacivirus (que incluye al VHC) (Simons y Mushahwar, 1996).

Se han identificado plasmas y sueros positivos para el GBV-C pertenecientes a individuos de todo el mundo. Para ello se han empleado técnicas de PCR con cebadores de las regiones NS3 y 5'NC. Muerhoff y cols. (1996) secuenciaron diferentes productos amplificados de la región 5'NC del GBV-C para posteriormente alinear sus secuencias y construir el árbol filogenético. De este análisis podía

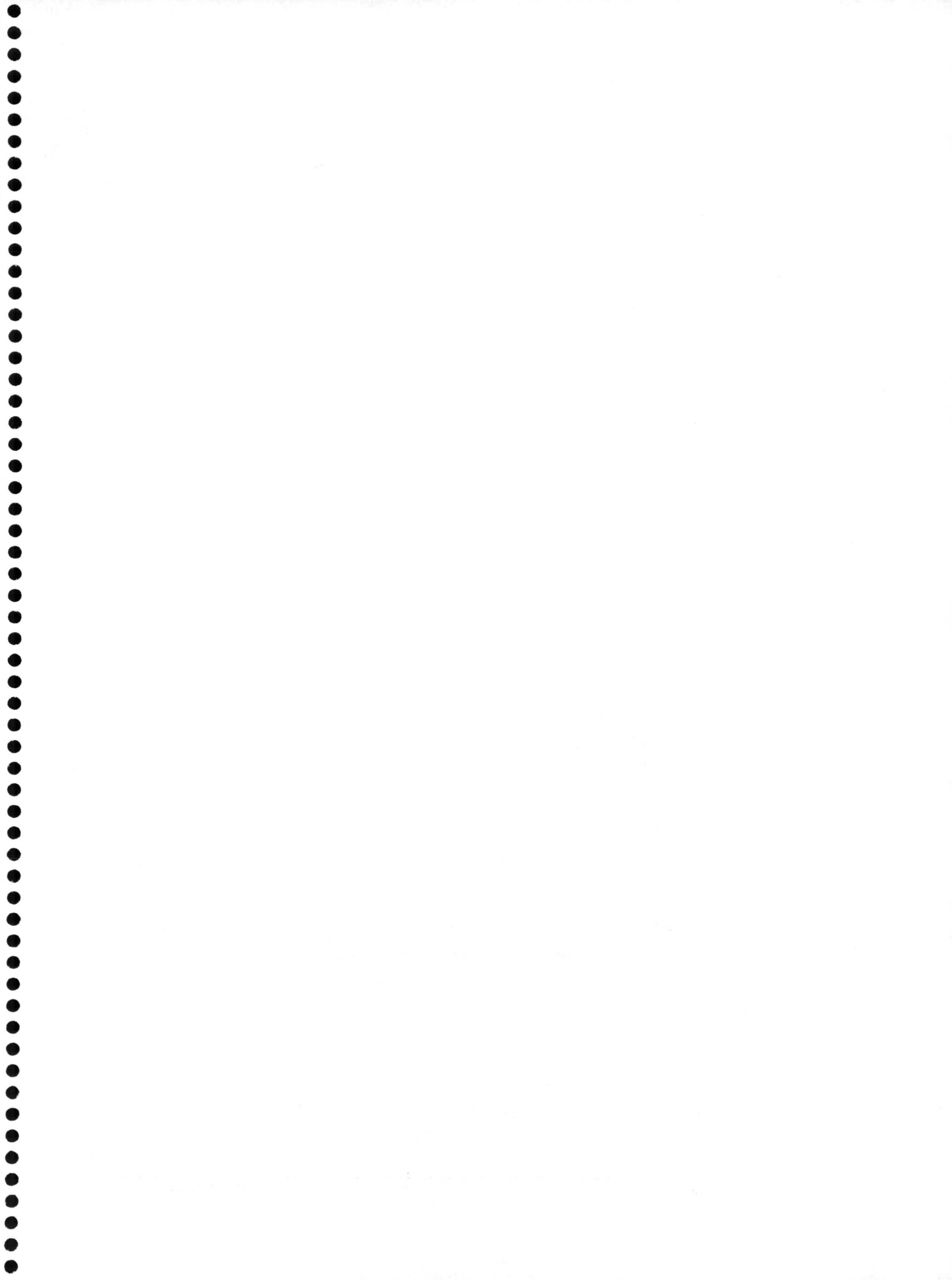
deducirse que existían al menos 5 genotipos del GBV-C. Los grupos 1a y 1b están constituidos por los clones aislados exclusivamente de individuos de África Occidental e incluyen al clon original del GBV-C. Los clones del grupo 3 se han aislado exclusivamente de individuos de Japón. Los genotipos 2a y 2b se encuentran en individuos del Norte de África, Europa y Lejano Oriente, pero no presentan una clara distribución geográfica. Los clones del grupo 2 están más relacionados entre sí que los clones de los grupos 1 y 3.

1.1.4. PREVALENCIA EN HUMANOS DE ANTICUERPOS ANTI-GB Y DE ARN-GBV-C

Los ensayos realizados hasta el momento utilizando proteínas recombinantes estructurales y no estructurales expresadas en *E. coli*, no han sido capaces de detectar anticuerpos en la mayoría de sueros ARN-GBV-C positivos. Así, los ELISAs con proteínas recombinantes del GBV-A, B y C fracasaron en más del 25% de las muestras con viremia del GBV-C. Además, y de la misma forma que ocurre con otros virus de la familia *Flaviviridae*, parece que existe reactividad cruzada entre los virus GBV-A, B y C (Simons y cols., 1996).

Por este motivo, hasta que no se desarrollen pruebas serológicas altamente sensibles y específicas, la técnica de elección para realizar estudios epidemiológicos para GBV-C es la PCR. Se ha desarrollado un método de PCR llamado "PCR en descenso" (touchdown PCR), que utiliza cebadores derivados de la región conservada de la helicasa (NS3) del GBV-C (Leary y cols., 1996b).

Mediante este método se ha tratado de determinar la presencia del GBV-C en diversas poblaciones (Simons y cols., 1996). Así, se ha podido demostrar una prevalencia en donantes de sangre en EEUU del 1,3% (5,6% en los que presentaban ALT elevada). También se ha podido detectar en individuos con hepatitis NANE, así como en portadores crónicos de VHB, VHC y VHD, en hepatitis aguda, cirrosis criptogénica, carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante. En algunos casos la viremia por GBV-C ha podido ser detectada durante largos periodos de tiempo. Todos estos datos sugieren que el GBV-C está mundialmente distribuido y que se transmite por vía parenteral. La infección puede persistir durante años y podría estar asociada a una hepatitis crónica. El curso de la enfermedad puede ser benigno (niveles de ALT normales) o más grave (ALT elevada). En el momento actual la prevalencia en donantes de sangre voluntarios es mayor que la prevalencia del VHB y VHC (Simons y cols., 1996).



1.2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS G (VHG)

1.2.1. CLONACIÓN DEL VIRUS G

Después de varios años de estudios sobre el VHC, existen datos que orientan hacia la existencia de otros virus de hepatitis NANC. Así, el cribaje de los donantes de sangre mediante pruebas serológicas para los virus actualmente conocidos ha permitido una importante disminución de la incidencia de HPT. Sin embargo, todavía se identifican casos de HPT (entre un 0,85% y 3,5%) cuya etiología no puede ser reconocida a pesar de investigarse la presencia de virus hepatotropos o un posible origen tóxico. Esto hacía pensar en la posible implicación de otros agentes víricos hasta ahora desconocidos.

Los esfuerzos dirigidos a la identificación de otros virus de hepatitis han culminado con el descubrimiento de diversos aislados de ARN de estructura similar a los miembros de la familia *Flaviviridae*. Así, en 1995 se desarrollaron trabajos paralelos a los de Simons y cols. (1995a) que culminaron con la identificación de un nuevo virus de la hepatitis; el VHG (Muerhoff y cols., 1995; Schalaunder y cols., 1995; Simons y cols., 1995b; Pilot-Matias y cols., 1996). Este descubrimiento ha sido posible gracias al empleo de técnicas de biología molecular similares a las utilizadas para la clonación del VHC (Choo y cols., 1989).

Los primeros trabajos para la detección del VHG (Linnen y cols.,

1996) se realizaron a partir del suero de un paciente con hepatitis crónica postransfusional (PNF2161), que había resultado negativo para el VHB y el VHC por técnicas de primera generación. Análisis posteriores mediante técnicas de ELISA de segunda generación y PCR demostraron la presencia del VHC en este paciente. Tras la precipitación de las partículas víricas del suero, se obtuvo una librería de ADNc (Lambda gl1) que fue amplificado. El análisis de estas secuencias demostró que estaban relacionadas con el VHC, pero existían otras que no se relacionaban con este virus ni con ninguna otra secuencia genómica contenida en la base de datos GenBank. Estas últimas secuencias se utilizaron para construir oligonucleótidos que permitieron demostrar que eran exógenas, es decir, que no estaban relacionadas con el genoma humano, *E. coli* ni *S. cerevisiae*. Mediante RT-PCR obtuvieron un producto de amplificación (470-20-1) y a partir del ADNc generaron múltiples clones solapantes, con los que pudo crearse una secuencia genómica consenso de 9.392 nucleótidos.

Utilizando las secuencias de ADNc del suero PNF2161, se inició una búsqueda de pacientes positivos únicamente para este nuevo agente, denominado VHG, en ausencia de infección por el VHB y el VHC. Se estudió una paciente con factor de riesgo ocupacional (por su profesión de enfermera), claramente negativa para el VHB y el VHC, que presentaba una elevación de transaminasas intermitente. Del suero obtenido lograron aislar secuencias solapantes del ADNc del primer paciente (PNF2161), construyendo así una secuencia consenso (R10291). El producto obtenido de este segundo paciente tenía 9.103 nucleótidos, con un grado de identidad con la secuencia genómica del primer paciente muy elevado (90,5%).

En ambos casos, la secuencia genómica aislada estaba constituida por una ORF continua, que codificaba una poliproteína de 2.873 aminoácidos en el primer caso y 2.910 en el segundo. La identidad en la secuencia de aminoácidos de la poliproteína codificada por ambos genomas era también muy alta (97,5%). Estudios en gradiente de densidad de sacarosa con VHC y VHA demostraron que el clon vírico original (VHG) provenía de una partícula vírica con envuelta. De esta forma, parecía evidente que se habían obtenido dos aislados del mismo género vírico.

1.2.2. ESTRUCTURA GENÓMICA DELVHG

La organización genómica de este nuevo virus (VHG) (Linnen y cols., 1996) es muy similar a la de otros miembros de la familia *Flaviviridae* (Figura 1). Las regiones estructurales se localizan hacia el extremo 5' y las no estructurales hacia el extremo 3'. La región 5'NC es algo más larga que la equivalente del VHC, pero al igual que ésta, se encuentra muy conservada entre los distintos aislados. Así, en aislados procedentes de 8 países diferentes se ha encontrado una identidad mínima del 90%. La región NS5 también parece estar bien conservada, y por ello son las regiones que se utilizan en el diseño de los iniciadores para la aplicación de las técnicas de PCR.

En comparación con otros virus de la familia *Flaviviridae*, las regiones estructurales y los extremos 5' y 3' muestran poca homología. De hecho, la región genómica que codifica la cápsida vírica en los dos aislados (PNF 2161 y R10291) muestra una secuencia de nucleótidos

de longitud diferente entre ellos y más corta que la correspondiente del VHC. Este dato, junto con el hecho de que a pesar de ello existe similitud en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región de la cápsida del genoma del VHG y del VHC, sugiere que en el caso del VHG dichas regiones representan derivados truncados de un ancestro común.

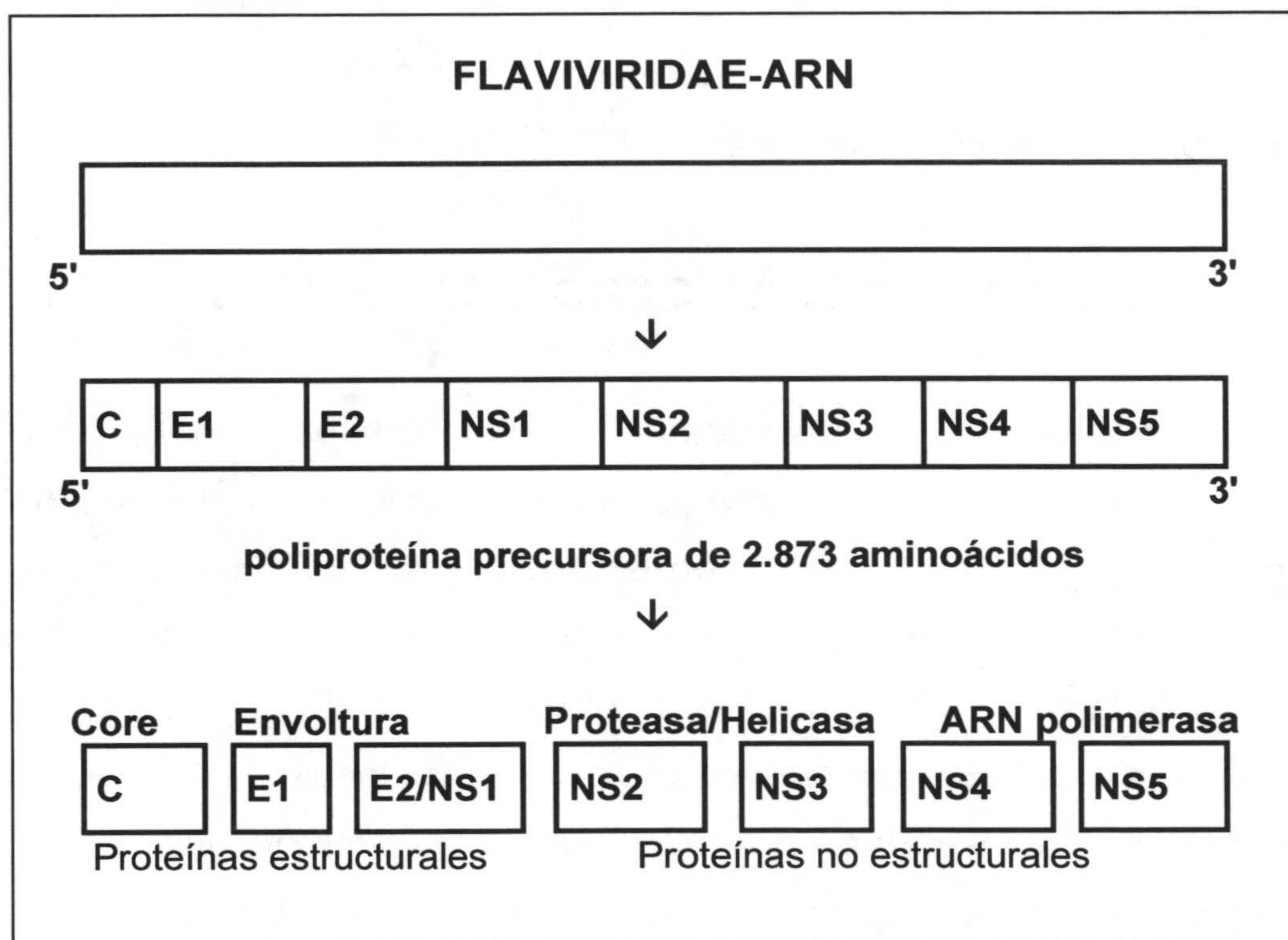


Figura 1. Estructura genómica del VHG

Las zonas de la poliproteína del VHG codificada por las regiones no estructurales del genoma tienen una actividad proteasa (NS2b), helicasa (NS3) y ARN-polimerasa (NS5b), similar a otros virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, como los flavivirus, pestivirus, hepacivirus y los GBV (Linnen y cols., 1996).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la poliproteína del VHG mostró una similitud altamente significativa con la secuencia protéica de los virus GBV-A y GBV-B, así como con distintos aislados del VHC. Esta similitud fue menor al compararla con otros virus de la familia *Flaviviridae*, como los del género pestivirus y flavivirus. El mayor grado de identidad global era entre el VHG y el GBV-A (43,8%), mientras que con el GBV-B y el VHC-1 era del 28,4% y 26,8% respectivamente. Las regiones que mostraban mayor similitud entre estos virus eran las correspondientes a las regiones no estructurales de la poliproteína. De hecho, la identidad era mayor en la región de la ARN polimerasa dependiente de ARN (60%, 40% y 50% para el GBV-A, GBV-B y VHC respectivamente) (Linnen y cols., 1996).

Linnen y cols. (1996) observaron una gran similitud al comparar la secuencia nucleotídica del VHG con el GBV-C (Simons y cols., 1995b), sobre todo al comparar una secuencia de 331 pares de bases de la región NS3 helicasa del GBV-C con la misma región del VHG: la homología de nucleótidos era de un 85,5% y la de la secuencia de aminoácidos era del 100% (Tabla 1). Sin embargo, y tal como afirmaban estos autores, para determinar con exactitud la relación entre el VHG y el GBV-C habría que comparar la totalidad del genoma de ambos virus.

La existencia en la base de datos GenBank de la secuencia genómica del VHG permitió a Zuckerman (1996) compararla con la secuencia del GBV-C, encontrando una homología en la secuencia de aminoácidos del 95% y del 85% en la de nucleótidos. Todos estos hallazgos permitieron afirmar que el GBV-C y VHG son distintos

aislados de un mismo virus (Simons y cols., 1996).

Homología VHG	VHC (%)	GBV-A (%)	GBV-B (%)	GBV-C (%)
Nucleótidos				
Región no estructural (NS3 y NS5)	50	60	40	85,5
Aminoácidos	26,8	43,8	28,4	100

Tabla 1. Homología entre el VHG, GBV -A, -B y -C y el VHC

1.2.3. EPIDEMIOLOGÍA

1.2.3.1. Prevalencia de la infección por VHG

Los datos epidemiológicos de los que actualmente disponemos sobre la infección por VHG se basan en estudios realizados mediante determinación por RT-PCR del ARN vírico (Linnen y cols., 1996; Schlueter y cols., 1996), ya que hasta ahora no se dispone de técnicas serológicas apropiadas que indiquen la existencia de infección activa. Sin embargo, en lo referente a la infección por los GBV, sí se han realizado estudios utilizando tanto técnicas de RT-PCR para la determinación del ARN vírico como métodos serológicos para la detección de anticuerpos frente a los virus (Simons y Mushahwar, 1996). Se han diseñado técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos frente a proteínas recombinantes de las regiones NS3/4 y NS5, expresadas en *E. coli*. Sin embargo, estos ensayos han resultado poco sensibles y específicos, ya que parece existir una reactividad cruzada entre los virus GBV-A, GBV-B y GBV-C, al igual que ocurre

con otros miembros de la familia *Flaviviridae* (Simons y Mushahwar, 1996).

La prevalencia de la infección por VHG / GBV-C en la población general es por el momento desconocida, pero estudios realizados en donantes de sangre sanos demuestran una prevalencia de ARN-VHG determinada por RT-PCR entre 0,9 y 4,7% (Tabla 2). Simons y Mushahwar (1996) demostraron positividad para GBV-C en un 1,3% de donantes sanos con ALT normal, frente a un 5,6% en donantes con ALT elevada. En donantes remunerados, esta positividad fue mayor (12,9%). Heringlake y cols. (1996a) realizaron un estudio de prevalencia de GBV-C en pacientes con fallo hepático fulminante en Alemania, empleando como grupo control donantes sanos con ALT normal seleccionados aleatoriamente, demostrando la presencia de ARN-GBV-C en el 4,7%.

Linnen y cols. (1996) estudiaron una población de 779 donantes de sangre voluntarios con ALT normal, demostrando que un 1,7% eran positivos para ARN-VHG. Paralelamente, detectaron un 1,5% de positividad para el mismo virus en una población de 709 donantes que habían sido excluidos por presentar niveles de ALT elevados. La diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa.

Masuko y cols. (1996) detectaron ARN-GBV-C en el 0,9% de donantes sanos en Japón, de los cuales un 49% tenía antecedentes de transfusión. Jarvis y cols. (1996) realizaron un estudio de transmisión del VHG por hemoderivados (factores de coagulación e inmunoglobulinas), demostrando una prevalencia de este virus en el

3,2% en una población de donantes sanos no remunerados de Inglaterra. Por último, Tameda y cols. (1996) demostraron en 326 donantes sanos de Japón una frecuencia de infección por el VHG del 0,9%.

Autor	Nº pacientes ALT normal	% ARN-VHG ALT normal	Nº pacientes ALT elevada	% ARN-VHG ALT elevada
Simons (1996)	77	1,3	71	5,6
Heringlake (1996a)	106	4,7		
Linnen (1996)	779	1,7	709	1,5
Masuko (1996)	448	0,9		
Jarvis (1996)	125	3,2		
Tameda (1996)	326	0,9		
Loiseau (1997)	500	4,2		

Tabla 2. Prevalencia de VHG / GBV-C en donantes sanos

Loiseau y cols. (1997) estudiaron la presencia del ARN-VHG por

RT-PCR en donantes de sangre y en pacientes que habían recibido derivados sanguíneos y/o inmunoglobulinas. Encontraron positividad para ARN-VHG en el 4,2% de los donantes, el 10,7% de los pacientes no inmunodeprimidos multitransfundidos, el 8,7% de los pacientes con inmunodeficiencias pero que habían recibido sólo inmunoglobulinas y el 24,7% de los trasplantados de médula ósea que habían recibido inmunoglobulinas y derivados sanguíneos celulares. Encontraron significativamente mayor positividad en pacientes inmunodeprimidos que en multitransfundidos no inmunodeprimidos.

También se ha observado una mayor prevalencia de ARN-VHG en pacientes que presentan infección por el VHC y el VHB y en general en sujetos con factores de riesgo de transmisión parenteral (ADVP, hemodializados, multitransfundidos, hemofílicos y receptores de trasplantes), lo que sugiere un mecanismo común de transmisión de estos virus (Diamantis y cols., 1997).

Simons y Mushahwar (1996) estudiaron un grupo de pacientes portadores crónicos del VHC, encontrando una prevalencia de ARN-GBV-C del 20%. En portadores crónicos del VHB fue del 16,7% y en sujetos ADVP la prevalencia fue del 10%. En pacientes politransfundidos se encontró en el 20,8% y en receptores de órganos para trasplante en el 18,8%. En todos los casos se apreciaban diferencias significativas con respecto a la prevalencia en la población general (donantes sanos).

Hadziyannis y cols. (1995) realizaron un estudio retrospectivo en pacientes con enfermedad hepática y con factores de riesgo de transmisión parenteral. Mediante RT-PCR, encontraron ARN-VHG en

un porcentaje del 18 al 33% en los pacientes con alto riesgo de exposición a sangre y productos hemoderivados, ADVP y hepatitis crónica por el VHB o el VHC.

Aikawa y cols. (1996) estudiaron sujetos ADVP con infección crónica por el VHC y detectaron ARN-VHG en un 24%, frente a un 7% en aquellos con infección crónica por VHC pero sin antecedentes de ADVP. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

En pacientes sometidos a hemodiálisis, Masuko y cols. (1996) hallaron una prevalencia de infección por GBV-C del 3,1% frente a un 0,9% en el grupo control ($p < 0,03$). Entre los pacientes que resultaron positivos para este nuevo virus, un 50% presentaba también infección por el VHC o el VHB, lo que sugería un mecanismo de transmisión común. Laperche y cols. (1997) estudiaron la prevalencia del VHG en 120 hemodializados. El 14% presentaba ARN vírico y el 15% tenía anticuerpos anti-E2, siendo la coinfección con el VHC del 54%.

En pacientes hemofílicos que recibían tratamiento con factores de coagulación, Jarvis y cols. (1996) estudiaron la prevalencia del VHG y el VHC antes y después del empleo de métodos de inactivación vírica en los productos obtenidos de múltiples donantes de sangre. Demostraron la presencia del VHG en el 14% del grupo estudiado antes del tratamiento de inactivación frente a un 6% en el grupo postratamiento. Sólo hallaron un caso de infección por el VHG aislado, ya que en el resto existía coinfección con el VHC. El VHC fue detectado en el 83% previo al tratamiento de inactivación y no encontraron ningún caso en los pacientes que habían recibido factores

de coagulación tratados con los métodos de inactivación vírica.

1.2.3.2. Hepatitis aguda y fallo hepático fulminante

Este virus se ha relacionado hasta en un 14%, con cuadros de hepatitis aguda esporádica de etiología no filiada (Hadziyannis y cols., 1995; Linnen y cols., 1996; Alter y cols., 1997). En los primeros estudios sobre fallo hepático fulminante, el VHG representaba el 50% de los casos (Tibbs y Williams, 1995), no obstante, posteriormente se observó una prevalencia del 4,7% (Heringlake y cols., 1996a). En general se admite que en el fallo hepático fulminante la presencia del VHG es mayor que en la población sana, explicando este incremento por el uso de sangre o derivados sanguíneos contaminados (Moaven y cols., 1997; Halasz y cols., 1999). Tanaka y cols. (1997) estudiaron 48 casos de fallo hepático fulminante, concluyendo que el VHG no causa hepatitis graves. Sin embargo, Inoue y cols. (1999) relacionaron tres casos de fallo hepático fulminante de etiología desconocida con el VHG.

1.2.3.3. Hepatitis crónica, cirrosis, carcinoma hepatocelular y otras hepatopatías

Se ha demostrado la presencia del VHG en pacientes con hepatitis crónica criptogénica y cirrosis hepática. En ellos la prevalencia del VHG es mayor que en los donantes sanos. Así, en la hepatitis crónica NANC oscila entre un 3 y un 27% (Hadziyannis y cols., 1995; Heringlake y cols., 1996b, Guilera y cols., 1997). El VHG en las hepatitis autoinmunes es variable: hay autores que no lo detectaron (Berg y cols., 1997), en cambio otros demostraron una prevalencia

similar a la población control de donantes sanos (Heringlake y cols., 1996b). En la cirrosis hepática la presencia del VHG es de alrededor del 7% (Jeffers y cols., 1995). Tsutsumi y cols. (1996) estudiaron un grupo de 80 pacientes alcohólicos con diversos grados de afectación hepática y sin infección por el VHB ni por el VHC, encontrando el VHG en sólo 3 pacientes con fibrosis hepática, concluyendo que el VHG no está relacionado con las lesiones producidas por el alcohol.

Como se describe anteriormente, la prevalencia en pacientes con infección crónica por VHC y/o VHB es mayor que en donantes sanos. Se han realizado diversos estudios que demuestran esa coinfección y que avalan la hipótesis de una ruta común de transmisión.

Simons y Mushawar (1996) encontraron el VHG en el 20% de un grupo de pacientes portadores crónicos de VHC y en el 16,7% del grupo de portadores crónicos de VHB. Quintero y cols. (2000) determinaron el ARN-VHG en 180 pacientes con hepatitis crónica C (HCC), demostrando una prevalencia del 12,2%, no existiendo diferencias significativas en el grado de lesión hepática entre el grupo coinfectado y no coinfectado, lo que demuestra que el VHG no aumenta la patogenicidad del VHC. En pacientes con ALT aumentada con causa desconocida y con lesiones hepáticas poco importantes se ha detectado una prevalencia del 13% (Sarrazin y cols., 1997). También se han estudiado los pacientes con porfiria cutánea tarda (Lamoril y cols., 1998), observándose una prevalencia del VHG similar a la de los donantes de sangre, no relacionando este virus con la enfermedad. En un estudio retrospectivo en pacientes con enfermedad

hepática y con factores de riesgo de transmisión parenteral (Hadziyannis y cols., 1995), el ARN VHG fue detectado entre el 18 y el 33%.

Se constata una pobre asociación del VHG con el carcinoma hepatocelular, 6% de 213 pacientes (Kubo y cols., 1997). Similares resultados obtuvieron Tagger y cols. (1997), 4,7% de 170 pacientes. Dos estudios multicéntricos europeos confirman el escaso impacto del VHG en la carcinogénesis hepática: así Bréchet y cols. (1998) detectaron el ARN-VHG en el 7%, frente al 19% de VHB y el 40% de VHC; para Hadziyannis y cols. (1997) el VHG tiene un escaso papel en el carcinoma hepatocelular confirmando el mayor impacto que sobre esta patología tienen el VHB y el VHC.

1.2.3.4. Prevalencia del VHG en pacientes trasplantados

La prevalencia en trasplantados hepáticos oscila entre el 30 y el 44% (Belli y cols., 1996; Haagsma y cols., 1997). Es posible que influya la inmunosupresión y la administración de derivados sanguíneos contaminados como consecuencia de los altos requerimientos transfusionales de estos pacientes. No existen suficientes evidencias que hagan pensar que este agente desempeñe un papel importante en la evolución del injerto, ya que no se han demostrado diferencias en la supervivencia en los infectados por el VHG, e incluso hay autores que hablan de un posible efecto beneficioso en pacientes coinfectados con el VHC al disminuir la replicación de este virus y retrasar la reinfección del injerto (Poutous y cols., 1996).

1.2.3.5. Prevalencia en otras enfermedades

Se ha demostrado una prevalencia en linfoma no-Hodgkin de bajo grado del 16,3% (Ellenrieder y cols., 1998), lo que sugiere la posibilidad de que el VHG tenga alguna acción patológica fuera del hígado. En pacientes multitransfundidos por presentar enfermedades hematológicas malignas, Neilson y cols. (1996) detectaron el ARN-VHG en un 47% de los casos. Muchos de estos pacientes también habían sido sometidos a trasplante de médula ósea. El número de transfusiones recibidas fue similar en el grupo que había adquirido la infección y en los que se mantenían VHG negativos. En ningún caso detectaron aumento de ALT. La alta frecuencia de infección por el VHG apoya la hipótesis de que la inmunosupresión inducida por el trasplante de médula ósea supone un mayor riesgo de contraer la infección a través de transfusiones sanguíneas. Se ha intentado relacionar el VHG con casos de anemia aplásica post-hepatitis, pero los datos no son definitivos (Kao y cols., 1996).

1.2.3.6. Mecanismo de transmisión

➤ Transmisión parenteral

Los primeros estudios sobre los GBV, en los que se transmitía la infección a tamarinos mediante la inoculación de suero de pacientes con hepatitis aguda, ya sugerían una transmisión por vía parenteral de estos agentes (Parks y cols., 1969).

La posterior caracterización del GBV-C/VHG y el desarrollo de técnicas de diagnóstico (RT-PCR) (Linnen y cols., 1996; Schlueter y cols., 1996) ha permitido la realización de estudios epidemiológicos que

han apoyado la hipótesis de la transmisión parenteral del virus. El ARN del VHG ha podido ser detectado en sangre, por lo que, si existe viremia, es lógico pensar que el virus pueda transmitirse a través de la transfusión de sangre y hemoderivados. Los estudios realizados hasta el momento en pacientes de riesgo de contraer infecciones que se transmiten por vía parenteral ponen de manifiesto una mayor incidencia de infección por el VHG. Así, se han estudiado grupos de pacientes con HPT, receptores de transfusiones, con hemofilia, con inmunodeficiencias que reciben inmunoglobulinas, que requieren hemodiálisis y ADVP (Tabla 3). En todos ellos, la incidencia de infección por el VHG es significativamente mayor que en controles sanos.

Es también frecuente la coinfección con otros virus que se transmiten por vía parenteral, sobre todo con el VHC (Madejón y cols., 1997; Pessoa y cols., 1998; Radkowski y cols., 1998a; Brandhagen y cols., 1999; Laras y cols., 1999). Linnen y cols. (1996) realizaron un estudio prospectivo para determinar la frecuencia de infección por VHG en pacientes con HPT de etiología no determinada. Estos autores observaron 12 casos de hepatitis NANE, en 3 de los cuales pudo demostrarse infección por el VHG. En ninguno de ellos se detectó el virus antes de la transfusión. El estudio del suero de los donantes pudo realizarse en dos de los casos, y en ambos se puso de manifiesto la infección por el VHG.

Wang y cols. (1996) realizaron un estudio retrospectivo para analizar la infección por el VHG en 400 pacientes sometidos a cirugía cardíaca que habían sido transfundidos. Mediante RT-PCR pudieron

detectar ARN-VHG en el 9,8%, frente al 1,5% detectado en las muestras de estos pacientes obtenidas antes de la transfusión ($p < 0,01$). El hecho de que no pudiera identificarse otra posible vía de contagio, sugería que la infección podría haberse contraído a través de la transfusión. El único factor que parecía influir en los pacientes que habían sido infectados por este virus era el número de donantes. Los pacientes incluidos en el estudio comprendían un grupo anterior al cribado sistemático de donantes con anti-VHC y otro en el que sí se había realizado. Sin embargo, en contra de lo que cabría esperar, no encontraron diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de infección por el VHG antes y después del cribado (8,8% frente a 8%).

Según otros autores parece evidente la transmisión del virus a través de transfusiones. Así, Schmidt y cols. (1996) estudiaron dos pacientes que habían recibido transfusiones de diferentes donantes. Las muestras obtenidas antes de recibir la sangre fueron negativas para el VHG, pero eran positivas tras la transfusión. Además, estudiando muestras de sangre de los donantes, fue posible detectar el VHG en dos de ellos, demostrando una identidad de secuencias entre ambos virus del 100% y 98% respectivamente. Esta elevada homología sólo se había observado en diferentes muestras de un mismo paciente, mientras que la identidad de fragmentos de pacientes no relacionados era del 93%. Todo ello sugería que el virus se transmitió desde el donante al receptor a través de la transfusión.

Salmerón y cols. (1999) estudiaron el suero de 140 pacientes que habían sido transfundidos, encontrando ARN-VHG en 12 casos (8,6%), de los cuales 5 (42%) presentaban un moderado aumento de

ALT, y los 9 restantes (58%) tenían ALT normal. El estudio de las muestras basales de estos pacientes demostró la presencia de ARN-VHG en 5 pacientes (3,6%). Es decir, sólo en 7 pacientes (5%) la infección por el VHG pudo ser atribuída a la transfusión. Ninguno de los infectados presentó criterios de HPT y la evolución fue favorable con normalización de las transaminasas al final del seguimiento.

Otro grupo de riesgo para infección por VHG lo constituyen los pacientes que reciben hemoderivados, como concentrados de factores de coagulación e inmunoglobulinas, sobretodo teniendo en cuenta que para su obtención se utiliza plasma de numerosos donantes. Además, la mayoría de estos pacientes padecen algún tipo de inmunodeficiencia, bien de forma primaria o como consecuencia de la infección por VIH.

Jarvis y cols. (1996) encontraron una baja incidencia de infección por el VHG en hemofílicos (14%) y en pacientes que habían recibido inmunoglobulinas (7%), en comparación con la incidencia de infección por el VHC, que es prácticamente universal en los pacientes que recibieron concentrados de factores de coagulación que no habían sido sometidos a métodos de inactivación vírica. Estos autores sugieren que es probable que los dos virus sean igualmente infecciosos, pero que la infección por el VHG es eliminada más fácilmente por el organismo.

Para explicar estas discordancias se basan en las diferencias estructurales que existen entre ambos virus. El VHC, de forma parecida al VIH, presenta una envoltura glucoprotéica que lo protege del ataque

del sistema inmune, además de la presencia de una región hipervariable en el gen de la proteína de envoltura E2. Ninguno de estos dos mecanismos está presente en el VHG, que sólo tiene 4 aminoácidos potencialmente glucosilables en su envoltura, frente a los 15 que posee el VHC. Además, no existe evidencia de región hipervariable en su genoma. Otra posibilidad es que la proteína del core del VHG, que no ha sido identificada, le impida la producción de partículas víricas completas infecciosas.

Tagariello y cols. (1996) estudiaron pacientes hemofílicos, encontrando un 6% de positividad para el VHG, en la mayoría de los cuales había también infección por el VHC. Masuko y cols. (1996) analizaron la prevalencia de la infección por el VHG entre los pacientes sometidos a hemodiálisis, que tienen una alta tasa de infección por otros virus de transmisión parenteral como el VHB y el VHC. Encontraron un 3,1% de pacientes en los que podía detectarse ARN-VHG. El 75% de estos pacientes tenía antecedentes de transfusión. En el 50% había también infección por el VHB y el VHC, lo que sugiere que todos estos virus comparten la misma vía de transmisión. Ninguno de los pacientes infectados por el VHG tenía evidencia de enfermedad hepática, es decir, los valores de ALT eran normales, salvo que coexistiera con el VHC. En el seguimiento a lo largo de un periodo de tiempo comprendido entre los 7 y los 16 años pudo comprobarse la persistencia de la viremia. En uno de los pacientes que no tenía antecedentes de transfusión el ARN-VHG aislado era prácticamente idéntico al de otros dos que sí lo tenían. Esto sugiere otras vías de transmisión persona-persona.

También se ha estudiado la prevalencia de infección en otros grupos de riesgo de infecciones transmitidas por vía parenteral, como es el caso de los ADVP. Así, Aikawa y cols. (1996) estudiaron un grupo de estos sujetos, encontrando una prevalencia de la infección del 33%, y al igual que otros autores (Masuko y cols., 1996; Tagariello y cols., 1996) observaron la frecuente coinfección con el VHC.

GRUPO DE RIESGO	AUTOR	% VHG
HPT	Linnen (1996)	25
MULTITRANSFUNDIDOS	Wang (1996)	9,8
	Salmerón (1999)	6,5
	Neilson (1996)	47
HEMOFÍLICOS	Jarvis (1996)	14
	Tagariello (1996)	6
INMUNODEFICIENCIAS	Jarvis (1996)	7
HEMODIALIZADOS	Masuko (1996)	3,1
ADVP	Aikawa (1996)	33

Tabla 3. VHG en grupos de riesgo parenteral

➤ Transmisión vertical

Durante el embarazo la transmisión de agentes infecciosos desde la madre al feto ha sido documentada por numerosos autores. La barrera placentaria evita la comunicación directa entre la sangre materna y fetal, pero el inicio de las contracciones uterinas en el

momento del parto puede favorecer la comunicación entre ambas circulaciones. El contagio puede ocurrir también en el canal del parto o incluso tras el alumbramiento, a través de la lactancia materna. En el caso del VHB, se ha descrito la existencia de pequeñas comunicaciones placentarias que pueden ser la vía de adquisición de la infección intrauterina (Lin y cols., 1987). Este mismo mecanismo puede aplicarse a otros virus como el VHC, el VHG y el VIH-1. La transmisión del agente vírico de la madre al hijo dependerá de la virulencia del germen, la carga vírica y la ruta de contagio (transplacentaria o por lactancia materna).

Se han realizado pocos estudios para tratar de demostrar la transmisión vertical del VHG. Feucht y cols. (1996) analizaron el ARN-VHG en un grupo de 61 embarazadas, la mayoría con factores de riesgo de transmisión parenteral y observaron que el 14,8% resultaron positivas para el VHG (la mayor parte con antecedentes de ADVP). Realizaron un seguimiento de los niños tras el nacimiento mediante determinaciones del VHG, VHC y VIH-1 mediante RT-PCR cada 3 meses. Se observó que 3 niños (33,3%) estaban infectados por el VHG, siendo en un caso la madre portadora del VIH-1 y en otro del VHC. No se demostró co-transmisión de los 2 virus. Ninguno de los niños seguidos durante una media de 13 meses desarrolló ictericia ni signos bioquímicos de hepatitis.

Lin y cols. (1996) realizaron un seguimiento de 3 embarazadas en las que se había demostrado infección por el VHG. Ninguna de ellas era VIH-1 positiva, y una tenía además infección por el VHC. En todos los casos se realizó el parto mediante cesárea. Durante más de 12

meses se siguió a los niños y en ningún caso se demostró la presencia de ARN-VHG.

Powlostsky y cols. (1996) demostraron infección por el VHG en el 21,3% de un grupo de 61 embarazadas que padecían hepatitis crónica por VHC. Ninguno de los niños nacidos presentó infección por el VHC, mientras que 3 resultaron infectados por el VHG, demostrándose viremia hasta al menos 12 meses después del parto. En un niño se detectó el VHG a los 9 meses, lo que sugiere la existencia de otras vías de transmisión del virus en el contacto madre-hijo.

Mediante secuenciación del virus y análisis filogenético, Bourliere y cols. (1997) comprobaron la similitud entre las secuencias víricas de las madres y sus hijos, estudiando un grupo de mujeres embarazadas que presentaban coinfección por el VHC. El riesgo de transmisión del VHG observado fue del 60% y parece ser independiente de la transmisión del VHC.

Ruiz Extremera y cols. (1998), estudiaron 129 neonatos que habían recibido transfusiones sanguíneas durante su ingreso en la UCI de Pediatría, encontrando diez pacientes (7,7%) positivos para el ARN-VHG; 8 varones y 2 niñas. En todos estos pacientes se estudiaron las madres y los donantes mediante RT-PCR. Concluye que en 8 pacientes el mecanismo de transmisión fue parenteral y en 2 (18,2%) vertical, ya que se demostró la existencia de viremia en las madres, mientras que los donantes fueron negativos para ARN-VHG. En un estudio posterior estos mismos autores (Ruiz Extremera y cols., 1999)

encuentran una prevalencia de transmisión vertical del VHG de un 62%. En este estudio se incluyeron 13 mujeres con coinfección por VHC y VHG y en 8 casos se encontró el VHG en el hijo. Sin embargo, todas las muestras de leche estudiadas fueron negativas para ARN-VHG.

De estos trabajos podemos deducir que el VHG puede transmitirse de forma vertical de madre a hijo, al igual que otros agentes víricos transmitidos a través de la sangre. Esta transmisión es menos frecuente en poblaciones de bajo riesgo, como sugieren Lin y cols. (1996). Como cabría esperar, es más frecuente el contagio cuando el parto se realiza por vía vaginal que cuando se practica la cesárea. Finalmente, Feucht y cols. (1996) sugieren que el VHG se transmite con más frecuencia durante el embarazo o el parto que otros virus estudiados, como el VHC y el VIH-1.

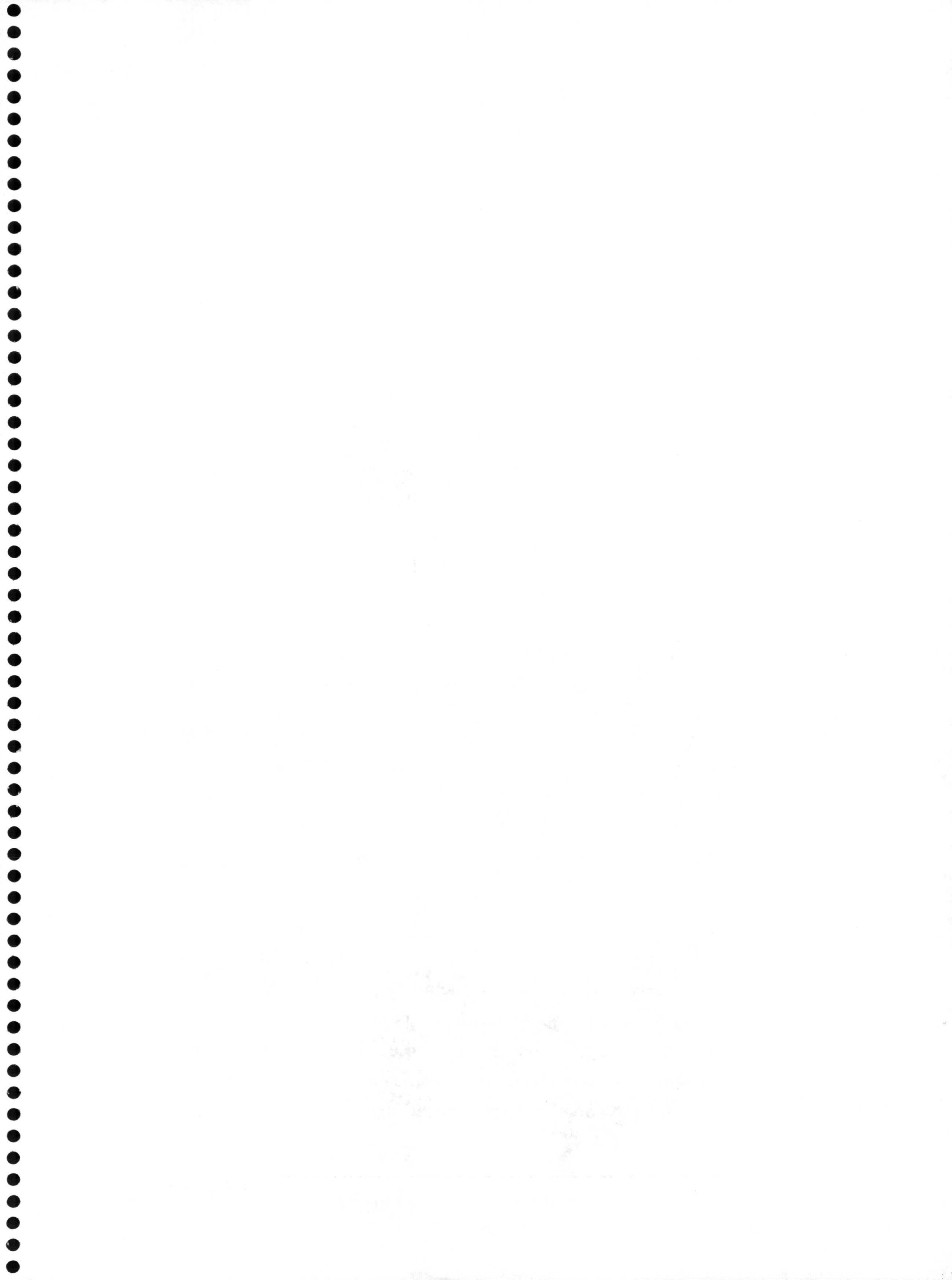
➤ **Transmisión sexual**

Persico y cols. (1995) observaron la frecuente coinfección por el VHC y el VHG en pacientes ADVP. Estudiando la presencia de ARN de ambos virus en distintas fracciones del semen comprobaron una positividad del VHG del 25%, mientras que no observaron en ningún caso el genoma del VHC. Por tanto, postulan que la vía sexual puede ser uno de los mecanismos de transmisión de este nuevo virus. Lefrere y cols. (1999a) también confirman una mayor prevalencia en personas con un mayor riesgo de contagio de enfermedades víricas transmitidas sexual y parenteralmente.

Estos hallazgos no coinciden con los resultados del estudio de Fabris y cols. (1997). Estos autores no detectan el ARN-VHG en fracciones del semen de pacientes con HCC coinfectados por el VHG. Sin embargo, encuentran una alta prevalencia del VHG y el VHC en saliva, por lo que sugieren el potencial papel de la misma en la transmisión de ambos virus.

➤ **Desconocido**

En el momento actual, continúa sin aclararse la posible vía de contagio en muchos casos de infección por el VHG. No se ha estudiado por el momento el papel de la transmisión intrafamiliar. Deberán realizarse más estudios para tratar de aclarar cómo se transmite este virus entre la población.



1.3. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VHG

1.3.1. DETECCIÓN DEL GENOMA VÍRICO

El diagnóstico de la infección por el VHG se basa fundamentalmente en la detección del genoma vírico, utilizando para ello técnicas de PCR, tal y como describieron Simons y cols. (1995a) y posteriormente Linnen y cols. (1996) y Schlueter y cols. (1996). Al igual que para la detección del genoma del VHC (Garson y cols., 1990), y por ser ambos virus de cadena sencilla de ARN, es necesaria la síntesis previa de una cadena de ADNc mediante RT.

La mayoría de los estudios sobre el VHG existentes hasta el momento han sido desarrollados utilizando esta técnica diagnóstica. Sin embargo, se trata de un método caro y laborioso, por lo que no es posible incluir un número elevado de pacientes. Esto impide la realización de estudios epidemiológicos para investigar la prevalencia de la infección en grandes grupos de población (Linnen y cols., 1996).

1.3.2. MÉTODOS SEROLÓGICOS

Simons y cols. (1996) utilizaron métodos serológicos basados en la detección de anticuerpos frente a proteínas recombinantes estructurales y no estructurales de GBV-A, B y C expresadas en *E. coli*.

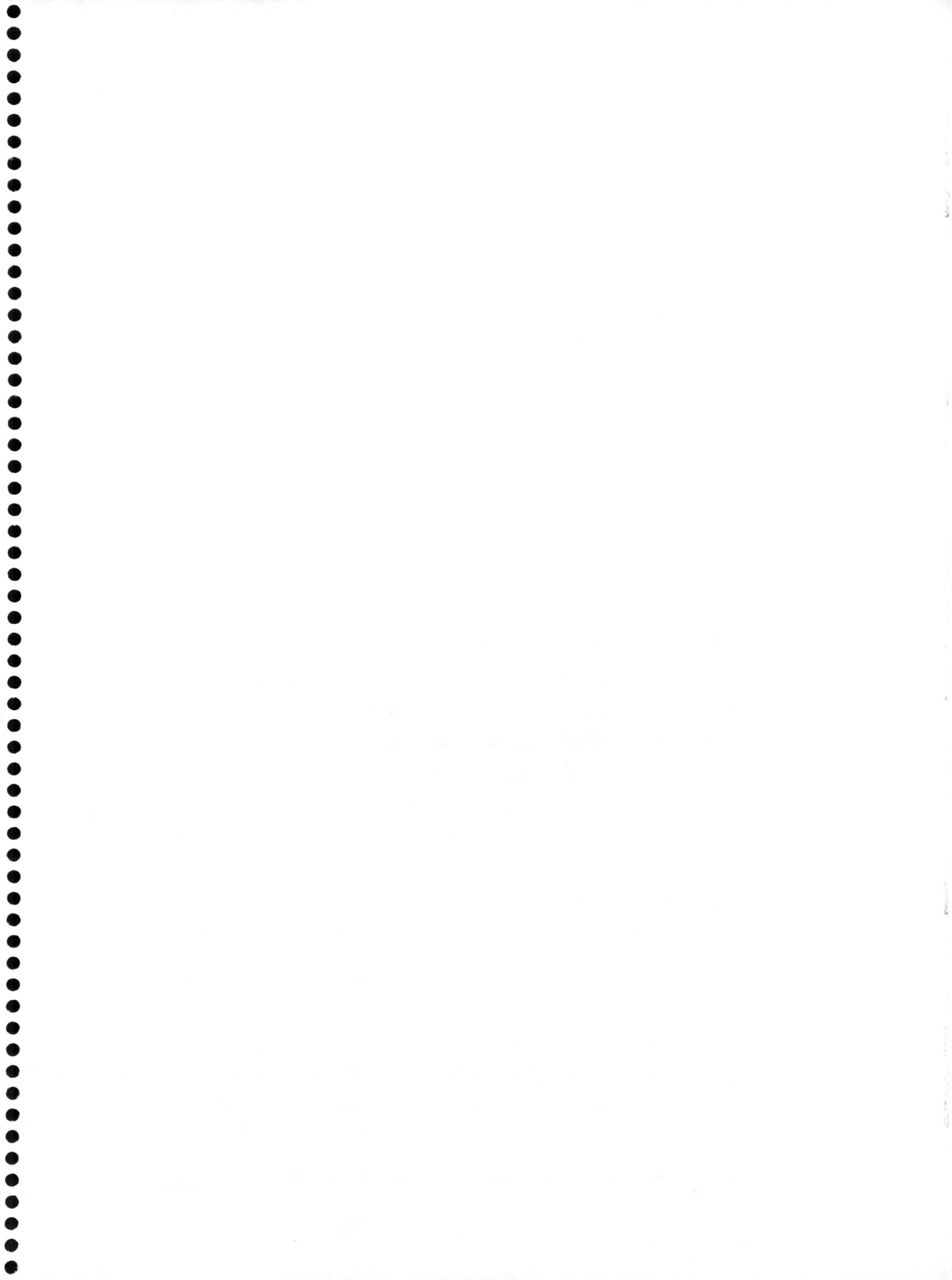
Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que parecía existir una reactividad cruzada entre los tres virus con otros miembros de la familia *Flaviviridae*.

Posteriormente, otros autores han desarrollado estudios que trataban de demostrar la utilidad de detección de anticuerpos dirigidos frente a distintas estructuras del genoma vírico. Así, Toniutto y cols. (1996) estudiaron los anticuerpos dirigidos frente a las proteínas de la envuelta o del core del VHG en 962 pacientes con o sin infección por el VHC. En los casos que resultaron positivos, determinaron posteriormente el VHG por RT-PCR, y sólo encontraron un caso en que coexistían ambos, es decir, anticuerpos y ARN-VHG, lo que sugiere que la detección de estos anticuerpos frente al VHG sólo indicaría exposición al virus, pero no sería marcador de infección activa.

Tacke y cols. (1996) realizaron un trabajo similar, determinando los anticuerpos frente a la proteína E2 del VHG. Se trata de una proteína de envoltura que se encuentra localizada en la superficie del virus, por lo que constituye uno de los primeros blancos para la respuesta inmune humoral del huésped. Los resultados obtenidos al estudiar una población de donantes y otra de ADVP son similares a los comunicados por Toniutto y cols. (1996), de forma que la escasa frecuencia con que coexisten ARN y anticuerpos hace pensar que estos últimos son un indicador de resolución de infección por el VHG. Lou y cols. (1997), Papaevangelou y cols. (1997) y Salmerón y cols. (1999), obtienen hallazgos similares con técnicas de ELISA dirigidas frente a la proteína E2.

Tillmann y cols. (1997) sugieren el carácter protector de los anti-E2. En un estudio realizado en pacientes que iban a ser sometidos a trasplante hepático comprobaron que la existencia de anti-E2 antes del trasplante suponía un menor riesgo de infección por el VHG, encontrando diferencias estadísticamente significativas.

Por último, Thomas y cols. (1998) estudian el suero de 116 pacientes ADVP durante más de 6 años, determinando el ARN-VHG y el anti-E2, y concluyen que el anti-E2 se asocia con un aclaramiento del ARN-VHG y protección frente a la reinfección. Esta podría ser la base para la obtención de una vacuna. Los escasos estudios realizados utilizando métodos serológicos para la detección de la infección por el VHG parecen indicar que no existe un marcador serológico asociado a la infección crónica, a diferencia de lo que ocurre con el VHC y el VHB. En este sentido, para el estudio de infección aguda o crónica por el VHG, se deberán emplear métodos para la detección del genoma vírico.



1.4. TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VHG

El VHG se caracteriza por su escasa patogenicidad. Quizás éste sea el motivo por el que no se han ensayado tratamientos para combatir su infección. Sin embargo, teniendo en cuenta que puede existir en asociación con otros agentes víricos de transmisión parenteral, sobre todo con el VHC, se ha observado en distintos estudios la respuesta que presenta al tratamiento con interferón (IFN). Diversos autores han demostrado la sensibilidad del VHG al tratamiento con IFN en pacientes coinfectados con VHC (Giostra y cols., 1995; Berg y cols., 1996; Capra y cols., 1997; Inoue y cols., 1997; Lau y cols., 1997; McHutchison y cols., 1997; Martinot y cols., 1997; Nagayama y cols., 1997; Orito y cols., 1997; Sáiz y cols., 1997; Enamoto y cols., 1998; Jarvis y cols., 1998; Oshita y cols., 1998; Brandhagen y cols., 1999; Shindo y cols., 1999; Quintero y cols., 2000). Sin embargo, tras la supresión del tratamiento, es frecuente la recurrencia de la infección, si bien los niveles de ALT permanecen normales cuando el VHC se mantiene negativo.

Los estudios de tratamiento realizados hasta el momento se refieren a pacientes coinfectados con otros virus, ya que el VHG por sí mismo no justifica una intervención terapéutica.

Berg y cols. (1996) observaron en su estudio que tras el tratamiento con IFN, el rango de respuestas mantenidas en los

pacientes coinfectados no fue distinto al de los pacientes con sólo VHC. El 50% de los pacientes con VHG respondieron al tratamiento con IFN- α , lo que indica que este virus es sensible. La respuesta mantenida encontrada fue del 17%, rango similar al encontrado en los pacientes con HCC. Aunque parecía existir una disociación entre la respuesta a IFN- α de ambos virus, la normalización de ALT correspondía a la respuesta del VHC. De hecho, 3 de los 4 pacientes coinfectados con respuesta mantenida al VHC con normalización de ALT mostraron viremia VHG persistente, lo que sugiere que la infección por el VHG per se no siempre induce una pronunciada respuesta inflamatoria, e incluso podría existir el portador sano de VHG.

Goeser y cols. (1997) estudiaron un grupo de 70 pacientes tratados con IFN y observaron que no había diferencias en la respuesta al tratamiento en los pacientes coinfectados por el VHC y el VHG. Aunque el ARN-VHG permaneció positivo en dos de los cinco pacientes coinfectados con VHC que respondieron al tratamiento, los niveles de ALT se mantuvieron normales durante el seguimiento, confirmando que la coinfección no afecta negativamente a la respuesta al tratamiento. Resultados similares obtuvieron Martinot y cols. (1997) en su serie de 48 pacientes coinfectados. La presencia del ARN-VHG durante la terapia o al finalizar ésta no influía en el tipo de respuesta al IFN.

Giostra y cols. (1995) estudiaron la respuesta al tratamiento de los pacientes coinfectados por ambos virus, demostrando una similar sensibilidad al IFN, si bien la recurrencia tras la supresión del tratamiento es mayor para el VHG. Otros autores obtuvieron resultados

similares a estos (Wartelle y cols., 1997; Manolakopoulos y cols., 1998).

Quintero y cols. (2000) observaron que el ARN-VHC desaparecía en el grupo de pacientes coinfectados en un 23%, mientras que el ARN-VHG lo hacía en el 55% de los casos. Al comparar la respuesta bioquímica se observaba que dependía del VHC y no del VHG, de forma que los pacientes que normalizaban los niveles de ALT eran los que eliminaban el ARN-VHC. En cambio, los que eran negativos para el ARN-VHG tras el tratamiento podían permanecer con los niveles de ALT aumentados o normales.

Enamoto y cols. (1998) estudiaron 149 pacientes con hepatitis crónica por el VHC que habían recibido tratamiento con IFN. Determinaron el ARN-VHG y el anticuerpo anti-E2 antes del tratamiento y encontraron 8 pacientes (5%) en los que estaba presente el ARN-VHG, 72 (48%) eran positivos para el anti-E2 y 4 (3%) presentaban tanto el ARN-VHG como el anti-E2. No hubo diferencias con respecto a la edad o las características clínicas e histológicas según la presencia o no del ARN-VHG o el anti-E2.

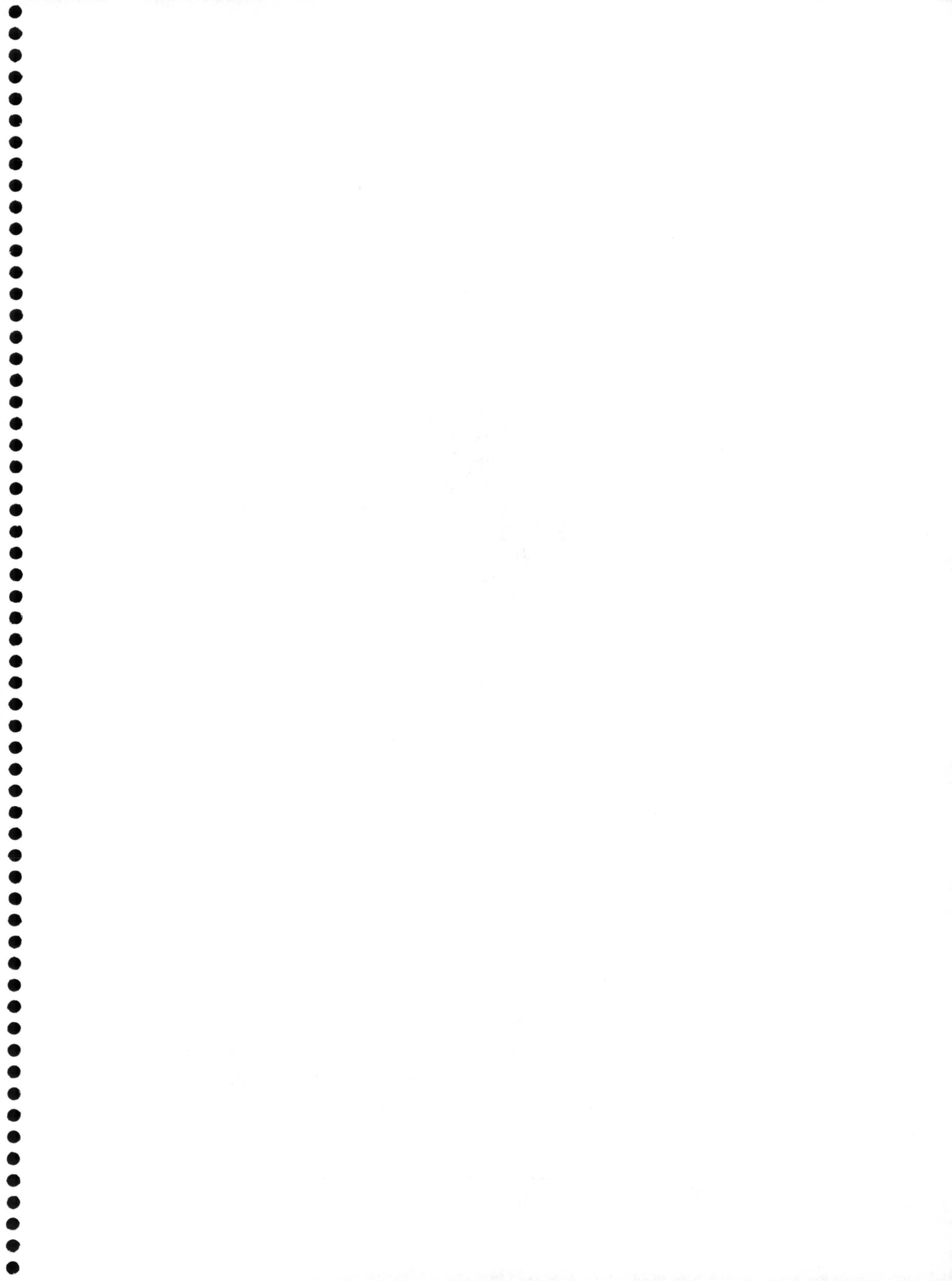
Con respecto al tratamiento con IFN se observó que los títulos de ARN-VHG en el grupo de los coinfectados disminuyeron durante el tratamiento y sólo en 4 pacientes que presentaban títulos bajos antes del tratamiento se detectó el aclaramiento sostenido del ARN-VHG. Concluyen estos autores que la mitad de los pacientes con HCC han sido expuestos al VHG, pero en la mayoría de ellos se produce su aclaramiento. Por último, sostienen que el tratamiento con IFN es

eficaz frente al VHG y puede asociarse con anti-E2 y aclaramiento sostenido del mismo. Datos similares fueron encontrados por Inoue y cols. (1997), McHutchison y cols. (1997), Nagayama y cols. (1997), Orito y cols. (1997), Jarvis y cols. (1998) y Oshita y cols. (1998). Estos hallazgos vuelven a confirmar que el VHG no afecta ni a la historia natural ni a la respuesta al tratamiento con IFN. El VHG responde al tratamiento con IFN, pero su respuesta es comparable a la del VHC aunque independiente y la coinfección no influye en la respuesta al tratamiento en pacientes con hepatitis crónica por el VHC.

López-Alcorcho y cols. (1997) comprobaron la desaparición del ARN-VHG en el suero de 3 niños con hepatitis crónica por VHB que habían sido tratados con IFN. Tras finalizar el tratamiento, se produjo la recurrencia en los 3 casos, por lo que sugieren la posibilidad de que el virus permanezca en el hígado o en CMSP.

Como ocurrió con el VHC, se han analizado los factores predictivos de buena respuesta en pacientes infectados por el VHG. Sin embargo, el escaso número de pacientes tratados dificulta la obtención de conclusiones válidas. Se ha relacionado la respuesta virológica del VHG con la carga vírica pretratamiento (igual que ocurre con el VHC). Enamoto y cols. (1998) observaron que los pacientes con una carga vírica del VHG menor que 10^3 copias/50 μ L eran los que tenían mayor probabilidad de eliminar el ARN-VHG tras el tratamiento. En el estudio de Orito y cols. (1997), los pacientes que negativizaban el ARN-VHG tenían una carga vírica inferior a 10^3 copias/mL frente a 10^7 copias/mL.

En cuanto al tratamiento con terapia combinada de IFN más ribavirina, Lau y cols. (1997) estudiaron la respuesta en un grupo de 62 pacientes con infección por VHC, de los que 10 estaban coinfectados con el VHG. No encontraron diferencias entre ambos grupos desde el punto de vista clínico, bioquímico ni histológico. Observaron que el IFN producía un descenso de la viremia del VHG, mientras que la ribavirina tenía un escaso papel.



1.5. VHG Y HEPATOPATÍA CRÓNICA POR VHC

Existe controversia con respecto al posible papel patogénico del VHG. La infección por VHG se asocia frecuentemente a la de otros virus de transmisión parenteral, y se ha demostrado una mayor prevalencia entre pacientes con alto riesgo de exposición parenteral (Berenguer y cols., 1996; Jarvis y cols., 1996; Linnen y cols., 1996; Stark y cols., 1996; Tanaka y cols., 1996; Wang y cols., 1996; Bralet y cols., 1997; Brandhagen y cols., 1999; Salmerón y cols., 1999). Se han desarrollado estudios que tratan de demostrar la influencia que puede tener la infección por VHG en la historia natural y respuesta al tratamiento de los pacientes con hepatopatía crónica por el VHC.

Diamantis y cols. (1997) estudiaron la prevalencia de infección por el VHG y el VHC en un grupo de 117 pacientes con antecedentes de ADVP; analizaron la relación entre la infección por un solo virus y la coinfección con la presencia de hepatitis crónica, distintos genotipos de VHC y duración del hábito tóxico. Encontraron una correlación inversa entre la prevalencia de infección por el VHG y la duración de la adicción a drogas, de forma que la prevalencia del VHG era mayor en los que iniciaron el hábito más tardíamente. Estos resultados podrían indicar que el VHG es eliminado del suero tras varios años de infección, aunque se desconoce de qué forma. Otra interpretación que puede darse es que después de 1980 se ha incrementado la frecuencia de infección por el VHG. La prevalencia total de infección por el VHG

fue del 35% y la mayoría de los pacientes (33%) infectados por este virus lo estaban también por el VHC. En el 75% de los casos de coinfección el genotipo del VHC fue el 3a, mientras que en los casos de infección aislada por el VHC este genotipo representaba solamente el 48%. Esto sugeriría una ruta común de transmisión de ambos virus (VHG y VHC-3a).

Estos autores (Diamantis y cols., 1997) también estudiaron la posible influencia que puede tener la infección por el VHG en la hepatopatía crónica C. Se basaron en parámetros bioquímicos (ALT), ya que no realizaron estudio histológico. Así, observaron que el número de pacientes con elevación de ALT no era significativamente diferente entre los pacientes coinfectados con respecto a la infección aislada por el VHC; esto puede indicar que el VHG no modifica la historia natural de la infección por el VHC. Además observaron niveles mayores de ALT en un porcentaje alto de casos con VHC aislado, sobretodo con VHC-3a, aunque no encontraron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados podrían indicar una interacción entre los dos virus, como se ha comprobado con otros virus de hepatitis (Liaw, 1995).

En el estudio de Goeser y cols. (1997) se incluía una serie de 70 sujetos ADVP y VIH negativo, de los cuales el 70-85% eran positivos para el VHC. En el 26% existía coinfección con VHG, porcentaje similar al encontrado por Aikawa y cols. (1996) en Japón y Hadziyannis y cols. (1995) en Grecia en pacientes ADVP. Estudiaron la influencia tanto clínica como histológica del VHG en la hepatopatía crónica por el VHC. Desde el punto de vista clínico no parecían existir diferencias con

respecto al grupo de pacientes con infección aislada por el VHC, y desde el punto de vista histológico existía incluso una mayor frecuencia de hepatitis crónica activa, con mayor grado de fibrosis y cambios cirróticos en los pacientes sin el VHG. Este hecho fue atribuido a la mayor duración de la infección en los pacientes VHG negativo. Los resultados obtenidos por Goeser y cols. (1997) sugieren que el VHG no provoca enfermedad hepática en los pacientes coinfectados. Estos hallazgos fueron similares a los obtenidos por Berenguer y cols., (1996) en pacientes que sufrían reinfección VHC / VHG tras el trasplante hepático, que no presentaban una mayor actividad histológica.

El VHG y el VHC son virus ARN que se replican en el citoplasma celular, de forma que los productos de uno de ellos pueden interferir en la replicación, la expresión o el tráfico intracelular de las proteínas víricas del otro, como se ha observado en la coinfección del VHC con el VHB y el VHD (Liaw y cols., 1992; Liaw, 1995). También se ha podido observar una influencia del VHG sobre la progresión de la enfermedad por VIH, haciendo que ésta sea más lenta en pacientes coinfectados (Lefrere y cols., 1999b).

Sin embargo, Goeser y cols. (1997) no encontraron diferencias significativas en el título de ARN-VHC de los pacientes con o sin VHG, por lo que parece probable que los dos virus coexisten sin interferirse mutuamente.

Martinot y cols. (1997) estudiaron la influencia de la infección por el VHG en el curso de la HCC, así como la relación entre los niveles séricos del ARN-VHG y la respuesta al tratamiento. Para ello

estudiaron 228 pacientes con HCC demostrada histológicamente, que habían recibido tratamiento con IFN- α . En ellos determinaron la concentración del ARN-VHC y del ARN-VHG así como el genotipo del VHC. Encontraron una tasa de coinfección del 21%. Con respecto a la vía de contagio, los pacientes con antecedentes de ADVP eran positivos para el ARN-VHG más frecuentemente (32%) que aquellos con antecedentes de transfusión (18%) o que aquellos sin riesgo conocido (17%). El nivel medio de concentración del ARN-VHG en suero era de $3,3 \times 10^7$ copias/mL, mientras que el del ARN-VHC era de $3,0 \times 10^6$ copias/mL.

Cuando compararon el grupo de los coinfectados frente al de los no coinfectados comprobaron que no existían diferencias con respecto a la edad, duración de la infección, niveles de transaminasas o lesión histológica. Por otro lado, los pacientes con infección por el VHG presentaban con más frecuencia el genotipo 3a del VHC (44%) que aquellos que eran VHG negativo (22%), coincidiendo con los resultados de Diamantis y cols. (1997). En relación con la concentración del ARN-VHG ésta era significativamente mayor en los pacientes menores de 40 años y significativamente menor en los pacientes que presentaban un mayor índice de actividad histológica. No existía relación entre los niveles del ARN-VHG y las transaminasas.

Berg y cols. (1996) estudiaron un grupo de 115 pacientes con HCC demostrada por elevación de ALT e histología, de los cuales un 16% presentaban coinfección con el VHG. Estos pacientes coinfectados eran predominantemente varones, con cifras de ALT menores y lesión histológica más leve que los pacientes con el VHC

aislado, aunque sin significación estadística. En el 61% de los coinfectados pudo demostrarse exposición parenteral, frente al 38% de los que tenían VHC aislado. No encontraron diferencias significativas en cuanto a la concentración del ARN-VHC, por lo que deducen que el VHG no parece interferir en la replicación del VHC. Todo ello sugiere que la infección por VHG no parece influir en la historia natural de la HCC.

Sáiz y cols. (1997) realizaron un estudio similar en un grupo de 143 pacientes con HCC en España. Investigaron la frecuencia de coinfección por el VHG, evaluando la influencia que éste tiene en la evolución clínica y en la respuesta al tratamiento con IFN. Detectaron el VHG en 8 pacientes (5,6%), en 4 de los cuales no existía exposición parenteral. Esta frecuencia era dos veces mayor que la encontrada en los donantes sanos de la misma área geográfica. Clínicamente, la mayoría de los pacientes que sólo estaban infectados por el VHG no presentaban evidencia de enfermedad hepática, mientras en los pacientes con coinfección las cifras de ALT solían estar alteradas. Aunque en los pacientes con coinfección los niveles de ALT y ARN-VHC eran mayores, no existían diferencias significativas y la histología era similar.

Estos resultados sugieren que la infección por el VHG no tiene un impacto significativo en la historia natural de la HCC, si bien estos estudios están realizados con series cortas de pacientes y deberán ser corroborados por otros trabajos. En cuanto a la respuesta al tratamiento con IFN, el porcentaje de pacientes que presentaron una respuesta transitoria o mantenida a los 6 meses de tratamiento era

similar en ambos grupos, al igual que la tasa de no respondedores, por lo que parece que el VHG no tiene influencia en la respuesta al tratamiento con IFN. Esto coincide con los resultados de otros autores (Berg y cols., 1996; Goeser y cols., 1997; Martinot y cols., 1997; Quintero y cols., 2000). Sólo observaron un caso de coinfección con respuesta mantenida; el VHC pertenecía al genotipo 3a y tenía una baja carga vírica. De estos resultados se puede deducir que los factores predictivos de la respuesta al IFN en la HCC son igualmente válidos para el caso de que exista coinfección por el VHG.

En los pacientes no respondedores existía persistencia únicamente del ARN del VHC, mientras que no observaron elevación de ALT en los pacientes en los que solamente persistía el VHG. Estos hallazgos sugieren que la elevación de ALT en los pacientes con VHG está relacionada con la simultánea replicación del VHC. El ARN-VHG se negativizó en 6 de los 8 pacientes tras 12 semanas de tratamiento y en todos ellos al final del tratamiento, si bien no puede excluirse que exista una fluctuación de la viremia.

Así, el VHG parece ser sensible al tratamiento con IFN, pero el aclaramiento sostenido sólo se observó en dos pacientes que tenían los niveles basales más bajos, de la misma forma que ocurre con el VHC.

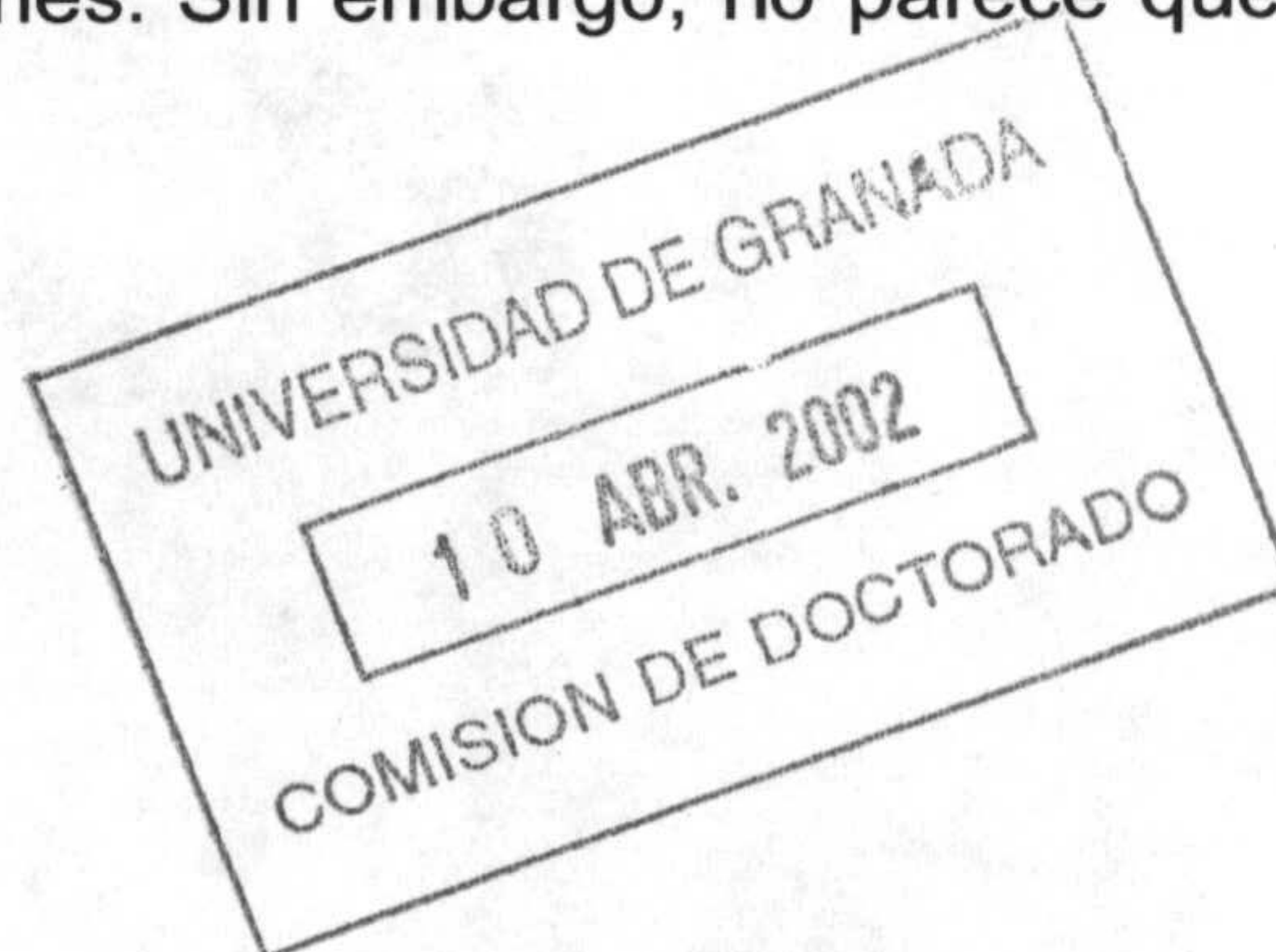
Francesconi y cols. (1997) estudiaron las características clínicas, bioquímicas e histológicas de 83 pacientes con hepatitis crónica por el VHC, encontrando 22 pacientes (26,5%) coinfectados por el VHG. Observaron, como la mayoría de los autores, que la edad

media es menor en el grupo de los coinfectados, que existe una mayor frecuencia de ADVP y una mayor respuesta a largo plazo al tratamiento con IFN. No obstante desde el punto de vista histológico encontraron una marcada esteatosis. Coincidiendo con estos autores Petrit y cols. (1998) demostraron una mayor esteatosis en el grupo de los coinfectados, con una diferencia entre ambos estadísticamente significativa. Coincidieron con el resto de los autores en que es muy improbable que el VHG cause por sí mismo hepatopatía crónica. Sin embargo, Capra y cols. (1997) obtuvieron resultados diferentes, ya que en su estudio la presencia del VHG no parecía influir en aspectos como la presencia de colestasis, esteatosis, folículos linfoides, crioglobulinemia sintomática o presencia de autoanticuerpos.

Bralet y cols. (1997) estudiaron 150 biopsias de pacientes con HCC, con una tasa de coinfección del 15%. No encontraron diferencias significativas en relación con la presencia de fibrosis, agregados de linfocitos, esteatosis ni hemosiderosis. El índice de Knodell era igual en el grupo de los coinfectados frente al de los no coinfectados. Lo que nos vuelve a confirmar el escaso poder patógeno del VHG.

Cathomas y cols. (1997) determinaron la presencia del VHG en tejido hepático de pacientes con infección crónica por el VHC, detectándolo en el 20% de los casos. No obstante, no observaron un curso más agresivo de la enfermedad en los pacientes coinfectados.

Los estudios realizados hasta el momento ponen de manifiesto la alta frecuencia de coinfección del VHG y VHC, que oscila entre 16% y 33% según las distintas series. Sin embargo, no parece que el VHG



influya negativamente en el curso clínico de la infección crónica por VHC, las lesiones histológicas ni en la respuesta al tratamiento con IFN. Probablemente la existencia de un mecanismo común de transmisión de ambos virus sea la causa de la coinfección, pero el VHG es un agente vírico con escasa patogenicidad.

1.6. REPLICACIÓN DEL VHC

Los primeros pasos de la replicación del VHC no se conocen bien, ya que aún no han sido identificados los receptores celulares para las glicoproteínas del VHC. La asociación de algunas partículas del VHC con beta-lipoproteínas e inmunoglobulinas aumenta la posibilidad de que dichas moléculas del hospedador puedan modular el anclaje del virus y el tropismo tisular. Los estudios de replicación del VHC han estado limitados durante mucho tiempo a estudios en humanos y en chimpancés inoculados experimentalmente. Por los datos obtenidos se dedujo que donde se daba una mayor replicación del virus era en los hepatocitos (principalmente durante la infección aguda) (Negro y cols., 1992). En algunos casos las técnicas de RT-PCR o hibridación *in situ* han mostrado la presencia de ARN-VHC en CMSP, incluyendo células B, T y monocitos (Bouffard y cols., 1992; Wang y cols., 1992a; Zignego y cols., 1992; Gil y cols., 1993; Nuovo y cols., 1993; Young y cols., 1993; Yun y cols., 1993; Gunji y cols., 1994; Moldvay y cols., 1994; Kao y cols., 1997; Laskus y cols., 1998a; Lerat y cols., 1998; Radkowski y cols., 1998b; Laskus y cols., 2000a; Laskus y cols., 2000b), así como en otros tejidos (Laskus y cols., 1998b; Laskus y cols., 2000b).

En la traducción y el procesado proteolítico parece tener importancia la región 5'NC del virus (Fukushi y cols., 1994) cuya estructura secundaria presenta varias horquillas. Esta región es de las más conservadas del genoma y mantiene una cierta homología con la región 5'NC de los pestivirus. Contiene múltiples ORFs cortos iniciados por AUG. Basándose en modelos informáticos y en la sensibilidad a la

digestión por diferentes ribonucleasas se han propuesto una serie de estructuras en bucle (*stem-loop*). Los resultados de diversos investigadores parecen indicar que este elemento puede funcionar como un lugar interno de entrada de ribosomas (IRES), permitiendo una iniciación eficiente de la traducción en el primer AUG del ORF largo (Fukushi y cols., 1994). Se ha propuesto que la estructura en horquilla del extremo 5' y los ORFs cortos pueden funcionar como reguladores de la traducción (Yoo y cols., 1992). La habilidad de este elemento para funcionar como IRES sugiere que el ARN del genoma del VHC carece de estructura cap en 5'.

La proteína C es la más conservada del VHC y parece ser la responsable del ensamblaje de los viriones al asociarse con el genoma de ARN para formar la nucleocápsida. Esta proteína tiene un extremo C-terminal hidrofóbico que le serviría de ancla, aunque en sistemas de expresión de laboratorio se ha observado que partículas sin ese segmento C-terminal pueden ensamblarse correctamente y dar lugar a viriones maduros. Se ha comprobado *in vitro* que la porción N-terminal tiene actividad de unión a ARN, aunque no se ha demostrado aún que dicha actividad sea específica para el ARN del VHC (Santolini y cols., 1994).

Parece que la morfogénesis inicial del virión puede ocurrir por la inclusión en vesículas intracelulares, aunque el proceso de ensamblaje y liberación del virión no se ha podido observar en sistemas de expresión. Esto parece indicar que en estos sistemas faltan o están bloqueados factores esenciales del hospedador o del propio virus. Como ocurre con los pestivirus, la formación y liberación de viriones no

parece ser muy eficiente, quedando un buen número asociado a las células. Los complejos de glicanos asociados con glicoproteínas en los viriones liberados sugieren el tránsito a través del aparato de Golgi y el movimiento de los viriones según el patrón de secreción del hospedador. Si esto es así, la permanencia intracelular de las glicoproteínas del VHC y de la formación del virión podría jugar un papel en el establecimiento y mantenimiento de las infecciones crónicas, minimizando la vigilancia inmune y previniendo la lisis de las células infectadas por virus mediante anticuerpos y complemento.

1.6.1. DETECCIÓN DE LA CADENA ANTIGENÓMICA DEL VHC

Al estar relacionado el VHC con los flavivirus (Miller y cols., 1990) debe tener un mecanismo de replicación similar al de éstos, en el que la síntesis de la cadena genómica de ARN (con polaridad positiva) se realiza utilizando como intermediario replicativo una cadena antigenómica de ARN (con polaridad negativa). Esta cadena antigenómica serviría como molde para la síntesis de nuevas cadenas genómicas (Westaway, 1987; Chambers y cols., 1990), por lo que en caso de existir replicación activa del virus se deberían detectar ambas hebras (Fong y cols., 1991; Kao y cols., 1997; Lerat y cols., 1998; Negro y cols., 1999).

Los niveles tan bajos de virus hallados en individuos infectados por el VHC y la supuesta baja tasa de replicación vírica en el hospedador y en cultivos celulares, implican que a menudo la única

forma de detectar el ARN vírico sea mediante RT-PCR. Sin embargo, el riesgo de contaminación y la falta de especificidad en la detección de la cadena de ARN son factores decisivos. Los problemas de contaminación pueden ser minimizados tomando ciertas precauciones (Kwok y Higuchi, 1989; Kwok, 1990; Sangar y Carrol, 1998). En cuanto a la detección específica de la cadena negativa, se utilizaron oligonucleótidos complementarios con esta hebra en el paso inicial de RT. Posteriormente se inactivó la reversotranscriptasa y se procedió a amplificar el ADN obtenido mediante PCR. Usando esta técnica se ha encontrado la cadena negativa en varios tejidos y en células infectadas *in vitro*. Sin embargo, en lo referente a este paso hay diferentes opiniones entre los autores. Algunos de ellos (Willems y cols., 1993; Gunji y cols., 1994; McGuinness y cols., 1994; Lanford y cols., 1995) han cuestionado la especificidad en la detección de la cadena de ARN (positiva o negativa) así como la localización intracelular de las secuencias del VHC en muestras de células, ya que si la inactivación de la reversotranscriptasa es sólo por calor, el ADNc se puede seguir sintetizando en presencia de Taq polimerasa por la actividad de transcripción en reverso de dicha enzima *in vitro*. Esto podría dar lugar a la aparición de falsos positivos. Para evitar este problema, varios autores (Willems y cols., 1994; Zignego y cols., 1995) tratan las muestras con ribonucleasas tras la inactivación por calor con el objeto de eliminar las cadenas de ARN positivo y negativo que puedan quedar en la muestra, minimizando así el riesgo de la aparición de falsos positivos.

Sangar y Carrol (1998) destacan las precauciones que hay que tener para una detección específica de la cadena antigenómica

mediante RT-PCR y demostrar así dónde se replica el virus. La aparición de falsos positivos se puede producir por errores en la unión de los iniciadores elegidos: autoiniciación, unión al azar o falsa iniciación. Para evitar estos errores se puede tratar el ARN químicamente, bloqueando los extremos 3' para que no se unan ácidos nucleicos inespecíficos. De esta forma, sólo el oligonucleótido añadido podrá ser elongado por la polimerasa. Lanford y cols. (1994) diseñaron un método llamado *tagged* RT-PCR en el que el cebador usado durante la síntesis de ADNc contenía una secuencia en el extremo 5' que no pertenecía al genoma del VHC, conocida como *tag*. Después de la RT, se hacía una PCR usando un iniciador correspondiente a la secuencia *tag* y un oligonucleótido específico para el VHC como cebador opuesto. Esta técnica mejora la especificidad aunque sigue teniendo problemas ya que debe inactivarse del todo la reversotranscriptasa y agotarse por completo el cebador. Otros autores emplean la técnica de rTth RT-PCR. En esta reacción la temperatura de la RT es más alta (70°C) e impide la unión errónea de ácidos nucleicos inespecíficos. La actividad de RT se inactiva por quelación de la enzima con Mn_2^+ y la actividad ADN-polimerasa se activa por adición de Mg_2^+ (Lanford y cols., 1994; Laskus y cols., 1997; Negro y cols., 1999).

1.6.2. CADENA ANTIGENÓMICA EN TEJIDO HEPÁTICO

Ha sido posible detectar la existencia de las dos cadenas de ARN mediante técnicas de RT-PCR y de hibridación *in situ* en

hepatocitos infectados por VHC (Fong y cols., 1991; Takehara y cols., 1992; Nouri-Aria y cols., 1993; Sherker y cols., 1993).

Si la cadena antigenómica del VHC está implicada en la replicación del virus, su presencia en hígado podría afectar a la lesión hepática, por lo que Navas y cols. (1993) buscaron esta cadena en pacientes asintomáticos y con histología hepática normal. Observaron que el ARN de polaridad negativa estaba presente en el tejido hepático de pacientes con valores de transaminasas normales y sin lesión hepática, por lo que el hecho de que haya replicación vírica no implicaría necesariamente que se produjera daño hepático. Utilizando una técnica semicuantitativa de RT-PCR específica de cadena Negra y cols. (1998a) tampoco encontraron correlación entre el nivel de ARN-VHC en suero, la concentración de cadena genómica y antigenómica en hígado y la lesión histológica en pacientes receptores de trasplante hepático. En pacientes con hepatitis crónica por el VHC, Negro y cols. (1999) usan la misma técnica semicuantitativa para determinar la concentración de ARN-VHC de cadena negativa en hígado. Observan que la concentración de ARN-VHC en suero se correlaciona con la concentración de ARN-VHC genómico en hígado, lo que concuerda con los estudios de Di Martino y cols. (1997) y Pessoa y cols. (1998), pero no hay relación entre la viremia en suero y la concentración de cadena antigenómica en hígado. Esto podría deberse a la replicación extrahepática del virus, que contribuiría a la liberación al plasma de partículas víricas con cadena de ARN de cadena positiva (Lerat y cols., 1998), aunque parece que los niveles de replicación fuera del hígado son bajos (Negro y cols., 1998b). De cualquier forma, la cadena antigenómica sólo nos da información sobre la existencia de replicación

activa del virus en el hígado, pero no sobre otros factores importantes en el desarrollo de la enfermedad, como puede ser la gravedad de la lesión histológica. El hecho de que la concentración de la hebra negativa no esté relacionada con la lesión es compatible con la hipótesis de que el daño hepático está producido por la respuesta inmunológica del paciente y no por un efecto citotóxico directo del virus sobre el hepatocito (Negro y cols., 1999). Aún así, hay autores que establecen una correlación entre la cadena antigenómica en hígado y la lesión hepatocelular (Chang y cols., 2000).

1.6.3. CADENA ANTIGENÓMICA EN HEPATOCARCINOMA

Takeda y cols. (1992) estudiaron 16 pacientes con carcinoma hepatocelular y encontraron que la cadena genómica del VHC estaba presente en tejido no canceroso en el 61% de los casos y en tejido tumoral en el 23%. La cadena antigenómica, sin embargo, sólo se detectó en tejido no canceroso de 6 pacientes y nunca en tejido tumoral. Sherker y cols. (1993) sí detectaron las cadenas genómica y antigenómica en tejido tumoral y en tejido no canceroso en el hígado de un paciente crónicamente infectado por VHC, aunque, dada la dificultad para separar el tejido no canceroso del tumoral y la capacidad de amplificación de la PCR, podría darse una contaminación del tejido neoplásico por células no tumorales que alterara el resultado (Navas, 1993).

1.6.4. CADENA ANTIGENÓMICA EN CMSP

Algunos flavivirus y pestivirus pueden infectar y propagarse en células de origen hematopoyético (Hase y cols., 1989; Nakao y cols., 1989). Esto, junto con el hecho de que otros virus hepatotropos como el VHB tengan capacidad linfotrópica (Pontisso y cols., 1984), ha propiciado que se estudiara la posibilidad de que el VHC pudiera infectar CMSP y replicarse en ellas.

Aunque algunos autores como Takehara y cols. (1992) no detectaran en su día la cadena antigenómica del VHC en CMSP ni plasma, se ha podido demostrar posteriormente en diversos estudios la presencia de las cadenas genómica y antigenómica en CMSP (Bouffard y cols., 1992; Wang y cols., 1992a; Zignego y cols., 1992; Laskus y cols., 1998a; Okumura y cols., 1998; Radkowski y cols., 1998b; Kao y cols., 1999; Laskus y cols., 2000a; Laskus y cols., 2000b), aunque no se ha demostrado de forma directa que se puedan liberar partículas víricas completas de estas células.

En el estudio de Takehara y cols. (1992) no encontraron la cadena antigenómica del VHC en ninguna de las muestras de CMSP obtenidas de 9 pacientes con hepatitis crónica por VHC. Sí encontraron la cadena genómica en todas las muestras de hígado y plasma y en 6 muestras de CMSP. Basándose en estos resultados concluyen que el VHC sólo se replica en tejido hepático, ya que sí son capaces de detectar la cadena antigenómica en hepatocitos. El método usado por estos autores para detectar ambas cadenas se basaba en una reacción de RT-PCR seguida de una hibridación con una sonda interna al

producto de la reacción de amplificación (de forma que se evitara la hibridación con los cebadores) marcada con fósforo radiactivo. Este método era menos sensible que la nested-PCR, por lo que el hecho de no detectar la cadena antígenómica podría deberse a una falta de sensibilidad de la técnica empleada.

Bouffard y cols. detectaron ARN-VHC en poblaciones de monocitos y macrófagos de pacientes infectados y Artini y cols. y Ahmed y cols. lo hallaron en linfocitos B y T (Ahmed y cols., 1991; Bouffard y cols., 1992; Artini y cols., 1992). En un estudio más reciente, Lerat y cols. (1998) son capaces de detectar las secuencias genómicas del VHC en células fagocíticas, en linfocitos B y en monocitos. En este estudio observan que los dos pacientes en los que encuentran la cadena antígenómica en linfocitos B padecen crioglobulinemia severa. La existencia de un mayor tropismo del VHC por los linfocitos B podría ser un factor que influyera en la relación entre la infección por el VHC y la crioglobulinemia, por lo que defienden que el tropismo puede tener implicaciones en el desarrollo de linfomas descritos por Minton y cols. en pacientes portadores del VHC (Minton y cols., 1994; Lerat y cols., 1998).

Zignego y cols. (1995) también demostraron la presencia de ambas cadenas en distintas poblaciones de CMSP en un estudio con 5 pacientes coinfectados por el VHC y el VIH. Al analizar las muestras de CMSP mediante nested-PCR observaron que el ARN-VHC estaba presente en todos los casos, incluyendo un paciente en el que el suero era negativo para ARN-VHC. Para determinar qué tipo de población celular era la infectada separaron las fracciones correspondientes a los

monocitos-macrófagos y linfocitos B y T. En dos pacientes aparecía ARN-VHC en todos los tipos celulares. También encontraron la cadena antigenómica en todas las muestras de CMSP y en 3 de 5 muestras de suero. En el mismo estudio observaron que tras estimular *in vitro* las CMSP con una combinación de mitógenos (fitohemaglutinina y ésteres de forbol), la señal de amplificación era más intensa, y por diluciones seriadas vieron que se incrementaba la presencia de cadenas antigenómicas en las CMSP estimuladas con respecto a las no estimuladas. Este hecho podría considerarse como una evidencia indirecta del papel de la cadena antigenómica como intermediario replicativo y la posibilidad de que se de replicación del VHC en CMSP.

En suspensiones extraídas de pacientes infectados por el VHC mediante aféresis, con células CD34+ seleccionadas, se ha podido observar la presencia de las cadenas antigenómica y genómica mediante RT-PCR (Sansanno y cols., 1998). Los datos obtenidos de estas muestras sugieren que en los cultivos de células CD34+ hay partículas víricas y que se expresa el ciclo vírico completo. Un incremento en la viremia con el paso del tiempo indica que los viriones presentes en el fluido han sido producidos y liberados por las células infectadas. Hay varias evidencias de que se lleva a cabo la replicación del VHC en este tipo de células, como son la detección de la cadena negativa de ARN por RT-PCR, la detección de ARN-VHC *in situ* en células intactas, la detección de proteínas estructurales y no estructurales relacionadas con el VHC por análisis de citometría de flujo, inmunocitoquímica e inmunofluorescencia y, finalmente, el desarrollo aparente del ciclo completo del VHC en cultivos de células CD34+. Experimentos realizados *in vitro* indican que las células de

médula ósea o CMSP no muestran anomalías morfológicas cuando se comparan con CD34+ no infectadas. Además, los porcentajes de células viables después de varios días de cultivo líquido no son significativamente diferentes entre células infectadas y no infectadas, lo que sugiere que el efecto de la infección sobre la proliferación y diferenciación de las CD34+ es pequeño o no existe. Las CD34+ incluyen células que se renuevan, por lo que pueden ser un lugar inicial de la infección, una continua fuente de virus y una forma de diseminación (Sansanno y cols., 1998).

Laskus y cols. también encuentran la cadena antigénica del VHC en diferentes subpoblaciones de linfocitos de pacientes coinfectados con el VIH-1, siendo más frecuente en monocitos/macrófagos. En estos pacientes ambos virus (VHC y VIH) se pueden replicar en el mismo tipo celular, lo que podría dar lugar a interacciones directas (Laskus y cols., 2000a).

Las CMSP podrían actuar como reservorio del VHC en casos de trasplante hepático (Feray y cols., 1992; Zignego y cols., 1992; Radkowski y cols., 1998b) o en la reactivación de la enfermedad en pacientes sometidos a terapia antivírica tras la suspensión de la misma (Qiang y cols., 1992). Qiang y cols. afirman que las CMSP son un lugar extrahepático importante de replicación vírica y que la detección del ARN-VHC en dichas células es un marcador de infección por el VHC más sensible que la detección del virus en suero, ya que en su estudio pudieron detectar el ARN-VHC en CMSP de algunos pacientes cuyo suero era negativo. En cuanto a la importancia de la presencia del genoma vírico en CMSP en la respuesta al tratamiento, deducen que

los intermediarios replicativos y el ARN-VHC genómico tienden a desaparecer con la terapia, estando relacionado el efecto del IFN sobre la infección de CMSP con los cambios en el nivel de transaminasas. La presencia del ARN-VHC genómico en CMSP tras la administración de IFN podría explicar las frecuentes reactivaciones de la infección (Qiang y cols., 1992). Aún así, la replicación en CMSP no parece ser tan importante como en hepatocitos (Kao y cols., 1997). La infección de las CMSP por el VHC puede darse en cualquier estadio del curso natural de la hepatitis crónica sin contribuir al desarrollo del daño hepático (Kao y cols., 1997), aunque esa infección del sistema inmune puede alterar la regulación de las funciones celulares normales y favorecer la cronicidad de la infección por el VHC (Lerat y cols., 1998).

Durante el curso de la infección se daría una selección de variantes del virus, ya que éste, para escapar de la presión del sistema inmune, sería capaz de presentar dichas variantes con diferente tropismo y capacidad de infectar CMSP u otros tejidos (Ahmed y cols., 1991). Varios autores han descrito la existencia de un tropismo preferencial de cuasiespecies específicas de VHC por las CMSP y otros tejidos (Shimizu y cols., 1997; Laskus y cols., 2000b). En el caso del VIH-1, se ha demostrado que la variación antigénica en la secuencia del bucle de la región hipervariable V3 de la glicoproteína de la envuelta (gp120) contribuye al tropismo por los linfocitos (Chesebro y cols., 1992; Keys y cols., 1993; McKnight y cols., 1995). Podría ser que ocurriera algo parecido con secuencias específicas de la región hipervariable (HVR-1) del genoma del VHC (Kao y cols., 1997). En 1998 Okumura y cols. clonan la región HVR-1 del VHC obtenido a partir de plasma y de CMSP de tres pacientes y analizan las secuencias

nucleotídicas. También deducen las secuencias de aminoácidos resultantes de todos los clones analizados. Comprueban que la población de VHC encontrada en CMSP es homogénea en los tres casos y que el mismo clon que aparece en CMSP es encontrado en plasma salvo en un caso. Sin embargo, en plasma aparece otro clon mayoritario que no se halla en CMSP. Uno de los factores que determinaría el tropismo vírico por los tejidos sería el proceso de entrada en la célula susceptible de ser infectada (Okumura y cols., 1998). Los resultados obtenidos por estos autores indican que sólo ciertos clones presentes en plasma pueden llegar a infectar y replicarse en CMSP. Al estudiar la región HVR-1 encontraron que algunas secuencias eran comunes en todos los clones, por lo que piensan que esta región contiene algo que determina el tropismo por las CMSP. En este estudio encontraron la cadena genómica y la antigenómica en las CMSP de todos los pacientes estudiados. En un trabajo previo Sakamoto y cols. (1995) no habían encontrado diferencias en las secuencias de la región HVR-1 en plasma y tejido hepático.

Kao y cols. (1997) detectaron en su estudio la cadena genómica en el 78% de las muestras de CMSP de 106 pacientes, mientras que el 40% tenía también la cadena antigenómica. El método empleado por ellos era muy restrictivo, con un paso de inactivación por calor y otro de degradación del ARN con ribonucleasa, por lo que descartaron la existencia de falsos positivos y defienden la existencia de replicación extrahepática del VHC. A pesar de esto, hay una cierta proporción de pacientes cuyas CMSP no están infectadas por el virus, por lo que estudiaron la posibilidad de que el genotipo condicionara su tropismo por esas células. En su trabajo no encontraron diferencias significativas

entre el genotipo 1b y el resto. Sin embargo, Lerat y cols. (1998) estudian la relación entre la presencia del VHC en CMSP y factores como la carga vírica o el genotipo y encuentran que la cadena genómica del VHC aparece tanto en pacientes con genotipo 1, como en pacientes con genotipo distinto de 1 y en pacientes coinfectados con distintos genotipos, pero existen diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los pacientes con genotipo 1 y el resto. Por el contrario, la carga vírica era comparable entre los pacientes que tenían genoma del VHC en CMSP y los que no. La cadena antígenómica era detectada en todos los grupos de pacientes, aunque con una menor frecuencia que la genómica. También había diferencias significativas entre los infectados por el genotipo 1 y el resto ($p < 0,04$), pero la carga vírica era comparable entre los pacientes con o sin presencia de cadena negativa en las CMSP. Al estudiar los genotipos presentes en CMSP de pacientes coinfectados por distintos genotipos observaron que en ningún caso detectaban ARN antígenómico correspondiente al genotipo 2, mientras que sí aparecía el del genotipo 1. Por contra, cuando se analizaba la cadena positiva sí aparecían productos específicos de ambos genotipos. Esto podría reflejar un tropismo preferencial del genotipo 1 por las CMSP comparado con el genotipo 2.

También se ha relacionado la presencia del VHC en CMSP con la transmisión vertical del virus a través del cordón umbilical como ocurre con el VHB (Shimizu y cols., 1991)

1.6.5. PRESENCIA DEL VHC EN OTROS TEJIDOS Y FLUIDOS

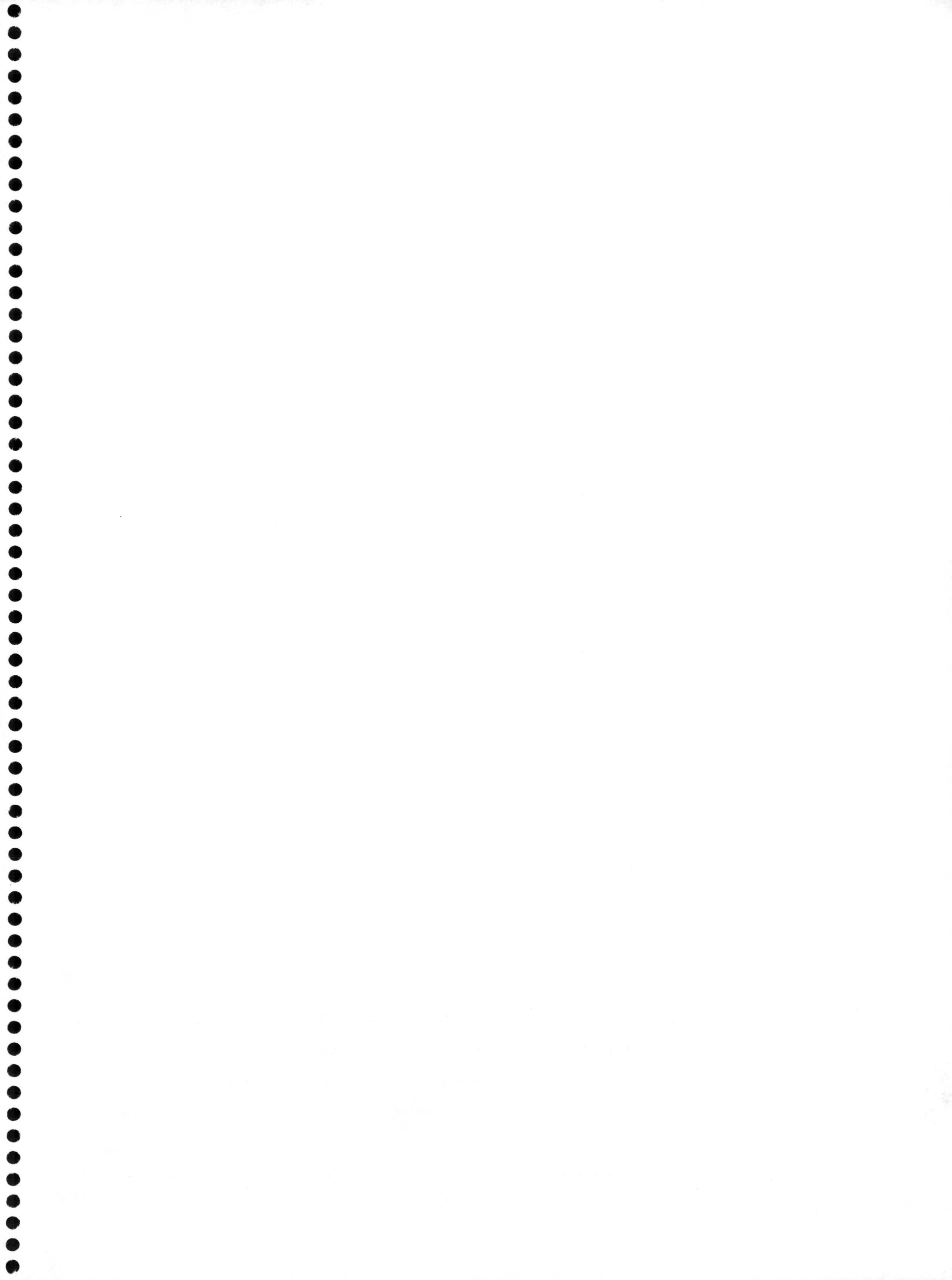
El problema al estudiar la presencia del VHC en diferentes tejidos es la dificultad de obtener muestras adecuadas. Laskus y cols. (1998b) llevaron a cabo un estudio tomando muestras de tejidos de ocho pacientes ADVP que fallecieron a consecuencia del sida. En este tipo de pacientes la infección es bastante uniforme y además, es sabido que cuando hay coinfección con el VIH la tasa vírica del VHC suele ser elevada (Sherman y cols., 1993). Laskus y cols. (1998b) analizaron muestras de hígado, médula ósea, ganglio linfático, páncreas, tiroides, glándula adrenal, riñón, pulmón, músculo esquelético, bazo y médula espinal. Pudieron detectar la cadena genómica del VHC en todos los tejidos, pero los resultados del análisis de la cadena antigenómica fueron diferentes. La presencia de esta cadena fue demostrada en ganglios linfáticos y páncreas con más frecuencia y ocasionalmente en glándula adrenal, médula ósea, tiroides y bazo, aunque los niveles de la cadena antigenómica del VHC siempre fueron más bajos que los de la genómica (Laskus y cols., 1998b). Aunque este trabajo se limita a pacientes coinfectados con VIH, sus autores demuestran que el VHC no es estrictamente hepatotropo. El hecho de que se de replicación del VHC en tiroides y en páncreas puede estar relacionado con aspectos de la enfermedad que ya han sido descritos por otros autores, como son las alteraciones tiroideas, frecuentes en pacientes con VHC tratados con IFN (Marcellin y cols., 1995), y el desarrollo de diabetes mellitus (Alison y cols., 1994; Uzunalimoglu y cols., 1995).

La mayoría de los autores no han encontrado ARN-VHC en el semen de pacientes anti-VHC positivo (Fried y cols., 1992; Persico y cols., 1995) y la transmisión por vía sexual no ha podido ser demostrada de una forma directa.

Wang y cols. detectaron ARN-VHC en saliva de 7 de 14 pacientes con ARN-VHC positivo en suero, pero 6 de estos casos daban positivo en una prueba para detectar la presencia de restos de sangre en la saliva (Wang y cols., 1992b). Fried y cols. no pudieron demostrar la presencia de ARN-VHC en muestras de saliva de 14 pacientes con ARN-VHC positivo en suero en las que no se detectó contaminación sanguínea (Fried y cols., 1992). La presencia del virus en este tipo de muestras podría relacionarse con la concentración del VHC en la sangre, de manera que tasas altas de viremia darían lugar a la exportación a diversos fluidos, y su presencia en ellos no estaría determinada por la replicación en el órgano productor del fluido en cuestión.

Otro de los fluidos más estudiados para la prevención de la transmisión del VHC es la leche materna (Ruiz Extremera y cols., 2000). Existe una cierta controversia entre autores que no detectan el ARN-VHC en este fluido y otros que sí lo hacen. Ruiz Extremera y cols. (2000) realizaron un estudio en el que incluyeron 73 hijos de mujeres anti-VHC positivo. Estudiaron muestras de leche de 35 madres y pudieron detectar la presencia de ARN-VHC en leche materna de 4 mujeres. Separaron las distintas fracciones (leche completa, sobrenadante y células) y las analizaron independientemente mediante la técnica de RT-nested-PCR, dando positivas las tres fracciones.

Hasta el momento no se conoce la implicación que este hecho puede tener en la transmisión vertical del virus y si se debe recomendar la lactancia artificial en madres ARN-VHC positivo, ya que puede suponer un gran inóculo del virus en caso de ser positiva.



1.7. REPLICACIÓN DEL VHG

La presencia de secuencias víricas en cualquier compartimento celular no puede ser considerada como evidencia de la existencia de replicación. Para poder demostrar dicha replicación hay que detectar los intermediarios replicativos. Como ocurre con el VHC, en el caso del VHG (con genoma ARN positivo monocatenario) las células en las que se esté dando replicación activa deberán tener secuencias víricas de ARN de polaridad negativa.

En 1997 Madejón y cols. estudiaron la presencia de secuencias del VHG en muestras de suero, CMSP e hígado de pacientes con hepatitis crónica producida por distintos virus (VHC, VHB y VHD) (Madejón y cols., 1997). Encontraron ARN-VHG en suero de 10/56 pacientes, pero en ninguna de esas muestras aparecía la cadena antigenómica. También analizaron 7 muestras de tejido hepático de pacientes con ARN-VHG positivo en suero y hallaron la cadena genómica en las 7 muestras y la antigenómica en 6/7. Analizaron además muestras de CMSP de estos mismos pacientes y encontraron la cadena positiva en las 7 muestras, mientras que la cadena con polaridad negativa no apareció en ninguna de las muestras de CMSP analizadas, por lo que dedujeron que el VHG puede infectar CMSP, pero no replicarse en ellas. En este estudio concluyeron que la replicación del VHG es hepática, ya que sólo encontraron la cadena antigenómica en el hígado. Además, hacían un análisis semicuantitativo de los productos de amplificación genómicos y antigenómicos y observaban que la cantidad de ARN-VHG en hígado

es mucho mayor que en plasma (como ocurre con el VHC).

Sin embargo, esta idea es rebatida por diferentes autores, ya que en otros estudios los niveles de ARN-VHG presente en plasma son elevados, mientras que la concentración de virus en muestras de hígado es bastante baja, sin haber evidencias claras de la presencia de la cadena antigenómica (Laskus y cols., 1997; Fabris y cols., 1998; Mellor y cols., 1998; Pessoa y cols., 1998; Laras y cols., 1999). En el caso del VHC se ha comprobado que la concentración vírica en el hígado es mucho mayor que en el suero, siendo este tejido el mayor lugar de replicación vírica. La cuantificación del virus en tejido hepático y su comparación con el nivel de virus en suero es una medida indirecta del hepatotropismo, por lo que si el VHG se replicara en tejido hepático, su comportamiento debería ser similar al del VHC y la concentración hepática de ARN-VHG debería ser superior a la del suero. Pessoa y cols. (1998) estudiaron tres grupos de pacientes que recibieron trasplante hepático. Uno de esos grupos tenía infección por VHC, otro por VHG y otro por VHG y VHC. Observaron que los niveles hepáticos de ARN-VHC eran significativamente más altos que los plasmáticos, mientras que con los niveles de ARN-VHG ocurría justo lo contrario. En pacientes coinfectados la razón media de niveles de ARN-VHC hígado/plasma era de 129, mientras que la razón media de niveles de ARN-VHG hígado/plasma era de 0,3. En los pacientes no coinfectados también se cumplían estas proporciones. Al comparar la concentración de ARN-VHC hepática entre los pacientes coinfectados y los no coinfectados, observaron que no había diferencias entre ambos grupos, y lo mismo pasaba con la cantidad de ARN-VHG en hígado de pacientes con y sin VHC, por lo que en ese aspecto no parecían

interferirse estos dos virus. Este hecho parece sugerir que la replicación del VHC y del VHG se da en distinto tipo celular. Según estos resultados lo más lógico es deducir que el VHG no se replica en hígado, aunque también sugieren los autores que puede replicarse a un nivel muy bajo o bien exportarse rápidamente fuera de los hepatocitos. La detección de la cadena antigenómica del VHG por Madejón y cols. (1997) podría apoyar alguna de estas hipótesis, aunque si realmente el VHG se replica en el hígado, su hepatotropismo es muy débil. En un estudio más reciente, Laras y cols. analizan muestras de suero e hígado mediante RT-PCR específica de cadena con Tth polimerasa para determinar si existe replicación del VHG y/o VHC en alguna de esas muestras (Laras y cols., 1999). No encuentran la cadena negativa del VHC ni del VHG en suero, aunque la positiva sí está presente. En hígado hallan la cadena genómica del VHG en 6/12 muestras en una concentración muy baja, a pesar de que todos los pacientes tenían niveles séricos elevados del VHG. Todas las muestras de hígado fueron negativas para la cadena antigenómica del VHG. Con el VHC los resultados fueron diferentes, ya que aparecía tanto la cadena positiva como la negativa en elevadas concentraciones. Estos niveles no se veían afectados por la presencia de coinfección con VHG. La pequeña cantidad de cadena positiva de ARN-VHG encontrada en algunos pacientes podría ser debida a contaminación de la muestra de tejido hepático con sangre, ya que es prácticamente imposible obtener una muestra completamente limpia (Theodorf y Lemon, 1997).

Otros intentos por demostrar la replicación del VHG en CMSP también han sido frecuentemente negativos (Radkowski y cols., 1998a; Zampino y cols., 1999; Kao y cols., 1999; Shindo y cols., 1999).

Radkowski y cols. encuentran la cadena genómica en 5/9 muestras de CMSP, pero no detectan la antigenómica en ninguna de esas muestras ni en suero (Radkowski y cols., 1998a). La concentración del ARN-VHG en los casos positivos era muy baja. En 7 de las muestras de CMSP detectaron ARN-VHC y observaron que la concentración era mayor que la del ARN-VHG, a diferencia de lo que ocurría en el suero, donde la cantidad de ambos virus era similar. Tampoco encontraban la cadena negativa del VHC. Sin embargo, no pueden asegurar que no hay replicación del VHG, ya que, aunque no encuentran la cadena antigenómica, la concentración de la genómica es bastante baja, y podría darse que la técnica empleada no tuviera suficiente sensibilidad para detectar la hebra negativa (que en el caso del VHC siempre aparece en concentraciones mucho más bajas que la genómica).

Zampino y cols. encuentran la cadena genómica en suero y linfocitos, pero no la antigenómica (Zampino y cols., 1999) y Kao y cols. no detectan la cadena antigenómica en CMSP y observan poca replicación en hígado, a diferencia de lo que ocurre con el VHC, del que sí encuentran cadena antigenómica en CMSP e hígado (Kao y cols., 1999). En el estudio realizado por Shindo y cols. tampoco se detecta la cadena antigenómica en suero, CMSP o hígado, pero se trataba de pacientes coinfectados con VHC que habían sido sometidos a tratamiento con interferón uno o tres años antes del estudio del VHG (Shindo y cols., 1999). Estos autores afirman que la presencia de ARN-VHG en hígado y CMSP es consecuencia de la contaminación del tejido por suero.

Dado que es obvio que el virus se replica activamente en algún

tejido, habrá que comprobar de qué tipo celular se trata. La cadena negativa del VHG ha sido detectada en muestras de médula ósea y bazo, pero no en otros tejidos analizados. Así, aunque el sitio celular específico de replicación en los tejidos positivos no ha sido identificado, el VHG parece tener diferente tropismo tisular que el VHC (Laskus y cols., 1998c).



2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO



2.1. INTRODUCCIÓN

El VHG es un virus ARN de cadena sencilla relacionado con los flavivirus que se transmite de forma parenteral. Por este motivo se asocia frecuentemente con otros virus que tienen el mismo mecanismo de transmisión, como es el caso del VHC.

El VHG se definió en un principio como hepatotropo, aunque parece que el hígado no es su principal sitio de replicación. Al coinfectar pacientes con HCC podrían darse interferencias entre el VHG y el VHC en cuanto a la distribución en el organismo, la replicación, la viremia o la evolución de la enfermedad.

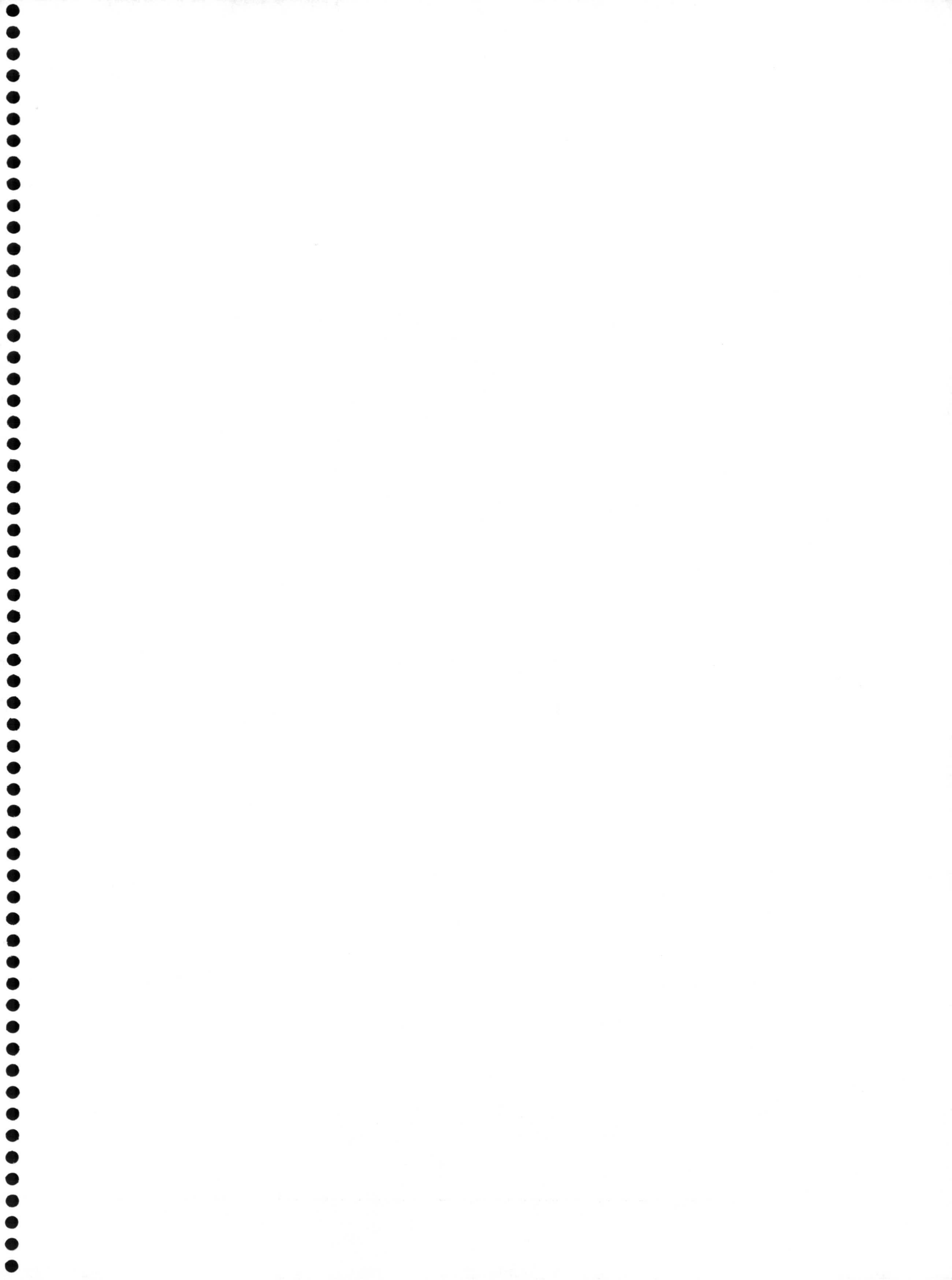
Ambos virus se replican sintetizando una cadena de ARN de polaridad negativa que posteriormente es utilizada como molde para la síntesis de cadenas positivas de ARN. De esta forma, si se pretende saber si se está dando replicación activa de un virus en concreto, se debe detectar esa cadena de polaridad negativa. Así se pueden conocer los lugares elegidos por ambos virus para su multiplicación.

2.2. OBJETIVOS

Los objetivos que se plantearon en este estudio fueron los siguientes:

1. Conocer la tasa de coinfección con el VHG de los pacientes con HCC y comparar sus características con las de los pacientes con VHC aislado.
2. Comprobar si el VHG afecta de algún modo a la distribución, replicación o viremia del VHC.
3. Conocer la localización del VHG en el organismo.
4. Comprobar el lugar de replicación del VHG y ver si hay diferencias con el VHC.

3. PACIENTES Y MÉTODOS



3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se estudiaron de forma retrospectiva los sueros congelados de 272 pacientes con infección crónica por el VHC. Todos estos pacientes habían sido estudiados en la Consulta Externa de Digestivo del Hospital Universitario "San Cecilio" de Granada entre Enero de 1991 a Junio de 1998. De estos 272 pacientes, 248 fueron sometidos a distintos protocolos de tratamiento. La edad media de los sujetos participantes fue de $39,9 \pm 12,86$ con un rango de edad entre 16 y 64 años. Eran 164 varones y 84 mujeres.

En la primera entrevista el paciente era sometido a una encuesta epidemiológica detallada (Figura 2) y a una exploración física completa.

En esa entrevista se solicitaba una analítica completa que incluía: hemograma, actividad del complejo protombínico, transaminasas (ALT, AST y GGT), fosfatasa alcalina, bilirrubina directa e indirecta, glucosa, creatinina, colesterol, triglicéridos, proteinograma, inmunoglobulinas, autoanticuerpos (ANA, AMA, AML y LKM), hormonas tiroideas, así como ELISA 3 y RIBA 3 para el VHC. De todos los pacientes se congeló suero de las muestras basales a -80°C para el estudio vírico.

DATOS DE IDENTIFICACIÓN			
NOMBRE:			
APELLIDOS:			
PROFESIÓN:			
EDAD:			
DOMICILIO:			
TELÉFONO:			
Nº Hª:			
ANTECEDENTES PERSONALES:			
INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS:	SI	NO	
TRANSFUSIONES:	SI	NO	
DROGADICCIÓN PARENTERAL:	SI	NO	
TATUAJES:	SI	NO	
HOMOSEXUALIDAD:	SI	NO	
INYECCIONES NO DESECHABLES:	SI	NO	
SI:	SI	NO	
FÁRMACOS HEPATOTÓXICOS:	SI	NO	
ALCOHOL g/día:			
ANTECEDENTES FAMILIARES:			
EXPLORACIÓN:			
ESTIGMAS DE HEPATOPATÍA:		HEPATOMEGALIA:	
OTROS DATOS DE INTERÉS:			

Figura 2: Hoja de protocolo de estudio y seguimiento.

Una vez obtenidos estos resultados se realizaba un estudio ecográfico y se sometía a los pacientes a una biopsia hepática antes de iniciar el tratamiento. Dicha biopsia era estudiada en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Granada, siempre por el mismo patólogo. Se determinó el índice de Knodell/Ishak. Las lesiones histológicas encontradas fueron: 5 lesiones mínimas (LM), 21 hepatitis crónica persistente (HCP), 93 hepatitis crónica activa leve (HCA_L), 90 hepatitis crónica activa moderada (HCA_M), 27 hepatitis crónica activa grave (HCA_G) y 9 cirrosis (Tabla 4). Además del estudio histológico, se congelaba un fragmento de tejido hepático para el estudio vírico. El día de la biopsia también se le extraía al paciente una muestra de sangre para la congelación de dos alícuotas de suero y dos de CMSP.

TIPO	N	%
LM	5	2
HCP	21	8,4
HCA _L	93	37,5
HCA _M	90	36,2
HCA _G	27	10,8
Cirrosis	9	3,6

Tabla 4. Lesiones histológicas (n= 245)

3.1.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL VHG

Se determinó la presencia de ARN-VHG mediante RT-PCR y detección por PCR-ELISA (Boehringer Mannheim) en los 272 sueros basales congelados a -80°C , con el fin de identificar los pacientes coinfectados por el VHC y el VHG. Estos pacientes coinfectados constituyeron el grupo de estudio (grupo I) y, además, se estableció un grupo con similares características en cuanto a factores epidemiológicos pero sin coinfección por VHG (grupo II) que se consideró como grupo control en el estudio de la posible interacción de ambos virus.

3.1.2. ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL VHG Y DEL VHC

En los pacientes positivos para el VHG, se analizaron las cadenas genómica y antígenómica de este virus y del VHC en muestras de suero, CMSP e hígado con el objetivo de ver dónde se estaba dando replicación activa de dichos virus. Además, se determinó la concentración del VHC en el suero basal para observar si la coinfección con el VHG afectaba de alguna manera a la viremia del VHC. En el grupo de pacientes seleccionados con VHC aislado se determinó de la misma manera la cadena genómica y la antígenómica del VHC en muestras de suero, CMSP e hígado, así como su concentración en suero. Las muestras estudiadas correspondían a la fecha de realización de la biopsia hepática.

3.2. MÉTODOS CLÍNICOS

3.2.1. BIOPSIA HEPÁTICA

3.2.1.1. Técnica

Para evaluar el tipo de lesión histológica fue necesario practicar una biopsia hepática, procedimiento que permitió obtener un fragmento de tejido hepático mediante la punción del hígado a través de la piel, con agujas especialmente diseñadas. Los pacientes fueron biopsiados en ayunas, bajo control ecográfico y sedación superficial con 2 mg I.V. de Midazolam. Se anestesiaba localmente la piel y peritoneo con Mepivacaína y, tras apertura de la piel con bisturí se obtenía el cilindro por aspiración con aguja de Menghini (Menghini, 1958) y, ocasionalmente, por escisión con aguja tipo Tru-Cut (Colombo y cols., 1988). Dicho cilindro era enviado para su estudio al Servicio de Anatomía Patológica y un fragmento del tejido era inmediatamente congelado a -80°C para el posterior análisis vírico. Las biopsias hepáticas se fijaron en formol tamponado y se incluyeron en parafina, realizándole cortes de 4 micras de espesor y tinciones de rutina (hematoxilina-eosina, reticulina, tricrómico de Gomori, Pers y Pasdiastasa) para su evaluación convencional.

3.2.1.2. Lesión histológica

Las lesiones histopatológicas se clasificaron en 4 categorías: 1) hígado normal/hepatitis mínima/fibrosis residual, 2) hepatitis lobulillar,

hepatitis crónica persistente (o hepatitis portal) (Batts y Ludwig, 1995), 3) hepatitis crónica agresiva (o hepatitis periportal) y 4) cirrosis hepática.

A cada biopsia se le aplicó, además, el índice de actividad de Knodell (Knodell y cols., 1981) y el sistema de gradación de la actividad inflamatoria y de la fibrosis de Scheuer (Scheuer, 1991).

3.2.1.3. Índice de Knodell

La lectura de la biopsia fue hecha siempre por el mismo observador aplicando criterios objetivos respecto a signos de inflamación y fibrosis portal, utilizando el índice de actividad histológica de Knodell/Ishak (Knodell y cols., 1981) que valora fundamentalmente cuatro parámetros, con distinta puntuación según la intensidad de las lesiones presentes:

Necrosis periportal-necrosis en puente.

- Ninguna
- Leve necrosis parcelar periférica (NPP)
- Moderada NPP (afecta < 50% de la circunferencia de la mayoría de los tractos portales)
- Marcada NPP (> 50%)
- Moderada NPP + necrosis en puentes (NEP)
- Marcada NPP + NEP
- Necrosis multilobular (> 2 lóbulos contiguos con necrosis panlobular)

Degeneración intralobular y necrosis focal.

- Ninguna

- *Leve (cuerpos acidófilos, balonización, degeneración y/o aislados focos de necrosis hepatocelular en < 1/3 de los lóbulos o nódulos)*
- *Moderado (1/3 - 2/3)*
- *Marcado (> 2/3)*

Inflamación portal

- *Ninguna*
- *Leve (células inflamatorias dispersas en < 1/3 de espacio porta -EP-)*
- *Moderada (aumento de células inflamatorias en 1/3 - 2/3 del EP)*
- *Marcada (denso empaquetado de células inflamatorias en > 2/3 del EP)*

Fibrosis

- *Ninguna*
- *Expansión fibrosa portal*
- *Fibrosis en puentes*
- *Cirrosis*

En este estudio el índice de Knodell está medido de forma global, sin hacer distinciones entre necrosis, degeneración, inflamación o fibrosis.

3.2.1.4. Sistema de gradación de la actividad inflamatoria y de la fibrosis de Scheuer

La actividad inflamatoria la hemos evaluado sumando la actividad portal-periportal (5 valores: 0= ausente, 1= inflamación portal, 2= necrosis erosiva (NE) leve, 3= NE moderada, 4= NE intensa) y la

lobulillar (5 valores: 0= ausente hasta 4= necrosis lobulillar intensa) (Scheuer, 1991; Villari y cols., 1992).

Para la fibrosis se han establecido 5 valores que representan el estadio de la enfermedad:

- 0:** ausente.
- 1:** EP fibróticos.
- 2:** fibrosis periportal.
- 3:** fibrosis con distorsión arquitectural.
- 4:** cirrosis probable o definida.

3.3. MÉTODOS DE LABORATORIO

3.3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

Los parámetros hematológicos se determinaron con el analizador IZASA COULTER S-PLUS JR y los bioquímicos con el analizador automático HITACHI 717 (Boehringer Mannheim), siguiendo los métodos habituales del Hospital Universitario "San Cecilio" de Granada.

3.3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.3.2.1. Separación de CMSP

La técnica se realizaba en cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las CMSP se separaron por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) siguiendo el siguiente protocolo:

Se diluían 3 mL de sangre heparinizada con tampón fosfato salino (PBS) estéril y se depositaban suavemente sobre 3 mL de Ficoll-Hypaque en un tubo de centrifuga, evitando que se mezclaran ambas fases. A continuación se centrifugaba a 690 g durante 20 minutos.

Se recogía la interfase opaca y se depositaba en un tubo nuevo con 3 mL de PBS, tras lo que se centrifugaba durante 10 minutos a 690 g. Se repetía este paso y se recogía el precipitado.

Una vez separadas las CMSP, podían usarse directamente para la extracción de ARN o podían congelarse a -80°C hasta su utilización. En nuestro caso eran congeladas para analizarlas posteriormente. Para la conservación eran resuspendidas en 1mL de medio de congelación compuesto por medio de cultivo (RPMI) suplementado con un 10% de suero bovino fetal y un 10% de dimetil-sulfóxido.

3.3.2.2. Preparación para la extracción de ARN

Dependiendo de la muestra analizada varía la preparación previa a la extracción del ARN. En todos los casos se trataba de muestras conservadas a -80°C que no se habían descongelado antes, por lo que era de suponer que el ARN estaría intacto. Además se trabajó tomando las precauciones adecuadas para evitar la degradación del ARN por contaminación de la muestra con ribonucleasas.

Para la descongelación de las muestras de CMSP se diluían inmediatamente con RPMI precalentado a 37°C y se centrifugaban a 690 g durante 10 minutos. A continuación se lavaban dos veces con PBS y una alícuota del precipitado resultante se llevaba a una cámara de Neubauer para su recuento.

En el caso del tejido hepático, la muestra se homogeneizaba en la solución de extracción (descrita más adelante) para asegurar la rotura de los hepatocitos.

Los sueros se descongelaban rápidamente y se utilizaban directamente para la extracción del ARN.

3.3.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Las muestras sanguíneas eran procesadas en la hora siguiente a la extracción. Se centrifugó la sangre separándose el suero para la posterior realización de pruebas serológicas y genómicas. Se procedió a la congelación de dos alícuotas a -80°C .

3.3.3.1. Pruebas Serológicas

En todos los pacientes se había descartado la existencia de otros agentes infecciosos productores de hepatitis. Se excluyó también la existencia de hepatitis autoinmune, mediante determinación de ANA, AML, AMA y LKM.

La selección de los pacientes antes de incluirse en protocolo de tratamiento se realizó mediante ELISA anti-VHC de tercera generación (ORTHO). La confirmación de los positivos se llevó a cabo mediante inmunoensayo recombinante (RIBA de tercera generación, CHIRON) y por la determinación del ARN-VHC por RT-PCR.

La técnica de ELISA se basa en el principio de que los antígenos o anticuerpos que se fijan a la fase sólida pueden detectarse mediante un anticuerpo o un antígeno complementario que es marcado con una enzima capaz de actuar sobre un substrato cromogénico. La detección se realiza por la aparición de un producto final coloreado.

El RIBA de tercera generación (test SIA VHC 3.0 RIBA CHIRON) es una prueba confirmatoria del ELISA 3. Detecta cualitativamente anticuerpos contra antígenos codificados por el VHC

en suero o plasma humanos. La detección de anti-VHC mediante ensayo en tira inmunoabsorbente (SIA) se basa en que poliproteínas antigénicas codificadas por el genoma del VHC son inmovilizadas sobre una membrana como soporte (Tobin y cols., 1979). La visualización se logra utilizando conjugados enzimáticos de IgG antihumana en conjunción con un substrato enzimático colorimétrico.

En el RIBA 3 se utilizan antígenos recombinantes codificados por el VHC (c33c y NS5) que derivan de las regiones no estructurales del virus, péptidos sintéticos codificados por regiones no estructurales del VHC (c100 y 5-1-1p) y el correspondiente a la proteína de la nucleocápside (c22p) como bandas individuales en las tiras de ensayo.

La reactividad de la muestra a cada antígeno se determina comparando la intensidad de la banda que corresponda al antígeno con las bandas de controles internos positivos débiles y fuertes que van incluidas en cada tira. La intensidad de la banda se valora con puntuación del 1 al 4, anotando como intensidad límite (+/-) aquella que es inferior a la de la banda de control débil (Tabla 5).

Banda no visible	-
Banda visible:	
Intensidad < a control débil	+/-
Intensidad = a control débil	+1
Intensidad > a control débil y < a control fuerte	+2
Intensidad = a control fuerte	+3
Intensidad > a control fuerte	+4

Tabla 5. Interpretación de los resultados del RIBA 3.

Se consideraba positiva (reactiva) una muestra cuando al menos se detectaban 2 de las 4 bandas con una intensidad igual o superior a 1+, en ausencia de la banda de superóxidodismutasa (SOD), presente como control de anticuerpos no específicos contra el VHC. Un resultado de RIBA es indeterminado cuando sólo existe reactividad a un antígeno o a la SOD con intensidad igual o mayor que 1+, y negativo cuando no se detecta ninguna banda.

3.3.3.2. Pruebas genómicas

◆ Extracción de ARN

Para la extracción del ARN utilizado posteriormente para la detección del VHC y el VHG utilizamos el método desarrollado por Chomzcynski en 1987 (Chomzcynski y Sacchi, 1987) con alguna modificación:

Se toman 200 μ L de la muestra y se le añaden 600 μ L de una solución de extracción compuesta por isotiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM, 2-beta-mercaptoetanol 100 mM y sarcosil 0,5%. Se agita en vórtex y se incuba 5 minutos a 4°C. Esta solución rompe los enlaces riboprotéicos y contiene inhibidores de ribonucleasas.

Se añaden 600 μ L de fenol saturado con citrato (pH 4), se agita en vórtex y se añaden 100 μ L de cloroformo. Se mezcla y se deja 15 minutos a 4°C en hielo.

Posteriormente se centrifuga 20 minutos a 14.000 g a 4°C. Se recoge la fase superior y se añade un volumen igual de cloroformo. Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones.

Se recoge la fase acuosa superior y se mezcla suavemente con un volumen igual de isopropanol, tras lo que se deja precipitando toda la noche a -20°C para que precipite el ARN.

Se centrifuga a 14.000 g a 4°C durante 30 minutos y se elimina totalmente el sobrenadante. Una vez seco el tubo, se resuspende el ARN en 12 µL de agua bidestilada estéril libre de endonucleasas.

En caso de tratarse de tejido hepático se utilizó un procedimiento similar al descrito, pero con algunas variaciones. Había que homogeneizar previamente la muestra en 450 µL de solución de extracción. A esta suspensión se le añadía un volumen igual de fenol saturado con citrato y 300 µL de cloroformo:isoamílico 49:1. A partir de este paso, las incubaciones y las centrifugaciones se desarrollaban igual que si se tratara de muestras de suero.

Cuando se trataba de ARN procedente de tejido hepático, se comprobaba el rendimiento del proceso de extracción. Para esto, se resuspendía el ARN obtenido en 10 µL de agua bidestilada y se diluían 2 µL de la suspensión en 1 mL de agua bidestilada. Se medía la densidad óptica a 260 nm (ácidos nucleicos) y a 280 nm (restos no eliminados de proteínas). El rendimiento se calculaba mediante la relación 260/280. La concentración del ARN se calculaba mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = A_{260} \times 40 = \mu\text{g/mL/dilución}$$

De esta forma, se diluía de manera que hubiera 0,5 µg/µL y se tomaban 2 µL de solución (1 µg de ARN) para la RT. Si se trataba de suero, se partía siempre de la misma cantidad de muestra (200 µL) y en el caso de las CMSP, se calculaban las células obtenidas tras la

separación mediante recuento en cámara de Neubauer y se tomaba aproximadamente un millón de células.

➤ **Determinación del ARN del VHG (Boehringer Mannheim)**

El ARN del VHG se determinó en los sueros de 272 pacientes por un ensayo comercial de RT-PCR seguida de ELISA que facilita la detección del genoma vírico.

Esta técnica se basa en la amplificación y detección de dos regiones genómicas independientes: la 5'NC y la que codifica para la proteína NS5a. La detección de estas dos regiones se llevaba a cabo en reacciones independientes de RT-PCR para obviar lo máximo posible la variabilidad del virus.

La técnica consistía en amplificar independientemente ambas regiones en presencia de digoxigenina-II-dUTP (ácido nucleico marcado). Después de la desnaturalización, el producto amplificado se hibrida con un marcador biotinilado (prueba de captura), que se unirá a una matriz bañada con estreptavidina (fase sólida: microplaca). Posteriormente se produce una inmunorreacción (o inmunoensayo) utilizando una peroxidasa marcada (anticuerpo anti-DIG). Finalmente, podemos detectar el producto amplificado mediante una reacción colorimétrica, utilizando ABTS y H₂O₂.

Cada muestra debe ser analizada para ambas regiones genómicas (NS5a y 5'NC).

◆ Preparación de la muestra:

La extracción del ARN total se ha realizado por el método del isotiocianato de guanidina, descrito anteriormente.

◆ Reacción de RT

El ADNc se sintetizó a partir de 2,5 μ L del ARN total, utilizando como mezcla de reacción la siguiente:

- Tampón de RT (propio de la enzima)
- 200 μ M de mezcla de dNTPs (Promega)
- Mezcla de hexanucleótidos (Hx mix) (Boehringer Mannheim)
- 1 unidad/ μ L de inhibidor de ribonucleasas (Boehringer Mannheim)
- 10 unidades/ μ L de M-MuLV-Reverso-transcriptasa (Promega)
- H₂O bidestilada estéril, c.s.p. 20 μ L

La RT se realizó en un termociclador Perkin Elmer-2400 con los siguientes tiempos y temperaturas:

- 10 minutos a 20°C
- 30 minutos a 42°C
- 5 minutos a 94°C

◆ **Reacción de amplificación y marcaje**

El ADNc obtenido fue amplificado por PCR. En este caso, 10 μ L del producto de la RT se utilizaron para la amplificación de la región 5'NC y otros 10 μ L para la amplificación de la región NS5a. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 30 μ L, y la mezcla de reacción consistía en:

- PCR Dig labeling mix (Boehringer Mannheim)
- Mezcla de cebadores específicos para la región a amplificar (Boehringer Mannheim)
- Tampón de reacción (propio de la enzima)
- Expand™ High Fidelity (2,6 unidades) (Boehringer Mannheim)
- H₂O bidestilada estéril, c.s.p. 30 μ L

La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer-2400, y las condiciones de reacción fueron:

- Desnaturalización, 30 segundos a 94°C
- Anillamiento, 30 segundos a 55°C
- Elongación, 30 segundos a 72°C

Se realizaron 45 ciclos de amplificación.

◆ **Detección de los productos amplificados**

La detección de los productos amplificados marcados con digoxigenina se basó en 3 pasos:

- Hibridación: unión del ADN marcado con digoxigenina con un marcador biotinilado, que a su vez se une a una matriz de estreptavidina.
- Inmunoensayo: reacción de un anticuerpo anti-digoxigenina con el producto de hibridación.
- Reacción colorimétrica: los productos que reaccionan con el anticuerpo anti-digoxigenina toman color en presencia de ABTS y H₂O₂.

◆ Interpretación de los resultados

Punto de corte (Cut off): media de la absorbancia de los controles negativos x 3 (en la mayoría de los casos alrededor de 150-250 mE). Serán positivas aquellas muestras cuya absorbancia sea mayor o igual que el cut off.

➤ **Detección específica de las cadenas genómica y antígenómica del VHC**

Para la detección de ARN-VHC se utilizó la técnica de RT-nested-PCR. Esta técnica permite detectar una pequeña cantidad de virus mediante amplificación de su material genético. En este caso se eligió un fragmento de la región 5'NC por ser una región muy conservada del genoma. El ARN se extrajo por el método anteriormente desarrollado.

Las secuencias de los iniciadores utilizados son las siguientes:

Antigenómico externo;

5'-CAT GGT GCA CGG TCT ACG AGA CC-3'

Genómico externo;

5'-GGC GAC ACT CCA CCA TAG ATC-3'

Antigenómico interno;

5'-TCG CAA GCA CCC TAT CAG GCA G-3'

Genómico interno;

5'-GGA ACT ACT GTC TTC ACG CAG A-3'

◆ **Reacción de RT**

Se toman 2 μ L de la solución de ARN obtenida y se añade una mezcla que contiene:

- Tampón de reacción (correspondiente a la enzima)
- 200 μ M de mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
- 0,5 μ M iniciador específico para la cadena que se pretende detectar
- 8-10 unidades de inhibidor de ribonucleasas (Promega)
- 2,5 unidades/ μ l de AMV-reversotranscriptasa (Promega)
- H₂O bidestilada estéril c. s. p. 10 μ L

Se sometía la mezcla de reacción a 42°C durante 15 minutos. Posteriormente se desnaturalizaba la enzima a 95°C durante 60 minutos y se enfriaba a 4°C.

Para la detección específica de la cadena genómica se utilizaba en la RT el cebador antigenómico externo y para la detección de la antigenómica se usaba el genómico externo.

◆ Nested-PCR

Una vez sintetizada la cadena de ADNc se puede realizar la PCR. En este caso se hace nested-PCR, que consiste en someter la muestra a una segunda amplificación utilizando cebadores internos. Con esto se consigue aumentar la especificidad y la sensibilidad de la reacción.

Para la PCR se añade la mezcla de reacción al tubo con los 10 μL obtenidos en la RT. La mezcla contiene:

- Tampón de reacción (correspondiente a la enzima)
- 200 μM de mezcla de dNTPs (Promega)
- 0,2 μM iniciador antígenómico externo
- 0,2 μM iniciador genómico externo
- 2 unidades de taq-ADN polimerasa (Promega)
- H_2O bidestilada estéril c. s. p. 50 μL

Se sometía la mezcla a 25 ciclos en un termociclador Perkin Elmer-2400 con los siguientes pasos:

- Desnaturalización del ADN: 30 segundos a 94°C
- Hibridación: 30 segundos a 45°C
- Polimerización: 30 segundos a 72°C

Finalmente se hacía una extensión de 7 minutos a 72°C.

Un 10% del producto obtenido tras esta reacción se somete a una segunda amplificación en las mismas condiciones que antes, pero utilizando los iniciadores internos.

◆ **Detección del producto amplificado**

Para la detección se realizó una electroforesis del producto de reacción en un gel de agarosa al 1,2% en tampón TAE (Tris acetate 0,04 M, EDTA 0,002 M). Se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta, apareciendo una banda con un tamaño de 256 pares de bases (pb) correspondiente a las posiciones -291 y -35 de la región 5'NC del genoma del VHC.

➤ **Detección específica de las cadenas genómica y antígenómica del VHG**

La detección de las cadenas genómica y antígenómica del VHG se hizo por RT-nested-PCR utilizando la misma metodología que para el VHC pero con cebadores específicos para el VHG. Los oligonucleótidos elegidos fueron los descritos por Madejón y cols. (1997), que correspondían a fragmentos de las regiones 5'NC y NS3.

◆ **Reacción de RT**

Una vez extraído y resuspendido el ARN por el método explicado anteriormente, se procedía a la síntesis del ADNc utilizándose los cebadores externos correspondientes a cada región. Las reacciones de RT específicas de cada región se realizaban simultáneamente de forma paralela. Para la detección de la cadena antígenómica se utilizaba el iniciador genómico externo y para la cadena genómica el antígenómico externo, de la misma forma que se hacía para el VHC.

La mezcla de reacción estaba compuesta por:

- Tampón de reacción (correspondiente a la enzima)
- 200 μM de mezcla de dNTPs (Promega)
- 0,5 μM iniciador externo específico de la región a analizar (genómico o antígenómico según la cadena buscada)
- 8-10 unidades de inhibidor de ribonucleasas (Promega)
- 2,5 unidades/ μL de AMV-reversotranscriptasa (Promega)
- H_2O bidestilada estéril c. s. p. 10 μL

Cada tubo se sometía a 42°C durante 30 minutos y posteriormente se inactivaba la enzima incubando a 95°C durante una hora.

◆ Nested-PCR

Tras la desnaturalización se realizaba la nested-PCR con los cebadores específicos de cada región. La mezcla de reacción consistía en:

- Tampón de reacción (correspondiente a la enzima)
- 200 μM de mezcla de dNTPs (Promega)
- 0,2 μM iniciador antígenómico externo (región NS3 ó 5'NC)
- 0,2 μM iniciador genómico externo (región NS3 ó 5'NC)
- 1 unidad de taq-ADN polimerasa (Promega)
- H_2O bidestilada estéril c. s. p. 50 μL

La reacción se realizaba en un termociclador Perkin Elmer-2400 y consistía en un paso previo de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de:

- 45 segundos a 94°C
- 30 segundos a 50°C
- 30 segundos a 72°C

La mezcla se sometía a una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Un 10 % del producto obtenido tras esta reacción se sometía a una segunda amplificación en las mismas condiciones que antes, pero utilizando los iniciadores internos.

◆ **Detección del producto amplificado**

Se realizaba una electroforesis en las mismas condiciones que para el VHC, debiendo aparecer una banda de 320 pb para la región 5'NC y de 272 pb para la región NS3.

➤ **Controles aplicados**

Para minimizar la degradación del ARN extraído y evitar la diferencia en la eficiencia de la RT entre las cadenas genómica y antígenómica del VHC y de las dos regiones del VHG analizadas, se realizaban las seis reacciones de RT de manera simultánea. Se partía de la misma solución de ARN extraído y se evitaba la congelación y descongelación de la muestra y del propio ARN. Para las seis reacciones se utilizaban reactivos del mismo lote a excepción de los cebadores específicos. Todos los reactivos y las muestras de ARN se

mantenían a 4°C durante la preparación de las mezclas de reacción para evitar la acción de ribonucleasas que pudieran degradar el ARN. Entre la adición de la muestra al primer tubo de reacción y la adición al último no pasaban más de 5 minutos. Todas las reacciones se llevaban a cabo en el mismo termociclador.

En cada reacción se introducían uno o más controles negativos consistentes en:

- ARN extraído de sueros de pacientes VHG y VHC negativos
- 2 µL de agua destilada estéril en lugar de ARN
- Mezcla de reacción con ARN vírico y todos los reactivos pero sin enzima
- Realización de la nested-PCR con ARN vírico sin el paso previo de RT

Para evitar la contaminación cruzada se seguían las recomendaciones de Kwok (Kwok, 1990). Los pasos de extracción de ARN y preparación de las mezclas de reacción se llevaban a cabo en una cabina de flujo laminar de protección biológica, situada en una habitación, y los pasos en los que se abrían tubos con ADN en otra distinta que se encontraba alejada de la primera. Los pasos de electroforesis y de detección de ADN se realizaban en un laboratorio diferente. Además, se usaban puntas de pipeta aerosol-resistentes, guantes desechables, lámparas de luz ultravioleta, etc.

La ausencia de degradación del ARN se comprobaba con la aparición de la cadena genómica del VHC o del VHG.

➤ **Determinación de la concentración de ARN-VHC en suero**

Se utilizó el test comercial COBAS AMPLICOR MONITOR HCV V 2.0 de Roche Diagnostics siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica se basa en cinco procesos fundamentales: a) preparación de la muestra; b) transcripción inversa del ARN diana para sintetizar el ADNc; c) amplificación por PCR de este ADNc con iniciadores complementarios específicos del VHC; d) hibridación de los productos amplificados con sondas oligonucleotídicas específicas para las dianas y e) detección por colorimetría de los productos amplificados y unidos a las sondas.

La cuantificación del ARN vírico resulta posible por la adición de un patrón de cuantificación, que consiste en una transcripción de ARN no infeccioso con unas características específicas que le permiten amplificarse junto con el ARN diana, pero pudiéndose distinguir de éste. El patrón de cuantificación se añade en un número de copias conocido (especificado por el fabricante en cada lote) y pasa por los mismos procesos que el ARN problema. Esto permite obviar cualquier inhibición de la amplificación.

Todo el proceso (salvo la preparación de la muestra) se llevaba a cabo en un COBAS AMPLICOR™ (Roche Diagnostic Systems) de forma automatizada.

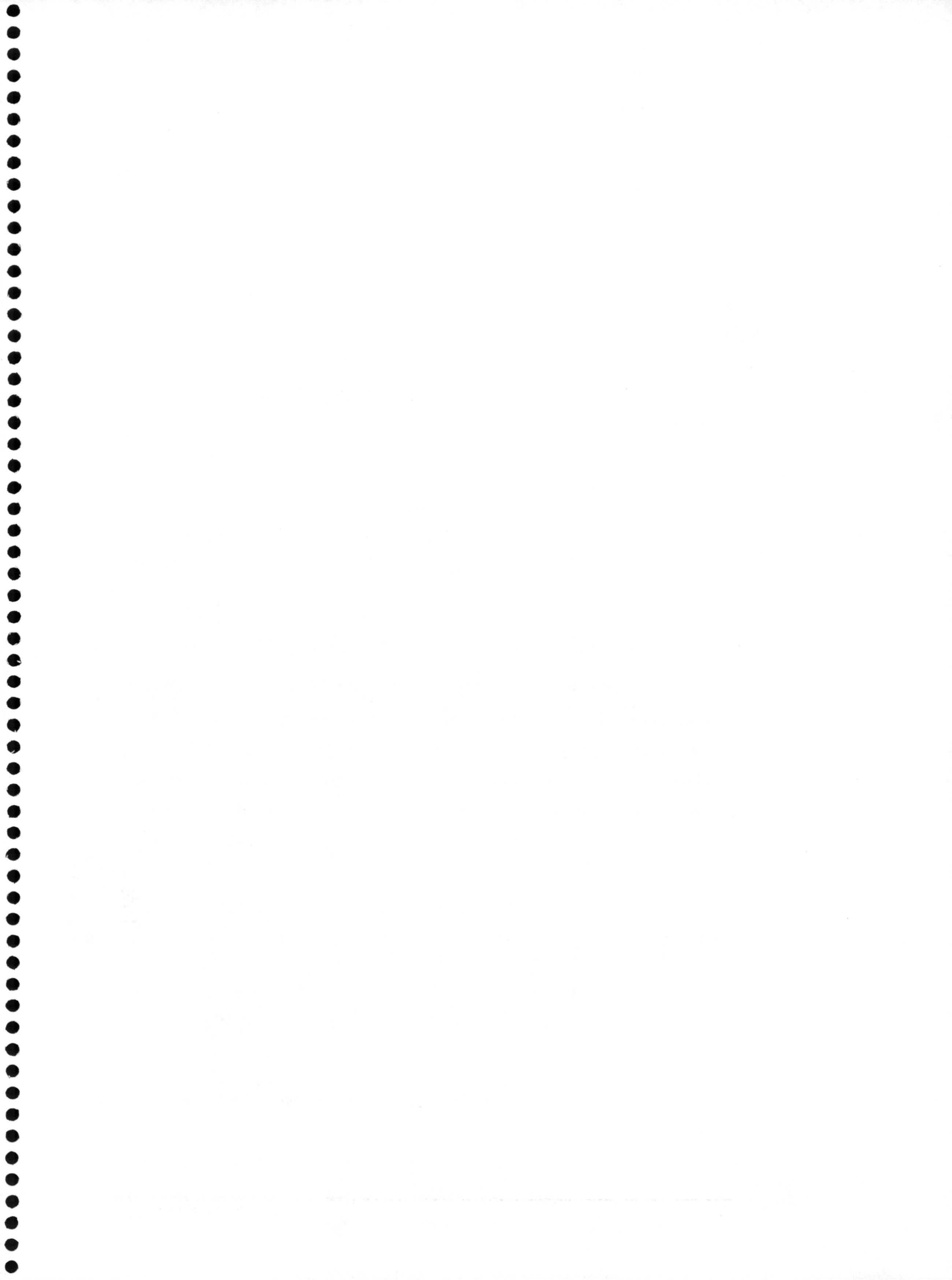
➤ **Determinación del genotipo del VHC**

La determinación del genotipo del VHC se realizó mediante la técnica de INNO LiPA™ HCV II (Innogenetics). La técnica se desarrolló de forma automatizada con la utilización del *Auto-LiPA*. Esta técnica permite discriminar entre los 6 genotipos principales y sus subtipos más comunes. Se basa en las variaciones encontradas en la región 5'NC de diferentes genotipos del VHC.

El proceso requiere una amplificación previa del ARN mediante RT-PCR. En esta reacción se incorpora biotina en el extremo 5' de la cadena de ADN mediante el uso de un iniciador específico marcado en 5'. Los productos amplificados marcados con biotina hibridan con las sondas inmovilizadas en las tiras de reacción. Esta hibridación es muy específica debido a las condiciones estrictas de la reacción ($50^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

Después de la hibridación se añade estreptavidina unida con fosfatasa alcalina, que se une a cualquier híbrido biotinilado previamente formado. Se incuba con un cromógeno y se produce un precipitado marrón en la línea en la que se haya dado una unión perfecta entre la sonda y el producto de PCR.

El genotipo se deduce siguiendo una tabla de interpretación de resultados según el patrón de bandas que aparezca.



3.4. MÉTODO ESTADÍSTICO

3.4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Las variables cuantitativas fueron descritas como media aritmética \pm desviación estándar de la media.

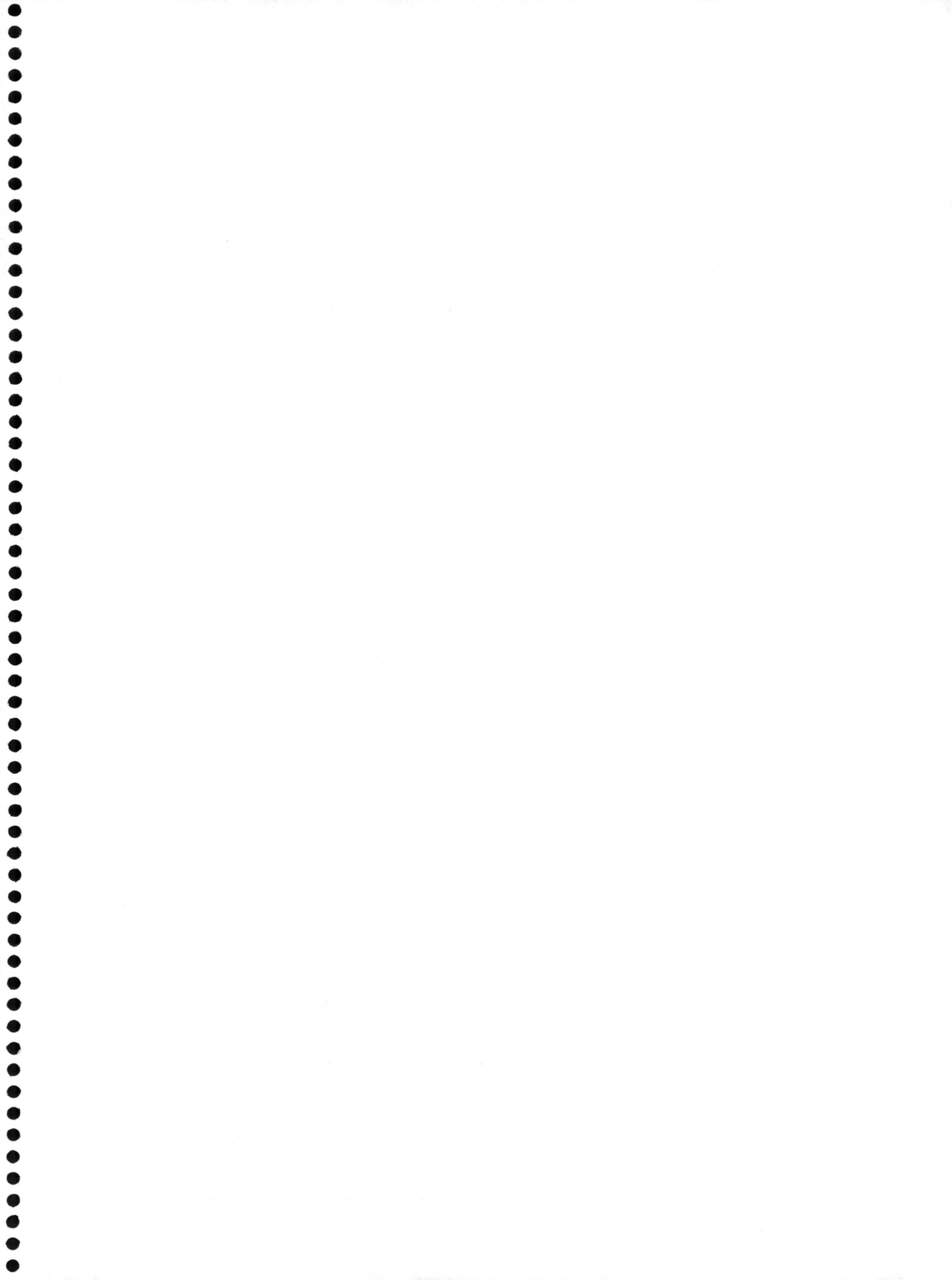
Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes.

3.4.2. ESTADÍSTICA COMPARATIVA

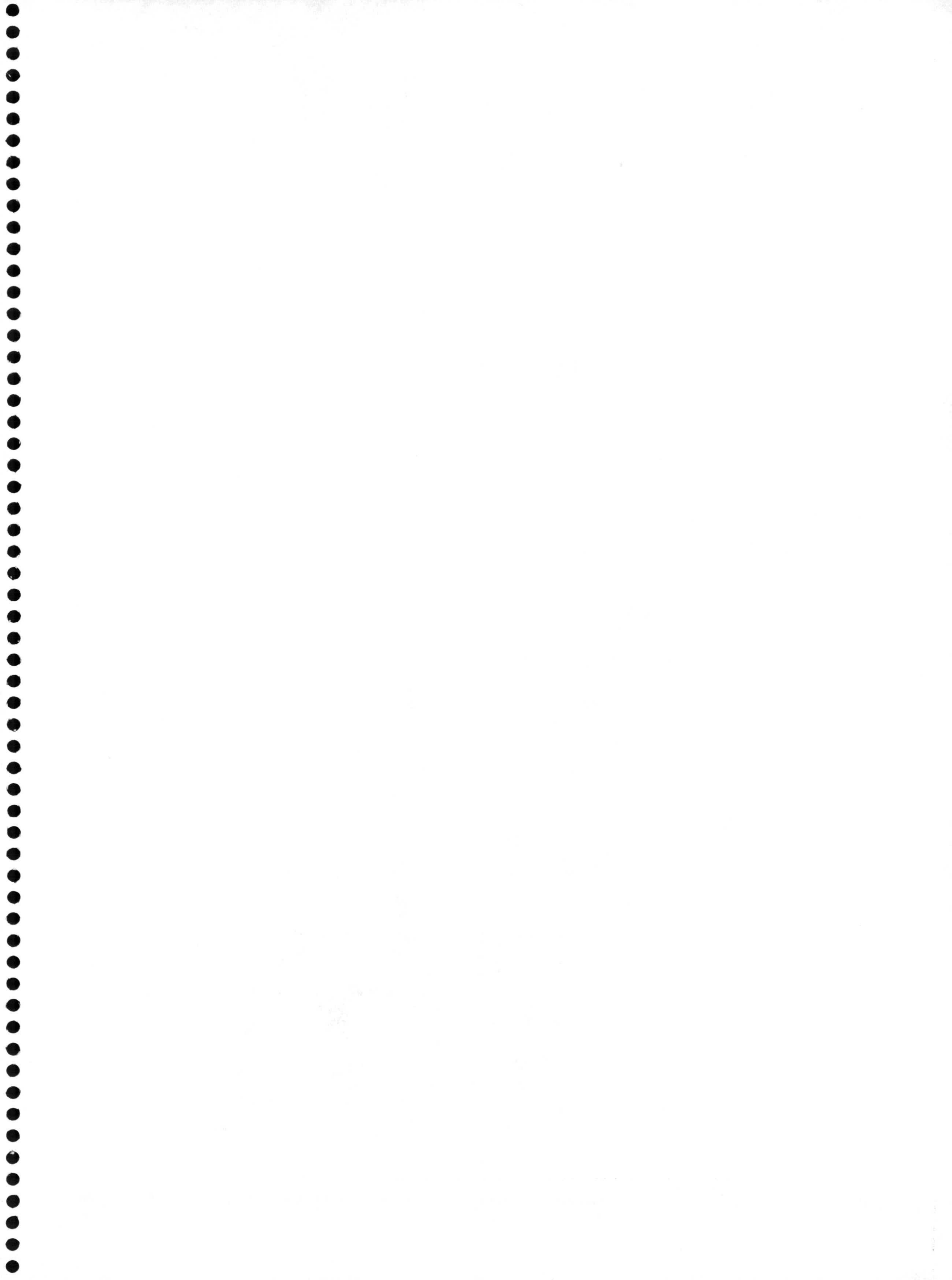
Las variables cuantitativas se compararon mediante el test de la t-Student para muestras independientes.

Las variables cualitativas se analizaron mediante test de la Chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher.

En todos los tests e intervalos de confianza se consideró un nivel de significación estadística del 95%.



4. RESULTADOS



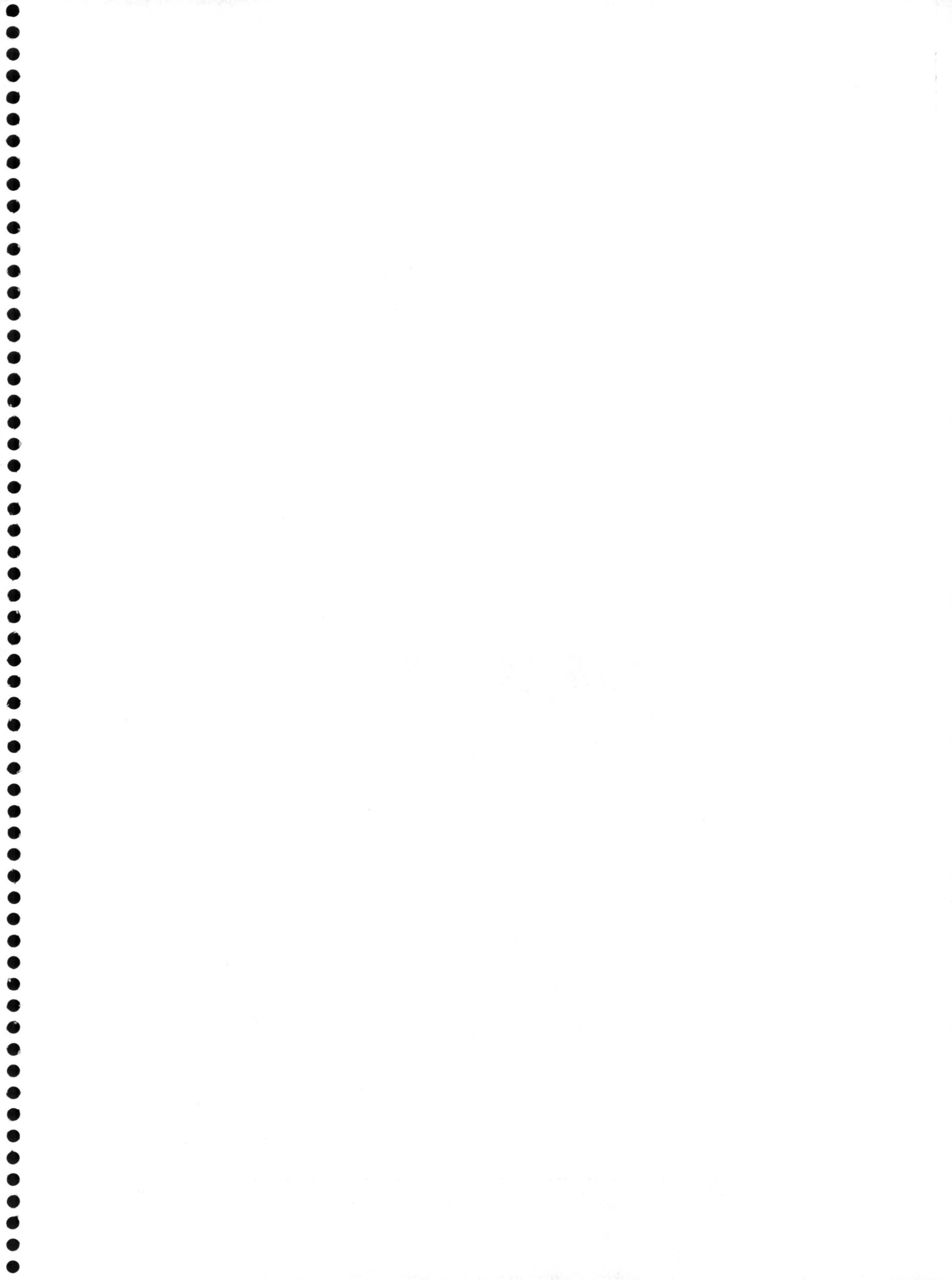
Se estudiaron los sueros de 272 pacientes con hepatopatía crónica por VHC y se les determinó el ARN-VHG, siendo la prevalencia del 12,8% con un intervalo de confianza entre 9,2 y 17,5. Se pudo hacer el seguimiento a 248 pacientes, que incluían 35 con coinfección con VHG y 213 que tenían sólo el VHC.

La edad media en el grupo de los no coinfectados fue de $40,9 \pm 11,9$ y en el grupo de los coinfectados del $37,7 \pm 12,8$, sin diferencias estadísticamente significativas.

Con respecto al género, se observó que en el grupo de los no coinfectados había 138 (65%) varones y 75 (35%) mujeres. En el grupo de coinfectados había 25 (71%) varones y 10 (29%) mujeres, sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

	VHG (-) n=213	VHG (+) n=35	P
Edad	40,92±11	37,74±12,84	N.S.
Género(v)	138 (65%)	25 (71%)	N.S.

Tabla 6. Relación de edad (media± desviación estándar) y género (n(%)) en ambos grupos, no coinfectados (VHG(-)) y coinfectados (VHG(+)).



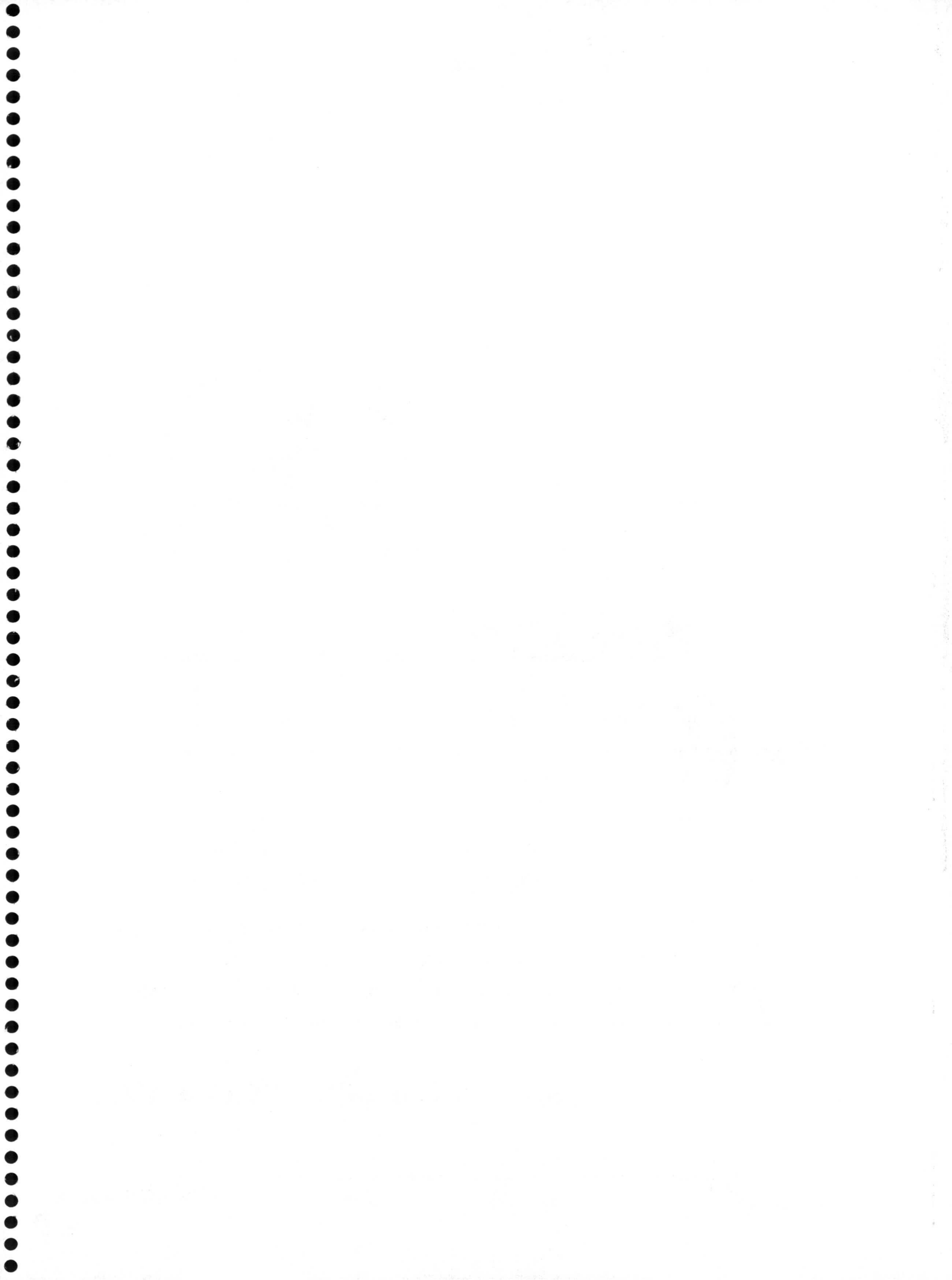
4.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Los antecedentes epidemiológicos en el grupo de los no coinfectados fueron: 12% ADVP, 18% haber recibido transfusiones, 33% otros factores de riesgo y 27% desconocido por el paciente. En el 10% no estaba disponible este dato (Tabla 7).

En el grupo de los coinfectados se observó: 26% ADVP, 20% haber recibido transfusiones, 43% otros factores de riesgo y 23% desconocido. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos, aunque en el de coinfectados había un porcentaje mayor de individuos con antecedentes de ADVP, con diferencias casi significativas ($p=0,07$). Con respecto al consumo de alcohol no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7).

	VHG(-) n(%)	VHG(+) n(%)	P
ADVP	25(12)	9(26)	0,07
Transfusiones	39(18)	7(20)	N.S.
Otros	71(33)	15(43)	N.S.
Desconocido	57(27)	8(23)	N.S.
Alcohol (>80g/día)	29(14)	6(17)	N.S.

Tabla 7. Datos epidemiológicos.



4.2. DATOS ANALÍTICOS

Estudiando los datos analíticos en ambos grupos se observó que las diferencias no fueron estadísticamente significativas en cuanto a los valores de AST, ALT, GGT, FA, BD, colesterol, triglicéridos, proteínas totales y albúmina. Se encontraron diferencias casi estadísticamente significativas en la BI ($p=0,07$) (Figura 3 y Tabla 8).

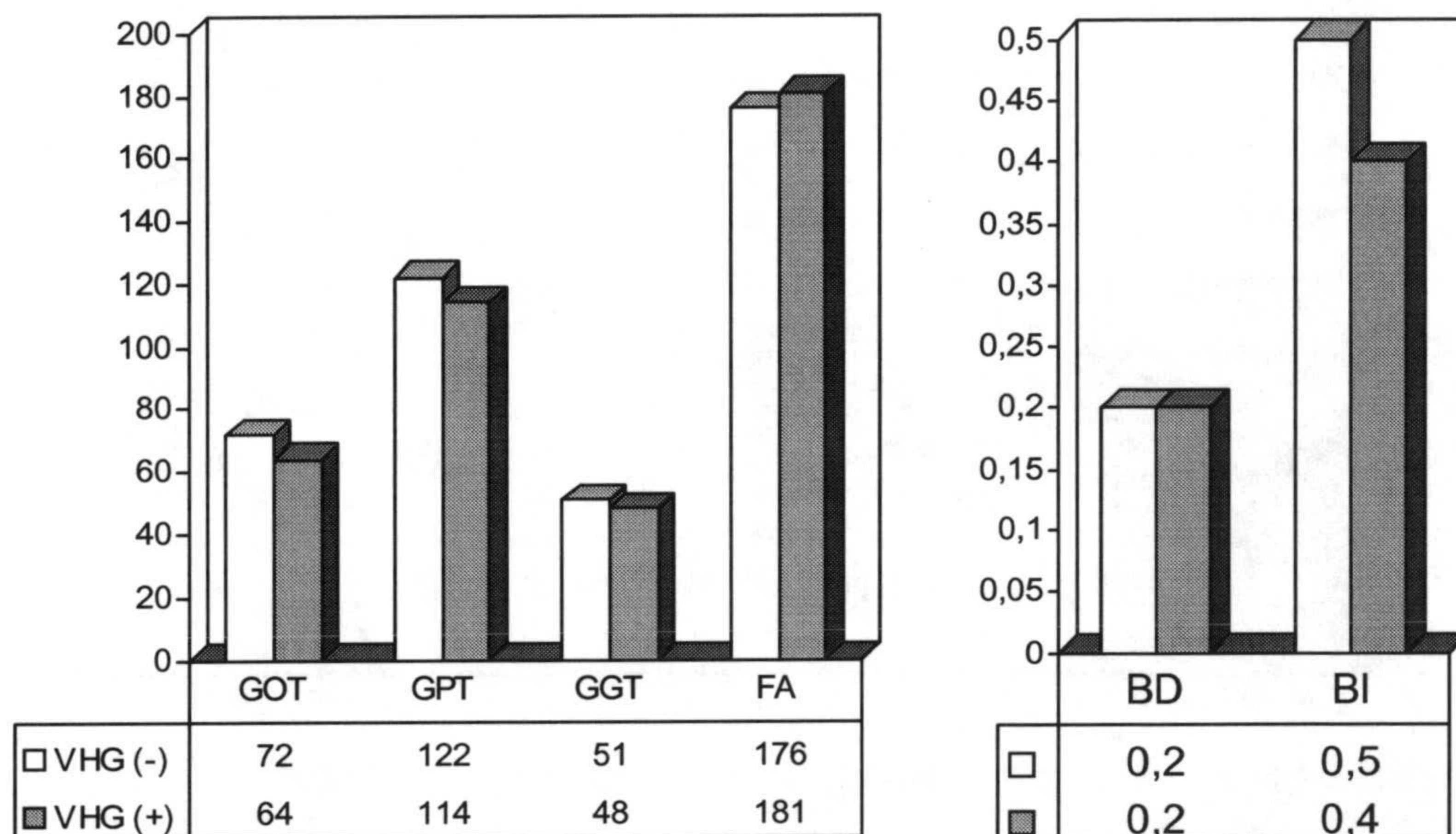


Figura 3. Datos analíticos. AST, ALT, GGT y FA en UI/L. BD y BI en mg%.

	VHG (-) n=213	VHG (+) n=35	P
AST (UI/L)	72±43	64±33	N.S.
ALT (UI/L)	122±88	114±76	N.S.
GGT (UI/L)	51±45	48±47	N.S.
FA (UI/L)	176±54	181±66	N.S.
BD (mg%)	0,2±0,1	0,2±0,1	N.S.
BI (mg%)	0,5±0,25	0,4±0,1	0,07
Colesterol (mg%)	180±40	177±44	N.S.
Triglicéridos (mg%)	103±55	100±50	N.S.
PT (g/L)	7,7±0,6	7,6±0,5	N.S.
Albúmina (g/L)	4,5±0,5	4,5±0,5	N.S.

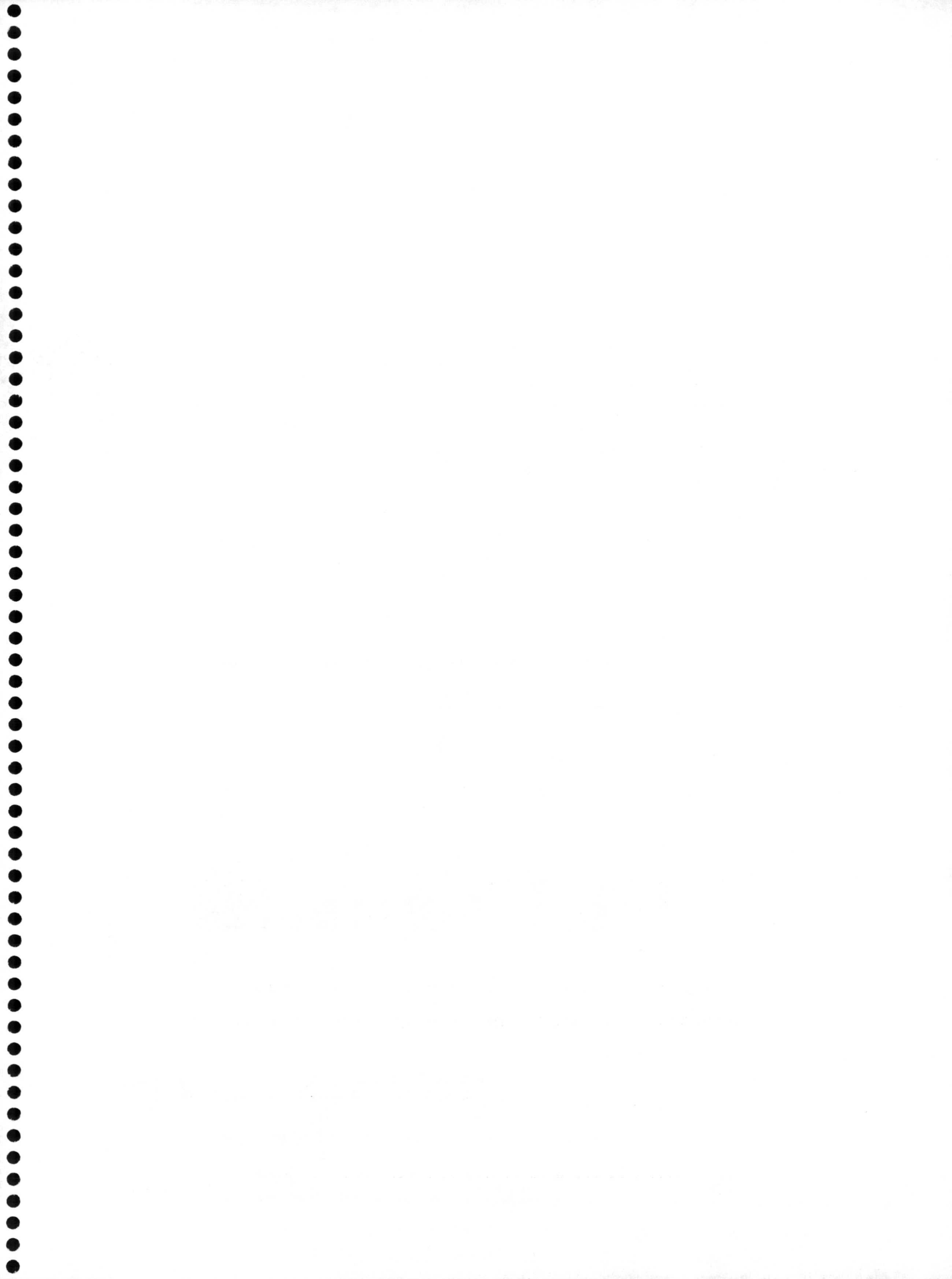
Tabla 8. Datos analíticos (media ± desviación estándar).

4.3. AUTOANTICUERPOS

Se analizaron los autoanticuerpos (AMA, ANA y AML) en ambos grupos y tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 9).

	VHG(-) n(%)	VHG(+) n(%)	P
AMA	2(1)	1(2)	N.S.
ANA	14(7)	3(9)	N.S.
AML	31(16)	8(25)	N.S.

Tabla 9. Porcentajes de presencia de autoanticuerpos.

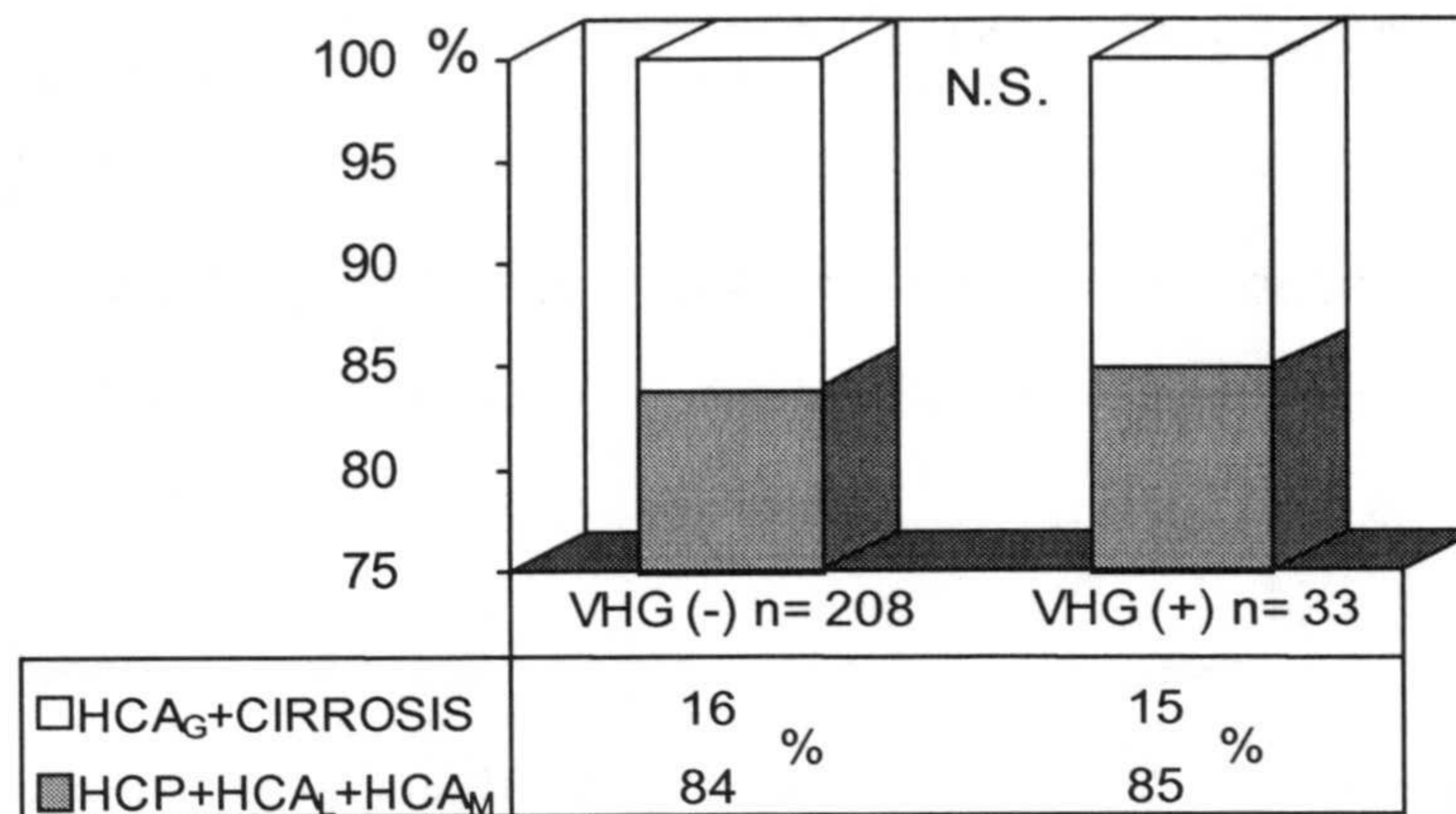


4.4. DATOS HISTOLÓGICOS

Se estudiaron las lesiones histológicas, el índice de Knodell y el índice de Scheuer en los pacientes no coinfectados y coinfectados con el VHG.

Para no dispersar los datos, las lesiones histológicas se segregaron en dos grupos según su gravedad. El primero incluía HCP, HCA_L y HCA_M y el segundo HCA_G y cirrosis. Hubo 5 pacientes no coinfectados y 2 coinfectados que no fueron sometidos a biopsia hepática. En el grupo de pacientes no coinfectados hubo 175 (84%) enfermos con lesiones de menor gravedad y 33 (16%) pacientes con lesiones de mayor severidad histológica. En cuanto a los coinfectados, encontramos 28 (85%) pacientes con lesiones de menor gravedad y 5 (15%) pacientes con lesiones más graves. La proporción de gravedad histológica entre los no coinfectados y los coinfectados no presentó diferencias estadísticamente significativas (Figura 4).

Analizamos el índice de Knodell y el índice de Scheuer calculando la media y la desviación estandar ($m \pm DE$). En el grupo de no coinfectados se observó un índice de Knodell de $7,26 \pm 3,94$ y un índice de Scheuer con un grado de $2,71 \pm 2,51$ y un estadio de $2,21 \pm 1,4$. En el grupo de coinfectados el índice de Knodell fue de 9 ± 3 y en cuanto al de Scheuer, el grado fue de $4,87 \pm 1,26$, y el estadio de $2,12 \pm 0,6$. No hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura 5).



HCP: hepatitis crónica persistente; HCA_L: hepatitis crónica activa leve; HCA_M: hepatitis crónica activa moderada; HCA_G: hepatitis crónica activa grave.

Figura 4. Lesiones histológicas (no coinfectados y coinfectados).

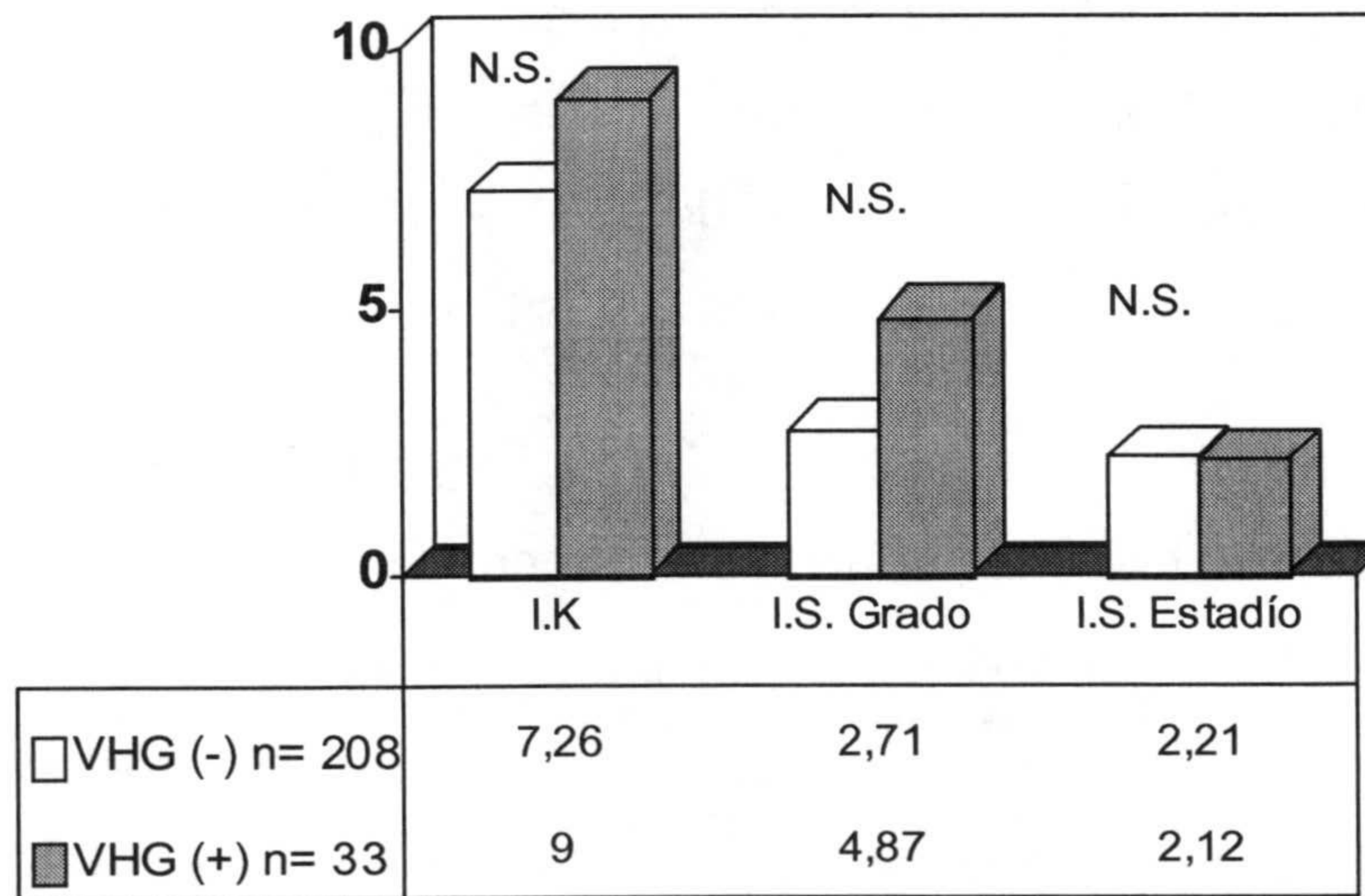


Figura 5. Índice de Knodell y de Sheuer (media).

4.5. ESTUDIO VIROLÓGICO

Para el estudio virológico se seleccionó un grupo control de 23 pacientes con VHC aislado que tenían similares características de edad, género y factores epidemiológicos que el grupo de pacientes coinfectados con el VHG (Tabla 10).

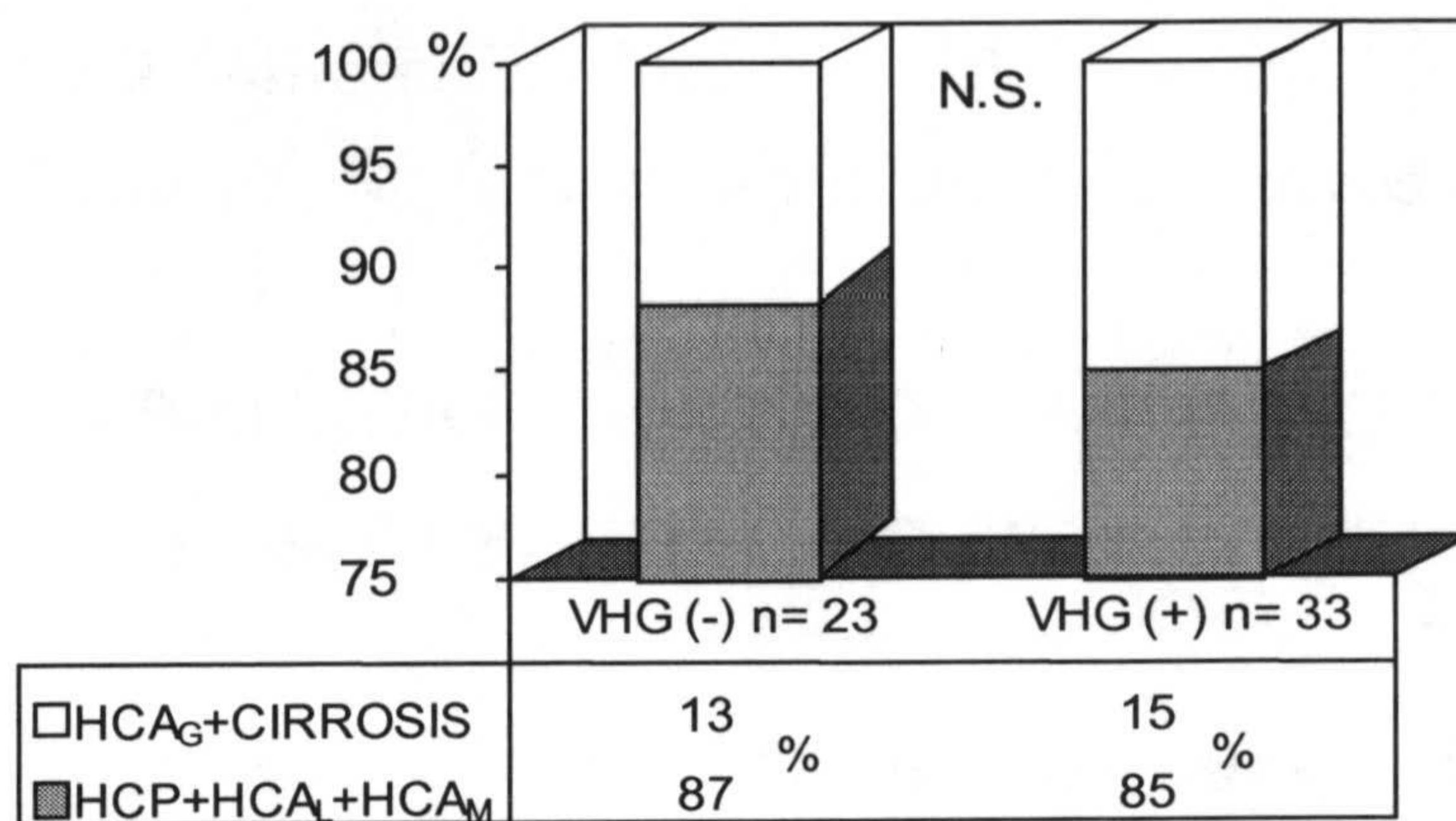
	VHG (-) n=23	VHG (+) n=35	P
Edad	40,87±12,39	37,74±12,84	N.S.
Género (varón)	65%	71%	N.S.
ADVP	22%	26%	N.S.
Transfusión	30%	20%	N.S.
Otros	39%	43%	N.S.
Desconocido	39%	23%	N.S.
Alcohol (>80g/día)	35%	17%	N.S.

Tabla 10. Características del grupo control (VHG(-)) vs coinfectado (VHG(+)).

También se comprobó que este grupo tenía las mismas características en cuanto a los parámetros bioquímicos y las lesiones histológicas (Tabla 11 y Figura 6).

	VHG (-) n=23	VHG (+) n=35	P
AST (UI/L)	83±45	64±33	N.S.
ALT (UI/L)	142±81	114±76	N.S.
GGT (UI/L)	70±60	48±47	N.S.
FA (UI/L)	185±49	181±66	N.S.
BD (mg%)	0,2±0,2	0,2±0,1	N.S.
BI (mg%)	0,5±0,25	0,4±0,1	0,07
Colesterol (mg%)	182±43	177±44	N.S.
Triglicéridos (mg%)	113±53	100±50	N.S.
PT (g/L)	7,7±0,6	7,6±0,5	N.S.
Albúmina (g/L)	4,4±0,4	4,5±0,5	N.S.

Tabla 11. Datos analíticos ($m \pm DE$) del grupo control (VHG (-)) vs coinfectado (VHG (+)).



HCP: hepatitis crónica persistente; HCA_L: hepatitis crónica activa leve; HCA_M: hepatitis crónica activa moderada; HCA_G: hepatitis crónica activa grave.

Figura 6. Lesiones histológicas (grupo control y coinfectado)

En el grupo de pacientes coinfectados con el VHG (n=35) y en este grupo de pacientes con VHC aislado (n=23) se determinó la presencia de las cadenas genómica y antigenómica del VHC en muestras de suero, CMSP e hígado para comprobar si había diferencias cuando el VHG estaba presente. También se determinó la concentración de ARN-VHC y el genotipo en las muestras de suero. En el grupo de pacientes coinfectados con el VHG se determinaron además las cadenas genómica y antigenómica de este virus en suero, CMSP e hígado.

En cuanto a las muestras de las que se disponía para este estudio, en el grupo de pacientes coinfectados (n=35) se contaba con 35 sueros, 15 muestras de CMSP y 25 biopsias hepáticas. En el grupo de pacientes no coinfectados (n=23) había 23 sueros, 23 muestras de

CMSP y 19 biopsias hepáticas.

Al grupo de 35 pacientes coinfectados se le llamó **grupo I**, y al de los 23 pacientes no coinfectados seleccionados se le llamó **grupo II**.

4.5.1. ESTUDIO DE LAS CADENAS GENÓMICA Y ANTIGENÓMICA DEL VHC EN LOS GRUPOS I Y II

4.5.1.1. Estudio de las cadenas del VHC en suero

La cadena genómica del VHC aparece en la práctica totalidad de los sueros estudiados, tanto del grupo I como del grupo II. Se da en el 86% de las muestras de suero del grupo I y en el 100% de las muestras del grupo II (Tabla 12).

La cadena antigenómica aparece en el 17% de las muestras de suero del grupo I y en el 13% de los sueros del grupo II.

No se observan diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la presencia de las distintas cadenas en suero (Tabla 12).

	Cadena ARN + VHC	Cadena ARN - VHC
GRUPO I (VHC+VHG)	30/35 (86%)	6/35 (17%)
GRUPO II (VHC)	23/23 (100%)	3/23 (13%)
P	N.S.	N.S.

Tabla 12. Cadenas genómica (ARN+) y antigenómica (ARN-) del VHC en muestras de suero.

4.5.1.2. Estudio de las cadenas del VHC en CMSP

Igual que ocurría con el suero, en las muestras de CMSP era frecuente la presencia de la cadena genómica del VHC, apareciendo en el 100% de las muestras del grupo I y en el 87% de las muestras del grupo II (Tabla 13).

En cuanto a la cadena antigenómica, ésta se encontró en el 13% de las muestras del grupo I y en el 13% de las muestras del grupo II. No se dio ningún caso en el que se detectara la cadena antigenómica y no estuviera presente la genómica del VHC. Esto suponía que la antigenómica del VHC aparecía en el 13% de las muestras de CMSP de pacientes del grupo I en las que aparecía el ARN-VHC y en el 15% de las muestras de CMSP de pacientes del grupo II infectadas por este virus. Estos casos no coincidieron con pacientes que presentaban la cadena antigenómica del VHC en suero.

No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las cadenas del VHC (Tabla 13).

	Cadena ARN + VHC	Cadena ARN - VHC
GRUPO I (VHC+VHG)	15/15 (100%)	2/15 (13%)
GRUPO II (VHC)	20/23 (87%)	3/23 (13%)
P	N.S.	N.S.

Tabla 13. Cadenas genómica (ARN+) y antigenómica (ARN-) del VHC en muestras de CMSP.

4.5.1.3. Estudio de las cadenas del VHC en hígado

En este tipo de tejido se encontró la cadena genómica del VHC en el 100% de las muestras (n=44), independientemente del grupo estudiado.

En cuanto a la antigenómica, aparecía en el 76% de las muestras analizadas del grupo I y en el 89% de las muestras del grupo II (Tabla 14).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de las cadenas del VHC de distinta polaridad en tejido hepático de pacientes de ambos grupos.

	Cadena ARN + VHC	Cadena ARN - VHC
GRUPO I (VHC+VHG)	25/25 (100%)	19/25 (76%)
GRUPO II (VHC)	19/19 (100%)	17/19 (89%)
P	N.S.	N.S.

Tabla 14. Cadenas genómica (ARN+) y antigenómica (ARN-) del VHC en muestras de hígado.

4.5.2. ESTUDIO DE LAS CADENAS GENÓMICA Y ANTIGENÓMICA DEL VHG Y DEL VHC EN EL GRUPO I

4.5.2.1. Estudio de las cadenas del VHG y del VHC en suero

La cadena genómica del VHG aparecía en el 100% de los sueros del grupo I (n=35), ya que era condición indispensable para la inclusión en este grupo. La cadena antigenómica del VHG se encontró en el 23% de los casos.

En cuanto al VHC, como se ha descrito anteriormente, la cadena genómica aparecía en el 86% de los sueros y la antigenómica en el 17% de los casos (Tabla 15).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos virus.

	Cadena ARN + n=35	Cadena ARN - n=35
VHG	35 (100%)	8 (23%)
VHC	30 (86%)	6 (17%)
P	N.S.	N.S.

Tabla 15. Cadenas genómica y antigenómica del VHC y del VHG en suero de pacientes del grupo I. Los datos se expresan en número (%).

4.5.2.2. Estudio de las cadenas del VHG y del VHC en muestras de CMSP

La hebra con polaridad positiva del VHG estaba presente en el 60% de las muestras de CMSP estudiadas, mientras que la antigenómica aparecía en el 33% de las muestras (Tabla 16). Se da un caso en el que está presente la cadena antigenómica y no lo está la genómica.

En lo que respecta al VHC, la cadena genómica estaba en el 100% de las muestras (n=15) y la antigenómica en el 13% de los casos estudiados (Tabla 15). En estos casos en los que apareció la cadena antigenómica del VHC también estaba presente la del VHG. No se dio ningún caso con cadena antigenómica y sin genómica y en el 13% de las muestras positivas para el ARN-VHC estuvo presente la

antigenómica de este virus.

En este tipo celular se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a la presencia de la cadena genómica de estos virus en CMSP, pero no hubo diferencias en cuanto a la presencia de la antigenómica (Tabla 16).

Como ocurría con el VHC, los casos con cadena antigenómica del VHG en CMSP no coinciden con los casos con antigenómica en suero.

	Cadena ARN + n=15	Cadena ARN - n=15
VHG	9 (60%)	5 (33%)
VHC	15 (100%)	2 (13%)
P	<0,05	N.S.

Tabla 16. Cadenas genómica y antigenómica del VHC y del VHG en CMSP de pacientes del grupo I. Los datos se expresan en número (%).

4.5.2.3. Estudio de las cadenas del VHG y del VHC en hígado

En este tejido es en el que se observaron mayores diferencias en cuanto a la presencia de las distintas hebras de los dos virus estudiados.

La cadena genómica del VHC estuvo presente en el 100% de las

muestras de tejido hepático estudiadas del grupo I, mientras que la antigenómica aparecía en el 76% de las biopsias (Tabla 17).

La cadena positiva del VHG sólo estuvo presente en el 12% de las muestras analizadas, mientras que la cadena negativa no se encontró en ninguna muestra.

Se observaron diferencias significativas tanto en la presencia de la cadena genómica del VHC y del VHG ($p < 0,001$) como en la aparición de la cadena antigenómica de ambos virus ($p < 0,001$) (Tabla 17).

	Cadena ARN + n=25	Cadena ARN - n=25
VHG	3 (12%)	0 (0%)
VHC	25 (100%)	19 (76%)
P	<0,001	<0,001

Tabla 17. Cadenas genómica y antigenómica del VHC y del VHG en hígado de pacientes del grupo I. Los datos se expresan en número (%).

4.5.3. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN Y EL GENOTIPO DEL VHC EN LOS GRUPOS I Y II

La concentración media de ARN-VHC en el grupo I fue de $1,06 \times 10^6 \pm 1,34 \times 10^6$ copias/mL y en pacientes del grupo II fue de $1,54 \times 10^6 \pm 1,90 \times 10^6$ copias/mL. No se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre las medias de ambos grupos, aunque la DE fue elevada. Para poder estudiar la viremia se estableció la mediana ($3,9 \times 10^5$ copias/mL) y se analizaron los grupos I y II para comprobar en cada caso cuántos pacientes tenían una concentración de ARN-VHC superior a la mediana. De esta forma se observó que en el grupo I esto se daba en el 43% y en el grupo II en el 65%. Se estudiaron las posibles diferencias analizando los logaritmos de la concentración pero tampoco se obtuvieron diferencias significativas.

En cuanto a la distribución de genotipos los resultados obtenidos vienen reflejados en la Tabla 18. En un paciente del grupo I no se pudo determinar el genotipo. Los resultados obtenidos suponen un 77% de genotipo 1 frente a un 23% de genotipo no-1 en el grupo I y un 91% de genotipo 1 frente a un 9% de genotipo no-1 en el grupo II. El genotipo más frecuente en ambos grupos fue el 1b, pero aunque en el grupo I parecía haber una tendencia mayor a presentar genotipo 3a, no hubo diferencias significativas.

Genotipo VHC	Grupo I n=34	Grupo II n=23	P
1 b	16 (45%)	16 (70%)	N.S.
1 a	6 (19%)	4 (17%)	N.S.
1 a/1 b	3 (10%)	1 (4%)	N.S.
1	1 (3%)	0 (0%)	N.S.
3 a	8 (23%)	2 (9%)	N.S.

Tabla 18. Distribución de genotipos en el grupo I frente al grupo II.

4.5.4. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN Y EL GENOTIPO DEL VHC SOBRE LA PRESENCIA DE GENÓMICA Y ANTIGENÓMICA DEL VHC EN CMSP Y EN HÍGADO

La cadena genómica del VHC estuvo presente en el 92% de las muestras de CMSP analizadas (100% en el grupo I y 87% en el grupo II), por lo que el número de muestras negativas para esa cadena fue muy pequeño. En cuanto a la cadena antigenómica, estuvo presente en el 13% de las muestras analizadas (13% en el grupo I y 13% en el grupo II). La concentración del ARN-VHC en pacientes con cadena genómica del VHC en CMSP fue de $1,25 \times 10^6 \pm 1,32 \times 10^6$ copias/mL y en los pacientes que no la tenían fue de $1,23 \times 10^6 \pm 1,28 \times 10^6$ copias/mL. En cuanto a los pacientes con cadena antigenómica del VHC en CMSP, la concentración fue de $1,48 \times 10^6 \pm 1,12 \times 10^6$ copias/mL frente a $1,27 \times 10^6 \pm 1,08 \times 10^6$ copias/mL en los que no la tenían. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de ARN-VHC y la presencia de ambas cadenas del VHC en CMSP. Tampoco se encontraron diferencias en cuanto al genotipo.

En este estudio la presencia de cadena antigenómica del VHC en hígado fue muy frecuente y no se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de ARN-VHC en suero o el genotipo.

4.5.5. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ALT Y LA PRESENCIA DE CADENA ANTIGENÓMICA DEL VHC EN SUERO

Al estudiar los niveles de ALT de los pacientes de los grupos I y II que presentaban la cadena antigenómica del VHC en suero (n=9) frente a los que no la tenían (n=49), se observó que estos niveles eran mayores en los pacientes con cadena negativa en suero. La media de ALT fue de 173 ± 60 U/L vs 117 ± 70 U/L, $p < 0,05$.

Al estudiar por separado los grupos I y II, se observó que en el grupo I los pacientes que presentaban la cadena antigenómica del VHC en suero (n=6) tenían una media de ALT de 150 ± 38 U/L, mientras que los pacientes que presentaban esa misma cadena en suero en el grupo II (n=3) tenían una media de ALT de 220 ± 79 U/L. No se observaron diferencias significativas, aunque el número de casos fue muy pequeño.

4.5.6. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ALT Y LA PRESENCIA DE CADENA ANTIGENÓMICA DEL VHC EN CMSP

Los pacientes que presentaron la cadena antigenómica del VHC en CMSP tenían unos niveles de ALT de 158 ± 36 UI/L y los que no la presentaban tenían un valor de ALT de 147 ± 40 UI/L. No se observaron diferencias significativas en estos niveles en los pacientes

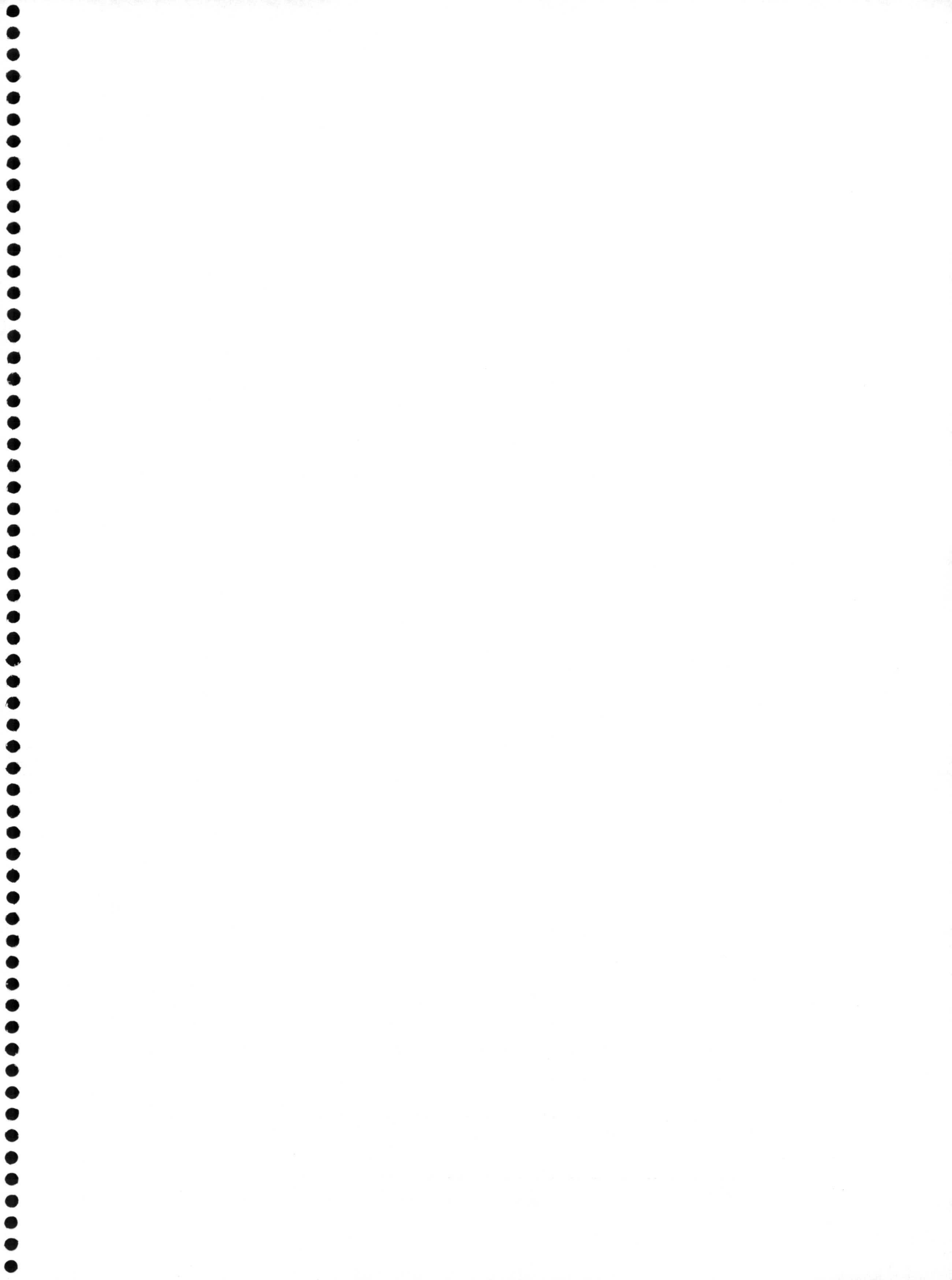
con cadena antigenómica en CMSP y los que no la tenían.

4.5.7. RELACIÓN ENTRE LA LESIÓN HISTOLÓGICA Y LA REPLICACIÓN DEL VHC EN HÍGADO

Para valorar la relación entre la presencia de cadena antigenómica del VHC en hígado y la evolución de la enfermedad hepática, agrupamos los pacientes según la gravedad de la lesión histológica observada. De las 43 biopsias disponibles para este estudio, 27 presentaban una lesión inferior a HCA_L y 16 tenían una lesión histológica más grave. Al estudiar la presencia de la cadena antigenómica del VHC en estas muestras se observó que los 8 pacientes que no presentaban esta cadena en hígado tenían lesiones menos graves, mientras que de los 35 pacientes con cadena antigenómica en hígado, el 47% tenían una lesión más grave de HCA_L. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

No se pudo valorar la influencia de la coinfección con el VHG en este punto debido al escaso número de muestras con antigenómica del VHC positiva, que era de 18 en el grupo I frente a 17 en el grupo II.

5. DISCUSIÓN



Son numerosos los autores que han puesto de manifiesto la frecuente coinfección del VHG con otros virus hepatotropos de transmisión parenteral, como el VHB y sobre todo con el VHC. En este sentido se han desarrollado estudios que tratan de demostrar la influencia que puede tener la infección por el VHG en la replicación del VHC de pacientes con HCC y en la evolución de la enfermedad provocada por este virus. Los objetivos fundamentales de este estudio fueron conocer la localización del VHG dentro del organismo, comprobar su posible lugar de replicación y ver si afectaba de algún modo a la distribución, replicación o concentración del VHC.

Para ello se estudiaron los sueros de 272 pacientes afectados de HCC y se les determinó el ARN-VHG, demostrando una prevalencia del 12,8%, similar a la encontrada por Berg y cols. (1996), Lau y cols. (1997) y McHutchinson y cols. (1997) e inferior a la hallada otros autores (Sáiz y cols., 1995; Bralet y cols., 1997; Capra y cols., 1997; Cathomas y cols., 1997; Francesconi y cols., 1997; Martinot y cols., 1997; Nagayama y cols., 1997; Orito y cols., 1997; Wartelle y cols., 1997; Enamoto y cols., 1998; Jarvis y cols., 1998; Manolakopoulos y cols., 1998; Oshita y cols., 1998).

Se puede observar, sin embargo, que los estudios con mayor prevalencia (Diamantis y cols., 1997; Goeser y cols., 1997) se realizaron exclusivamente en pacientes ADVP afectados de HCC, mientras que en el resto no se han diferenciado los distintos mecanismos de transmisión. Esto demuestra que existe una mayor prevalencia del VHG en los pacientes con riesgo de contraer infecciones transmitidas por vía parenteral.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad media de los pacientes coinfectados y no coinfectados, a diferencia de otros autores que encuentran una edad media inferior en el grupo de los coinfectados (Diamantis y cols., 1997; Francesconi y cols., 1997; Manolakopoulos y cols., 1998). Tampoco se encontraron diferencias con respecto al sexo, coincidiendo con otros autores (Giostra y cols., 1995; Berenguer y cols., 1996; Berg y cols., 1997; Francesconi y cols., 1997; Inoue y cols., 1997; Martinot y cols., 1997).

Al analizar los datos epidemiológicos tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. No obstante, coincidiendo con Berg y cols. (1997), Francesconi y cols. (1997) y Martinot y cols. (1997) se observó que en el grupo de los coinfectados existe una mayor tendencia a ser ADVP. En cualquier caso, es importante la elevada tasa de factores de riesgo de tipo parenteral en los dos grupos, contribuyendo a confirmar que el VHG tiene un mecanismo de infección similar al del VHC y que es un virus de transmisión parenteral.

Al valorar los datos analíticos no se encontraron diferencias entre pacientes coinfectados y no coinfectados en los niveles de ALT, coincidiendo con la mayoría de los autores. Sólo Berg y cols. (1997) demostraron niveles inferiores en el grupo de los coinfectados. En el estudio realizado por Sáiz y cols. (1997) se detectaron unos niveles de ALT superiores en este mismo grupo. Estos autores observaron que los niveles de ALT aparecen alterados o normales según el ARN-VHC esté presente o ausente, mientras que sus valores parecen independientes de la presencia o no del ARN-VHG. En este estudio se analizan

además otros parámetros analíticos como AST, GGT, FA, BD, BI, colesterol, triglicéridos, proteínas totales y albúmina, sin encontrar diferencias entre ambos grupos. Estos resultados confirman lo que otros autores han sugerido: que el VHG no tiene impacto significativo en la historia natural de la HCC.

En este estudio se analizaron los autoanticuerpos AMA, ANA, AML en ambos grupos, sin encontrar diferencias entre ellos, lo que demuestra que el VHG no tiene actividad autoinmune.

También las lesiones histológicas en ambos grupos fueron idénticas, al contrario de los resultados de otros autores (Goeser y cols., 1997) que observaron una mayor frecuencia de HCA, con mayor grado de fibrosis y cambios cirróticos en el grupo de pacientes no coinfectados. Francesconi y cols. (1997) y Petrit y cols. (1998) demostraron una mayor esteatosis en el grupo de los coinfectados, con diferencias estadísticamente significativas. Por último, Manolakopoulos y cols. (1998) demostraron en el grupo de coinfectados un mayor grado de inflamación portal y periportal.

En cuanto al índice de Knodell, los resultados coinciden con Bralet y cols. (1997) y Wartelle y cols. (1997) en que es similar en ambos grupos. Se analizó también el índice de Scheuer, tanto el estadio como el grado, sin encontrar diferencias entre ambos grupos. Estos resultados nos ayudan a corroborar, como el resto de los autores, que es muy improbable que el VHG cause por sí mismo una hepatopatía crónica ni que empeore las lesiones histológicas

producidas por el VHC. Esto constituye otro argumento a favor de la baja patogenicidad del VHG.

Una vez realizado el estudio de prevalencia del VHG y analizadas las características de los pacientes coinfectados y no coinfectados, se trató de conocer la influencia del VHG sobre la distribución y replicación del VHC.

Para ello, se seleccionó un grupo de 23 pacientes con VHC aislado (grupo II) que pudiera ser comparado con el grupo de pacientes coinfectados con VHG (35 pacientes, grupo I). En ambos grupos se analizó la cadena genómica y la antigenómica del VHC en suero, CMSP e hígado y se determinó el genotipo y la viremia del VHC en suero. En los pacientes coinfectados, además, se trató de detectar la cadena genómica y la antigenómica del VHG en las mismas muestras para conocer su distribución y comprobar dónde se daba la replicación de este virus.

Coincidiendo con otros autores (Pessoa y cols., 1998) no se observaron diferencias en cuanto a la presencia de cadena genómica del VHC en el suero de los pacientes de ambos grupos (I y II), ya que estaba presente en la práctica totalidad de las muestras analizadas (86% vs 100%).

Un dato a destacar fue la presencia de cadena antigenómica del VHC en el 17% de los sueros de los pacientes coinfectados y en el 13% de las muestras de los no coinfectados. Esto es un hecho controvertido, ya que según unos autores puede ser debido a una falta de especificidad de cadena de la técnica empleada (Willems y cols.,

1993; Gunji y cols., 1994; McGuinness y cols., 1994; Lanford y cols., 1995) y según otros puede estar relacionado con una activa lisis celular que esté haciendo que se liberen al plasma viriones completos e intermediarios replicativos procedentes de hepatocitos (Zignego y cols., 1995; Sata y cols., 1998). En nuestro caso, descartamos una falta de especificidad de cadena de la técnica, ya que se introducen numerosos controles que demuestran que no hay amplificación de la cadena antigenómica aunque la genómica sea positiva. Además, aunque a partir de una determinada concentración de la cadena genómica se pueden dar falsos positivos por la capacidad de transcripción en reverso de la Taq polimerasa, en nuestro caso encontramos pacientes con una elevada concentración de ARN-VHC en suero que son negativos para la cadena antigenómica. Para comprobar que la positividad se debía a la lisis de hepatocitos y liberación de cadena antigenómica al plasma, se estudió si existía alguna relación entre la presencia de dicha cadena en suero y los niveles de ALT. Se observó que los pacientes en los que estaba presente la cadena de polaridad negativa en suero tenían niveles mayores de ALT ($p < 0,001$), lo que indicaría que se está dando destrucción activa de hepatocitos.

Numerosos autores han demostrado que el VHC puede aparecer en muestras de CMSP (Qian y cols., 1992; Wang y cols., 1992a; Zignego y cols., 1992; Muratori y cols., 1994; Willems y cols., 1994; Taliani y cols., 1995; Zignego y cols., 1995; Kao y cols., 1997; Laskus y cols., 1998a; Lerat y cols., 1998; Kao y cols., 1999). En este estudio se observó que era frecuente la aparición de la cadena genómica del VHC en CMSP independientemente de la presencia o no del VHG (100% en el grupo I vs 87% en el II). Aunque algunos autores

sugieren que la presencia en CMSP puede deberse a partículas virales presentes en suero y que puedan estar unidas a la membrana (Takehara y cols., 1992; Lerat y cols., 1998) en este estudio se encuentran casos en los que la cadena genómica del VHC está presente en CMSP y no en suero, lo que apoya la idea de que realmente se da una infección de las CMSP por parte del VHC. Esto también ha sido descrito por otros autores (Muratori y cols., 1994; Taliani y cols., 1995; Kao y cols., 1997). La cuestión es demostrar si el virus además de infectar es capaz de replicarse activamente en este tipo celular.

En este estudio apareció la cadena antigenómica del VHC en la misma proporción de muestras de CMSP estudiadas en ambos grupos (coinfetados vs no coinfectados) (Tabla 13). Esto demuestra que se puede dar replicación del VHC en CMSP y que es un proceso independiente de la presencia del VHG, aunque no sea el sitio de replicación más importante para el VHC. Estos resultados coinciden con los de otros autores que también encontraron la cadena negativa del VHC en CMSP (Qian y cols., 1992; Wang y cols., 1992a; Zignego y cols., 1992; Willems y cols., 1994; Zignego y cols., 1995; Kao y cols., 1997; Laskus y cols., 1998a; Kao y cols., 1999). Además, los datos clínicos que reflejan la enfermedad hepática son similares en los casos en los que aparece la cadena antigenómica en CMSP y en los que no está presente, lo que, como ya apuntaban Lerat y cols. (1998), sugiere que la presencia de dicha cadena se debe a la replicación activa del virus y no a la liberación de partículas víricas por parte de los hepatocitos y que pudieran haber sido fagocitadas.

Al estudiar la replicación del VHC en hígado se observó que la cadena genómica de este virus se encontraba en el 100% de las muestras estudiadas independientemente de la infección o no por el VHG. La antigenómica aparecía en el 76% de las muestras del grupo I frente al 89% de las del grupo II, sin diferencias significativas. Estos datos confirman el carácter eminentemente hepatotrofo del VHC, ya que el hígado es el lugar en el que se da una mayor y más evidente replicación de este virus. El hecho de que la cadena antigenómica aparezca de igual forma en los dos grupos analizados viene a reforzar la idea de que la presencia de infección por el VHG no afecta a la replicación hepática del VHC (Pessoa y cols., 1998; Laras y cols., 1999).

Además de estudiar la replicación del VHC, nuestro objetivo era determinar el lugar elegido por el VHG para su replicación y ver si había diferencias con respecto al VHC. Para esto tratamos de encontrar la cadena antigenómica de este virus en suero, CMSP e hígado del grupo de pacientes coinfectados por VHC y VHG (grupo I).

La presencia de cadena genómica del VHG en suero era la condición de inclusión en este grupo de estudio, por lo que estuvo presente en el 100% de los casos. La antigenómica, sin embargo, aparecía en el 23% de las muestras de suero, pudiéndose explicar de la misma manera que la del VHC; se trataría de liberación al plasma de intermediarios replicativos junto con viriones completos tras la ruptura de las células infectadas en las que se esté produciendo replicación viral. Al comparar estos datos con los obtenidos para el VHC se

observó que no había diferencias entre ambos virus en los pacientes coinfectados.

En cuanto al estudio de los lugares de replicación del VHG, observamos que la cadena con polaridad positiva del VHG aparecía en el 60% de las muestras de CMSP analizadas, mientras que la negativa estaba presente en el 33% de las muestras. Esto no coincide con los datos obtenidos por otros autores que encuentran la cadena genómica pero no la antígenómica (Madejón y cols., 1997; Radkowski y cols., 1998a; Kao y cols., 1999) aunque en estudios más recientes se demuestra el carácter linfotropo del VHG (Tucker y cols., 2000) y su replicación en médula ósea y bazo (Radkowski y cols., 1999; Radkowski y cols., 2000; Tucker y cols., 2000). Al compararlo con el VHC se observaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de cadena genómica (60% vs 100%) pero no en cuanto a la antígenómica (33% vs 13%). Se pudo observar que aunque la presencia de la cadena genómica del VHG en CMSP era significativamente menor que la del VHC, la de la antígenómica era algo mayor (aunque sin diferencias significativas), por lo que si se tienen en cuenta solamente las CMSP infectadas se podría deducir que este tipo celular es un lugar más importante para la replicación del VHG que del VHC. Se comprobó que los casos en los que se hallaba la cadena antígenómica del VHC o del VHG en CMSP no coincidían con los casos en los que estaba presente en suero, por lo que no se trataría de partículas circulantes atrapadas por estas células. Esto apoya los resultados obtenidos por Lerat y cols. (1998) estudiando el VHC. Además, una explicación similar ofrecen Madejón y cols. (1997) a la presencia de la cadena antígenómica del VHG en hígado.

Es llamativo, además, el hecho de que en dos pacientes coinfectados de este estudio estuvieran presentes las cadenas antigenómicas de ambos virus en CMSP, lo que reflejaría una replicación activa de los dos virus en este tipo celular sin interferencias entre ellos.

Cuando se estudiaron las muestras de tejido hepático para determinar si el VHG infectaba los hepatocitos y si se replicaba en ellos, se observó que, mientras que el VHC estaba presente en el 100% de las muestras analizadas, el VHG sólo se encontró en el 12% de las biopsias hepáticas del grupo I. Mayores diferencias se encontraron al analizar la cadena antigenómica, ya que mientras que la del VHC aparecía en el 76% de las muestras del grupo I, la hebra negativa del VHG no pudo ser detectada en ninguna muestra hepática. Estos datos vienen a demostrar que el VHG no es hepatotropo y no se replica en hígado o que se exporta rápidamente, coincidiendo con los resultados de otros autores (Laskus y cols., 1997; Fabris y cols., 1998; Laskus y cols., 1998b; Laskus y cols., 1998c; Pessoa y cols., 1998; Kao y Chen, 1999; Kao y cols., 1999; Kobayashi y cols., 1999; Laras y cols., 1999; Handa y Brown, 2000; Bowden, 2001). La presencia de la cadena genómica del VHG en un pequeño número de muestras de tejido hepático podría ser debida a contaminación procedente del suero, ya que es muy difícil garantizar la separación completa de los hepatocitos (Theodorf y Lemon, 1997; Laras y cols., 1999; Shindo y cols., 1999). También podría ser un reflejo de la infección por el VHG de células hematopoyéticas y/o células endoteliales vasculares presentes en el hígado (Handa y Brown, 2000). Se pudo descartar que se hubiera dado degradación del ARN en las muestras de tejido

hepático, ya que en esas mismas muestras se detectó el ARN-VHC con éxito. Este ARN serviría como control para demostrar que no se había producido degradación del ARN, de la misma manera que otros autores analizan ARN mensajero (Madejón y cols., 1998). La ausencia de replicación hepática del VHG estaría en concordancia con la poca o nula evidencia clínica de patogenicidad hepática por parte del VHG (Laras y cols., 1999).

En este estudio se pudo comprobar también que la replicación hepática del VHC no se veía afectada por la coinfección con el VHG. Este dato apoya una vez más la hipótesis de que el VHG no es hepatotropo, ya que se ha demostrado en otros estudios que la presencia de dos virus diferentes en el hígado puede hacer que se produzcan interferencias entre ambos, como ocurre con el VHB y el VHC (Liaw y cols., 1992; Liaw, 1995; Pramoolsinsap y cols., 1999). Además, hay estudios en los que los autores detectan la cadena antigenómica del VHG en hígado y observan que la infección por el VHG y su posible replicación en este órgano no afecta a la clínica ni a la viremia hepática del VHC (Madejón y cols., 1997; Pessoa y cols., 1998).

El hecho de que no se detectara la cadena antigenómica del VHG en hígado también sirvió para apoyar la ausencia de falsos positivos en el análisis de esta cadena en CMSP, ya que la técnica empleada era la misma.

Se pudo comprobar que la coinfección con el VHG no afectaba significativamente a los niveles de ARN-VHC en suero, coincidiendo

con Pessoa y cols. (1998) y en contraposición a los resultados de otros autores (Tanaka y cols., 1996; Brandhagen y cols., 1999). En este estudio se puede observar una tendencia a la existencia de una mayor concentración de ARN-VHC en suero en pacientes no coinfectados con el VHG, pero no hay diferencias significativas.

Tampoco se encontraron diferencias en la distribución de genotipos del VHC entre pacientes coinfectados con el VHG y pacientes no coinfectados, como ocurría en el estudio de Brandhagen y cols. (1999) y discrepando con los resultados de Berenguer y cols. (1996).

Se observó que la presencia de la cadena genómica y la antigenómica del VHC en CMSP es independiente de la concentración de ARN-VHC en suero. Esto coincide con los resultados de Lerat y cols. (1998) y corrobora la idea de que las CMSP no son el sitio principal de replicación del VHC, ya que si lo fueran contribuirían de alguna forma al aumento de la concentración de ARN-VHC. Además, tampoco se encontraron diferencias en cuanto al genotipo en los pacientes que presentaban el VHC en las CMSP y en los que no lo tenían. Lerat y cols. (1998) defienden un diferente tropismo celular entre el genotipo 1 y el 2, pero en este estudio no se había incluido ningún paciente con genotipo 2, por lo que no se pudo comprobar este hecho. En cuanto al genotipo 1 y al 3a se vio que no había diferencias, coincidiendo con Kao y cols. (1997).

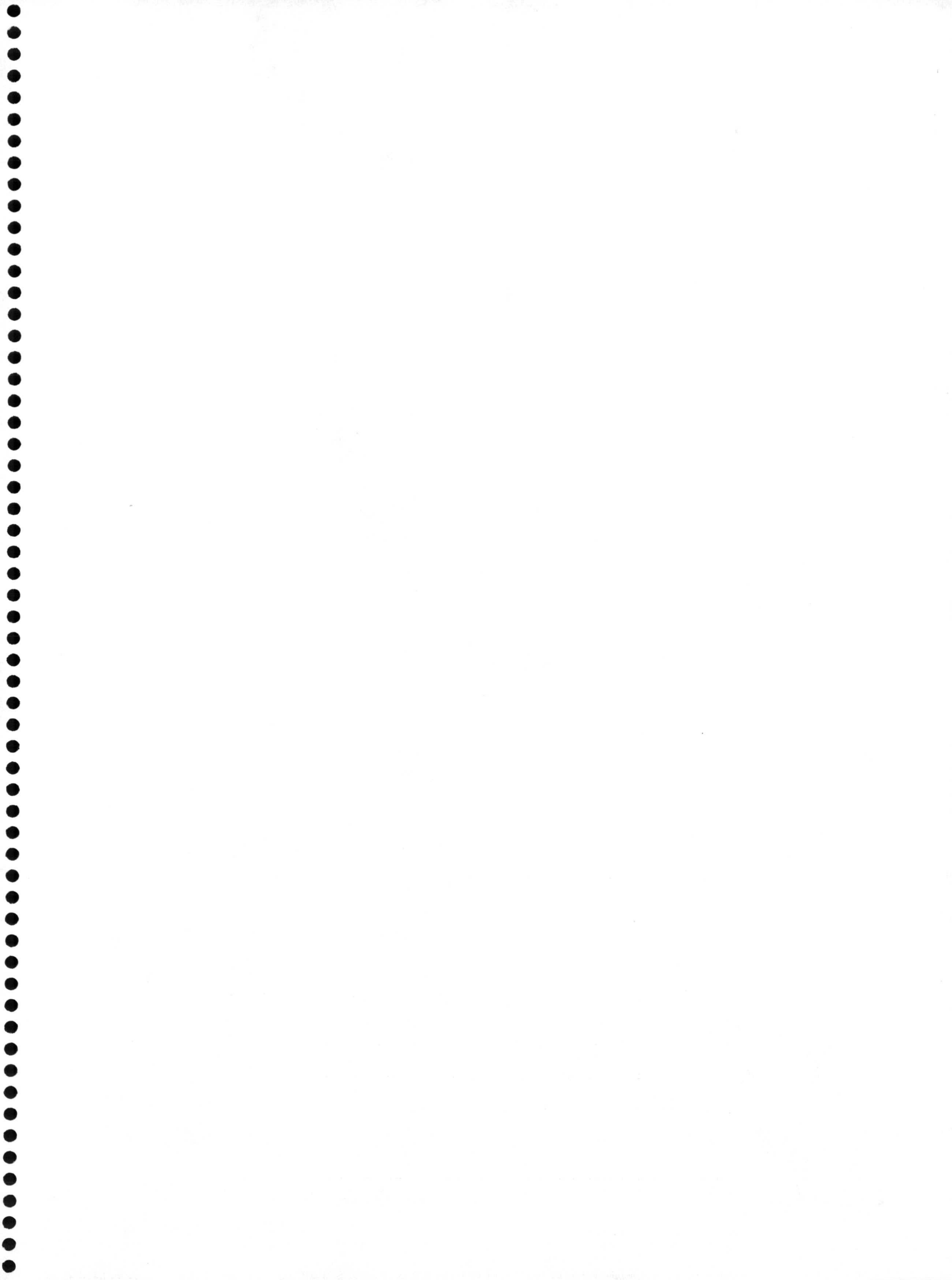
En cuanto a la relación entre la concentración en suero del ARN-VHC o el genotipo y la presencia de cadena antigenómica del VHC en

hígado, en nuestro caso apareció la genómica en todos los casos y la antigenómica en la mayoría de las muestras analizadas, independientemente de factores como la viremia, el genotipo o la presencia del VHG en suero. Coincidiendo con Negro y cols. (1998a), podemos decir que la replicación del VHC en hígado es independiente de la concentración de ARN-VHC en suero y del genotipo causante de la infección.

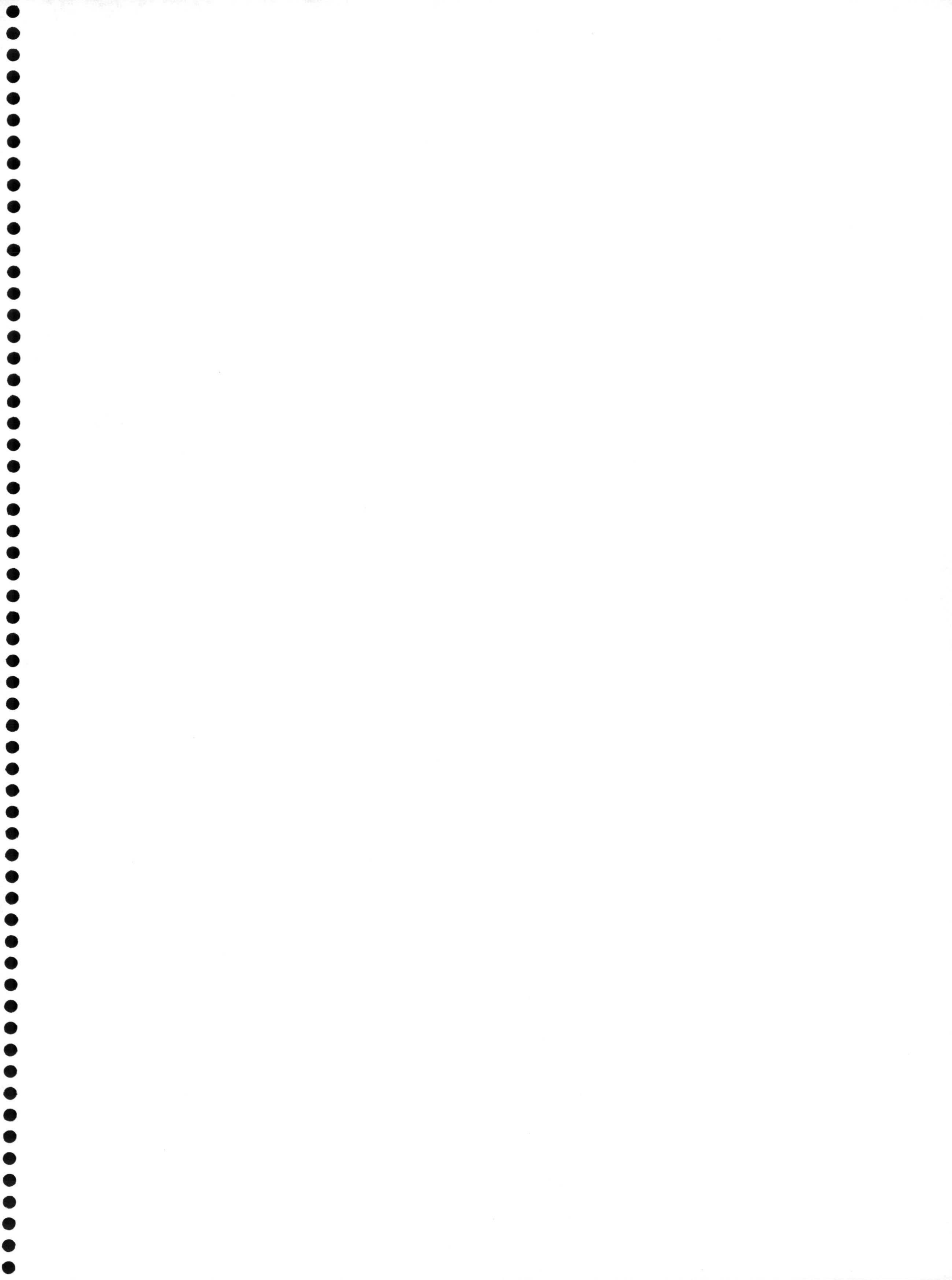
Los niveles de ALT fueron similares en aquellos pacientes que presentaban cadena antigenómica del VHC en CMSP y en los que carecían de ella, por lo que la replicación en CMSP no afectaría al daño hepático. Esto coincide con el estudio de Lerat y cols. (1998). Las células funcionarían más bien como reservorio del virus.

En este estudio se pudo comprobar que la presencia de cadena antigenómica en hígado (señal de replicación activa) condicionaba una mayor gravedad en la lesión hepática. Estos datos no coinciden con los de Negro y cols. (1998a), que sugieren que el VHC se puede replicar sin inducir evidencias morfológicas de daño hepático, pero sí con los resultados de Chang y cols. (2000), que establecían una correlación entre la cadena antigenómica en hígado y la lesión hepatocelular. En este caso hay diferentes indicios de que la replicación activa del virus hace que la lesión hepática sea más grave, ya que además de hallarse una mayor severidad de la enfermedad en pacientes con antigenómica positiva en hígado, los pacientes que también presentaban esta cadena en suero tenían unos niveles mayores de ALT, lo que representaría una lisis de hepatocitos y por tanto un avance de la enfermedad.

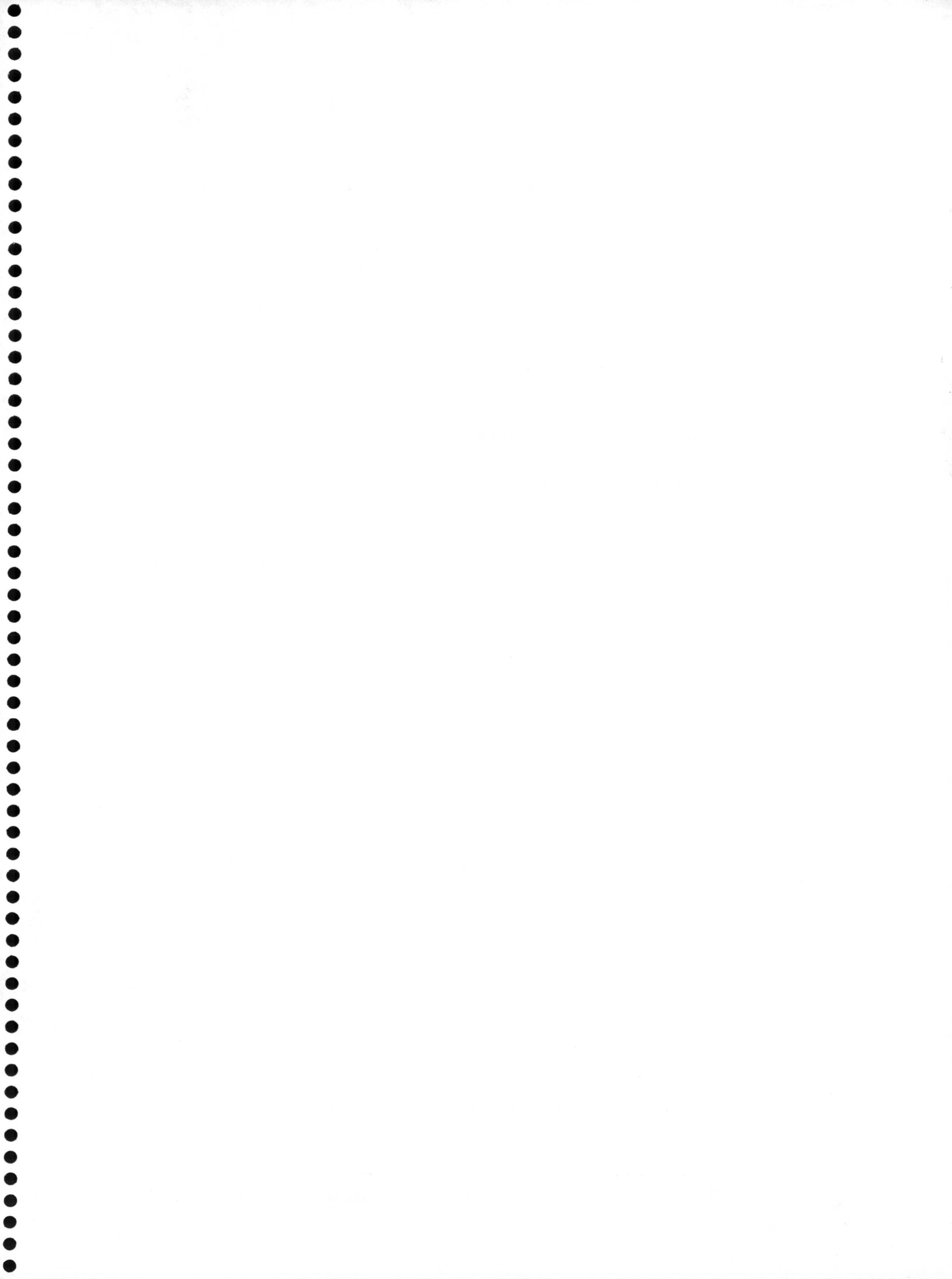
6. CONCLUSIONES



1. La prevalencia de la coinfección con el VHG en pacientes con HCC fue del 12,8% y los factores epidemiológicos de los enfermos coinfectados fueron similares a los de los enfermos no coinfectados.
2. El VHC es capaz de infectar las CMSP y replicarse en ellas, aunque no es el lugar más importante para su multiplicación ya que es un virus eminentemente hepatotropo.
3. La presencia del VHG no afecta a la distribución, replicación o viremia del VHC ni aumenta su patogenicidad.
4. El VHG es capaz de infectar las CMSP y replicarse en ellas.
5. El VHG no es un virus hepatotropo.



7. BIBLIOGRAFÍA



- Ahmed R, Hahn CS, Somesunderan T, Villarete L, Madloubian M, Strauss JM. Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J Virol* 1991; 65: 4242-4247.
- Aikawa T, Sugai Y, Okamoto H. Hepatitis G infection in drug abusers with chronic hepatitis C. *N Eng J Med* 1996; 334: 195-196.
- Alison MED, Wreghit T, Palmer CR, Alexander GJM. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhosis population. *J Hepatol* 1994; 21: 1135-1139.
- Almeida JD, Deinhardt F, Holmes AW, Peterson DA, Wolfe L, Zuckerman AJ. Morphology of the GB hepatitis agent. *Nature* 1976; 261: 608-609.
- Alter HJ, Holland PV, Purcell RH y cols. Transfusion hepatitis after exclusion of comercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972; 77: 691-699.
- Alter MJ, Gallagher M, Morris TT, Moyer LA, Meeks EL, Krawczynsky K, Kim JP, Margolis HS, for the Sentinel Counties Viral Hepatitis Study Team. Acute non-A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G virus infection. *N Engl J Med* 1997; 336: 741-746.
- Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY y cols. Risk factors for acute non-A non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990; 264: 2231-2235.

- Artini M, Natoli G, Avantaggiati ML y cols. Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in peripheral blood mononuclear cells from chronic HCV carriers. *J Hepatol* 1992; 17(S1): S13.
- Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 1409-1417.
- Belli LS, Ideo G, Silini E. Hepatitis G virus and post-transplantation hepatitis. *N Engl J Med* 1996; 335: 1394-1395.
- Berenguer M, Terrault NA, Piatak M, y cols. Hepatitis G virus infection in patients with hepatitis C virus infection undergoing liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 11: 1569-75.
- Berg T, Dirla U, Naumann U, Heuft HG, Kuther S, Lobeck H y cols. Responsiveness to interferon alpha treatment in patients with chronic hepatitis C coinfecting with hepatitis G virus. *J Hepatol* 1996; 25: 763-768.
- Berg T, Klein R, Zanger U, Hopf U, Berg PA. Relation between hepatitis G and anti-LKM1 positive autoimmune hepatitis type II (AIH II). *J Hepatol* 1997; 26 (Suppl 1): 180.
- Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zeldis JB. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1276-1280.

- Bourliere M, Halfon P, Gerolami V y cols. Vertical transmission of hepatitis G virus (HGV) in HCV- infected pregnant women: molecular analysis. *J Hepatol* 1997; 26 (Suppl 1): 86.
- Bowden S. New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol* 2001 Feb; 16(2): 124-131.
- Bradley DW, Maynard JE, Popper H y cols. Posttransfusion non A non B hepatitis: physiochemical properties of two distinct agents. *JID* 1983; 148: 254-265.
- Bralet MP, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Bastie A, Tran Van Nhieu J, Duval J, Dhumeaux D, Zafrani ES. Histopathologic impact of GB virus C infection on chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 112(1): 188-192.
- Brandhagen DJ, Gross JB, Poterucha JJ, Charlton MR, Detmer J, Kolberg J, Gossard AA, Batts KP, Kim WR, Germer JJ, Wiesner RH, Persing DH. The clinical significance of simultaneous infection with hepatitis G virus in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(4): 1000-1005.
- Bréchet C, Jaffredo F, Lagorce D, Gerken G, Büschenfelde KM, Papakonstantinou A y cols. Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: results of a european concerted action. *J Hepatol* 1998; 29: 173-183.
- Capra F, Gabrielli GB, De Maria E y cols. HCV-HGV infection: a clinico-therapeutic comparison with single HCV infection. *J Hepatol* 1997; 26(S1): 201.

- Cathomas G, Delarive J, McGandy CE y cols. Hepatitis G in liver tissue of patients with chronic hepatitis C: absence of clinical and histological differences in patients with hepatitis G coinfection. *J Hepatol* 1997; 26 (S1): 186.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 649-688.
- Chang M, Marquardt AP, Wood BL, Williams O, Cotler SJ, Taylor SL, Carithers RL Jr, Gretch DR. In situ distribution of hepatitis C virus replicative-intermediate RNA in hepatic tissue and its correlation with liver disease. *J Virol* 2000; 74(2): 944-955.
- Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: Definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J Virol* 1992; 66: 6547-6554.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- Colombo M, Del Ninno E, De Franchis R y cols. Ultrasound assisted percutaneous liver biopsy: superiority of the Tru-Cut over the

- Menghini needle for diagnosis of cirrhosis. *Gastroenterology* 1988; 95: 487.
- Deinhardt F, Peterson D, Cross G, Wolfe L, Holmes AW. Hepatitis in marmosets. *Am J Med Sci* 1975; 270: 73-80.
- Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of disease of human viral hepatitis to marmoset monkey. Transmission of disease, serial passage and description of liver lesions. *J. Exp Med* 1967; 125: 673-687.
- Di Martino V, Saurini F, Samuel D, Gigou M, Dussaix E, Reynès M, Bismuth Hy cols. Long-term longitudinal study of intrahepatic hepatitis C virus replication after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 26: 1343-1350.
- Diamantis Y, Bassetti S, Erb P, Ladewig D, Gyr K, Battegay M. High prevalence and coinfection rate of hepatitis G and C infections in intravenous drug addicts. *J Hepatol* 1997; 26: 794-797.
- Dienstag JL, Wagner JA, Purcell RH y cols. Virus-like particles and GB agent hepatitis. *Nature (London)* 1976; 264: 260-261.
- Ellenrieder V, Weidenbach H, Frickhofen N, Michel D, Prümmer O, Klatt E y cols. HCV and HGV in B-cell non Hodgkin's linphoma. *J Hepatol* 1998; 28: 34-39.
- Enamoto M, Nishiguchi S, Fukuda K, Kuroki T, Tanaka M, Otani S y cols. Characteristics of patients with hepatitis C virus with and

without GB virus C/hepatitis G virus co-infection and efficacy of interferon alfa. *Hepatology* 1998; 27: 1388-1393.

Esteban J, González A, Hernández J y cols. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J med* 1990; 323: 1107-1112.

Fabris P, Biasin MR, Benedetti P, Tositti G, Marchelle G, Di Fabrizio N y cols. Close association between HCV and HGV in serum, saliva and semen of patients with chronic C active hepatitis (CAH). *J Hepatol* 1997; 26 (S1): 89.

Fabris P, Biasin MR, Infantolino D, Romano L, Benedetti P, Tositti G, Pellizzer GP, Zanetti AR, Stecca C, Marchelle G, de Lalla F. HGV/GBV-C in liver tissue and in sera from patients with chronic hepatitis C. *Infection* 1998; 26(5): 283-287.

Fagan EA, Ellis DS, Portmann B, Tovey GM, Williams R, Zuckerman AJ. Microbial structures in a patient with sporadic non A, non B fulminant hepatitis treated by liver transplantation. *J Med Virol* 1987; 22: 189-198.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH y cols. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292: 767-770.

Feray C, Samuel D, Thiers V y cols. Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *J Clin Inves* 1992; 89: 1361-1365.

- Feucht HH, Zölner B, Polywka S, Laufs R. Vertical transmission of hepatitis G. *Lancet* 1996; 347: 615-616.
- Fong TL, Shindo M, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Bisceglie AMD. Detection of replicative intermediate of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Invest* 1991; 88: 1058-1060.
- Francesconi R, Giostra F, Ballardini G, Manzin A, Solforosi L, Lari F, Descovich C, Ghetti S, Grassi A, Bianchi G, Zauli D, Clementi M, Bianchi FB. Clinical implications of GBV-C/HGV infection in patients with "HCV-related" chronic hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26(6): 1165-1172.
- Fried MW, Shindo M, Fong TL, Fox PC, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992; 102: 1306-1308.
- Fukushi S, Katayama K, Kurihara C y cols. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem Biophys Commun* 1994; 199: 425-432.
- Garson JA, Tedder R, Briggs M. Detection of hepatitis C viral sequences in non A non B hepatitis. *Lancet* 1990; 335:1419-1422.
- Gil B, Qian C, Riezu-Boj JI, Civeira MP, Prieto J. Hepatic and extrahepatic HCV RNA strands in chronic hepatitis C: different

- patterns of response to interferon treatment. *Hepatology* 1993; 18: 1050-1054.
- Goeser T, Seipp S, Wahl R, Muller HM, Stremmel W, Theilmann L. Clinical presentation of GB-C virus infection in drug abusers with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1997; 26: 498-502.
- Guilera M, Ampurdanés S, Olmedo E, López-Labrador FX, Parés A, Castells A, y cols. Infección por el virus G en las hepatopatías crónicas. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20: 90-94.
- Gunji T, Kato N, Hijikata M, Hayashi K, Saitoh S, Shimotohno K. Specific detection of positive and negative stranded hepatitis C viral RNA using chemical RNA modification. *Arch Virol* 1994; 134: 293-302.
- Haagsma EB, Cuypers TM, Gouw ASH, Sjerps MC, Huizenga JR, Slooff MJH, Jansen PLM. High prevalence of hepatitis G virus after liver transplantation without apparent influence on long-term graft function. *J Hepatol* 1997; 26: 921-925.
- Hadziyannis S, Rodes J, Bruix J, Naoumov N, Williams R, Gerken G y cols. Impact of HBV, HCV and HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: results of an European Concerted Action. *J Hepatol* 1997; 26 (S1): 139.
- Hadziyannis S, Wages J, Kim JP, Karayiannis P, Hess G, Piatak M y cols. Frequency of viraemia with a new hepatitis virus (HGV) in patients with liver disease and in groups at high risk of exposure to blood and blood products. *J Hepatol* 1995; 23 (S1): 78.

- Halasz R, Barkholt L, Lara C, Hultgren C, Ando Y, Broomé U y cols. Relation between GB virus C/hepatitis G virus and fulminant hepatic failure may be secondary to treatment with contaminated blood and/or blood products. *Gut* 1999; 44: 274-278.
- Handa A, Brown KE. GB virus C/hepatitis G virus replicates in human haematopoietic cells and vascular endothelial cells. *J Gen Virol* 2000; 81: Pt 102461-9.
- Hase T, Summers PL, Eckels KH. Flavivirus entry into culture mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol* 1989; 104: 129-143.
- Heringlake S, Osterkamp S, Trautwein C y cols. Association between fulminant hepatic failure and a strain of GBV-C virus C. *Lancet* 1996a; 348: 1626-1629.
- Heringlake S, Tillmann HL, Cordes-Temme P, Trautwein C, Hunsmenn G, Manns MP. GBV-C/HGV is not the major cause of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1996b; 25: 980- 984.
- Hollinger FB, Mosley JW, Szmuness W y cols. Transfusion transmitted viruses study: experimental evidence of two non A non B hepatitis agents. *JID* 1980; 142: 400-407.
- Houghton M, Weiner A, Han J y cols. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-388.

- Inoue T, Sakamoto M, Akahane Y, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Response to interferon of GB virus C and hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(11): 1981-1985.
- Inoue K, Yoshida M, Sekiyama K, Kohara M. Possible association between serum GB virus C RNA level and disease activity in fulminant hepatitis type G. *J Hepatol* 1999; 30: 801-806.
- Jarvis LM, Bell H, Simmonds P y cols. The effect of treatment with alpha-interferon on hepatitis g/gbv-c viraemia. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33(2): 195-200.
- Jarvis LM, Davidson F, Hanley JP, Yap PL, Ludlam CA, Simmonds P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet* 1996; 348: 1352-1355.
- Jeffers LJ, Piatak M, Bernstein DE, Reddy KR, Lifson JD, Yun A y cols. Hepatitis G virus infection in patients with acute and chronic liver disease of unknown aetiology. *Hepatology* 1995; 22 (S): 182A.
- Kao J, Chen D. GB virus-C/hepatitis G virus infection in Taiwan: a virus that fails to cause a disease? *J Biomed Sci* 1999; 6(4): 220-225.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DSH. GBV-C/HGV infection and aplastic anaemia. *Lancet* 1996; 348: 1032-1033.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Wang TH, Chen DS. Positive and negative strand of hepatitis C virus RNA sequences in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C: no

- correlation with viral genotypes 1b, 2a, and 2b. *J Med Virol* 1997; 52: 270-274.
- Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Liver and peripheral blood mononuclear cells are not major sites for GB virus-C/hepatitis G virus replication. *Arch Virol* 1999; 144(11): 2173-2183.
- Karayiannis P, Petrovic LM, Fry M y cols. Studies of GB hepatitis agent in tamarins. *Hepatology* 1989; 9: 186-192.
- Keys B, Karis J, Fadeel B, Valentin A, Norkrans G, Hagberg L, Chiodi F. V3 sequences of paired HIV-1 isolates from blood and cerebrospinal fluid cluster according to host and show variation related to the clinical stage of disease. *Virology* 1993; 196: 475-483.
- Knodell R, Ishak K, Black W y cols. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435.
- Kobayashi M, Tanaka E, Nakayama J, Furuwatari C, Katsuyama T, Kawasaki S, Kiyosawa K. Detection of GB virus-C/hepatitis G virus genome in peripheral blood mononuclear cells and liver tissue. *J Med Virol* 1999; 57(2): 114-121.
- Koonin EV, Dolja VV. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993; 28: 375-430.

- Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1967; 200: 365-373.
- Kubo S, Nishiguchi S, Kuroki T, Horohashi K, Tanaka H, Tsukamoto T y cols. Poor association of GBV-C viraemia with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27: 91-95.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positive results with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238.
- Kwok S. Procedures to minimize PCR-product carry-over. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. 1990. ISBN 0-12-372180-6.
- Lamoril J, Andant C, Bogard C, Puy H, Gouya L, Pawlotsky JM y cols. Epidemiology of hepatitis C and G in sporadic and familial porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1998; 27: 848-852.
- Lanford R, Chavez D, Chisari FV, Sureau C. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and others extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcription PCR. *J Virol* 1995; 69: 8079-8083.
- Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuest TR. Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with HCV using strand specific RT/PCR. *Virology* 1994; 202: 606-614.

- Laperche S, Desassis JF, Girault A y cols. Prevalence of hepatitis G virus infection in dialysis patients. *Gastroenterol Clin Biol* 1997; 21: A 96.
- Laras A, Zacharakis G, Hadziyannis SJ. Absence of the negative strand of GBV-C/HGV RNA from the liver. *J Hepatol* 1999; 30: 383-388.
- Laskus T, Radkowski M, Piasek A, Nowicki M, Horban A, Cianciara J, Rakela J. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000a; 181(2):442-448.
- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Nowicki M, Rakela J. Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* 2000b; 74(2): 1014-1017.
- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. *J Virol* 1998c; 72: 3072-3075.
- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients co-infected with hepatitis C and G viruses. *J Virol* 1997; 71: 7804-7806.

- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 1998b; 28: 1398-1401.
- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. The presence of active hepatitis C virus replication in lymphoid tissue in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1998a; 178(4): 1189-1192.
- Lau JY, Qian K, Detmer J. Effect of interferon-alpha and ribavirin therapy on serum GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) RNA levels in patients chronically infected with hepatitis C virus and GBV-C/HGV. *J Infect Dis* 1997; 25: 421-426.
- Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN y cols. Consensus oligonucleotide primers for the detection of GB virus C in human cryptogenic hepatitis. *J Virol Methods* 1996b; 56: 119-121.
- Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN y cols. The sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the Flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol* 1996a; 48: 60-67.
- Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Jouvert L, Brossard Y, Parnet-Mathieu F, Mariotti M y cols. Prevalence of GB virus type C/hepatitis G virus RNA and of anti-E2 in individuals at high or low risk for blood-borne or sexually transmitted viruses: evidence

- of sexual and parenteral transmission. *Transfusion* 1999a; 39: 83-94.
- Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, Mariotti M. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis* 1999b; 179(4): 783-789.
- Lenzi M, Johnson PJ, McFarlane IG, y cols. Antibodies to hepatitis C virus in autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity. *Lancet* 1991; 338: 277-280.
- Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trépo C, Inchauspé G. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998; 91: 3841-3849.
- Liaw YF, Chien RN, Chen TJ y cols. Concurrent hepatitis C virus and hepatitis delta virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 1992; 37: 294-297.
- Liaw YF. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 1995; 22(4): 1101-1108.
- Lin HH, Kao JH, Chen PJ, Chen DS. Mechanism of vertical transmission of hepatitis G. *Lancet* 1996; 347:1116.
- Lin HH, Lee TY, Chen DS, Sung JL, Ohto H, Etoh T y cols. Transplacental leakage of HBeAg positive maternal blood as the

most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus. *J Pediatr* 1987; 11: 877-881.

Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H y cols. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-508.

Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the difference between two complex genomes. *Science* 1993; 259: 946-951.

Loiseau P, Mariotti M, Ravera N, Girot R, Thauvin M, Portelette E y cols. Prevalence of hepatitis G virus RNA RNA in French blood donors and recipients. *Transfusion* 1997; 37: 645-650.

López-Alcorcho JM, Millán A, García-Trevijano ER y cols. Detection of hepatitis GB virus type C RNA in serum and liver from children with chronic viral hepatitis B and C. *Hepatology* 1997; 25: 1258-1260.

Lou S, Qiu X, Leitz S, y cols. GBV-C E2 immunoassays to study prevalence of GBV-C in US blood donors. *J Hepatol* 1997; 26 (S1): 86.

Madejón A, Fogeda M, Bartolomé J, Pardo M, González C, Coconat T, Carreño V. GB virus C RNA in serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B, C, and D. *Gastroenterology* 1997; 113: 573-578.

- Manolakopoulos S, Morris A, Davies S, Brown D, Hajat S and Dusheiko G. Influence of GB virus C viraemia on the clinical, virological and histological features of early hepatitis C-related hepatic disease. *J Hepatol* 1998; 28: 173-178.
- Marcellin P, Pouteau M, Benhamou JP. Hepatitis C infection, alpha interferon therapy and thyroid dysfunction (Review). *J Hepatol* 1995; 22: 364-369.
- Martinot M, Marcellin P, Boyer N, Detmer J, Pouteau M, Castelnau C y cols. Influence of hepatitis G virus infection on the severity of liver disease and response to interferon alpha in patients with chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1997; 126: 874-881.
- Masuko K, Mitsui T, Iwano K, Yamaki C, Okuda K, Meguro T y cols. Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1996; 334: 1485-1490.
- McGuinness PH, Bishop GA, McCaughan GW, Trowbridge R, Gowans EJ. False detection of negative-strand hepatitis C virus RNA. *Lancet* 1994; 343: 551-552.
- McHutchison JG, Nainan OV, Alter MJ, Sedghi-Vaziri A, Detmer J, Collins M, Kolberg J. Hepatitis C and G co-infection: Response to interferon Therapy and quantitative changes in serum HGV-RNA. *Hepatology* 1997; 26: 1322-1327.
- McKnight A, Weiss RA, Shotton C, Takeuchi Y, Hoshino H, Clapham PR. Change in tropism upon immune escape by human immunodeficiency virus. *J Virol* 1995; 69: 3167-3170.

- Mellor J, Haydon G, Blair C, Livingston W, Simmonds P. Low levels or absent in vivo replication of HCV and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1998; 79: 705-714.
- Menghini G. One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterology* 1958; 35: 190.
- Miller RH, Paucell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2057-2061.
- Minton EJ, Tysoe C, Sinclair JH, Sissons JG. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J Virol* 1994; 68: 4017.
- Moaven LD, Locarnini SA, Bowden DS, Kim PJ, Breschkin A, McCaw R y cols. Hepatitis G virus and fulminant hepatic failure: evidence for transfusion-related infection. *J Hepatol* 1997; 27: 613-619.
- Moldvay J, Deny P, Pol S, Brechot C, Lamas E. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by *in situ* hybridization. *Blood* 1994; 83: 269-273.
- Muerhoff AS, Simons JN, Leary TP y cols. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol* 1996; 25: 379-384.

- Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ y cols. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995; 69: 5621-5630.
- Muratori L, Giostra F, Cataleta M, Francesconi R, Ballardini G, Cassani F, Lenzi M, Bianchi FB. Testing for hepatitis C virus sequences in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis C in the absence of serum hepatitis C virus RNA. *Liver* 1994; 14: 124-128.
- Nagayama R, Miyake K, Okamoto H. Effect of interferon on GB virus C and hepatitis C virus in hepatitis patients with the co-infection. *J Med Virol* 1997; 52(2): 156-160.
- Nakao S, Lai CJ, Young NS. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood* 1989;74:1235-1240.
- Navas S, Castillo I, Carreño V. Detection of plus and minus HCV-RNA in normal liver of anti-HCV-positive patients. *Lancet* 1993; 341: 904-905.
- Navas S. Determinación del RNA del virus C de la hepatitis en tejido. *Hepatología Clínica* Julio 1993: 171-184.
- Negro F, Giostra E, Krawczynski K, Quadri R, Rubbia-Brandt L, Mentha G, Colucci G y cols. Detection of intrahepatic hepatitis C virus replication by strand-specific semi-quantitative RT-PCR.

- Preliminary application to the liver transplantation model. *J Hepatol* 1998a; 29:1-11.
- Negro F, Krawczynski K, Quadri R, Rubbia-Bramdt L, Mondelli M, Zarski JP, Hadengue A. Detection of genomic- and minus-strand of hepatitis C virus RNA in the liver of chronic hepatitis C patients by strand-specific semiquantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Hepatology* 1999; 29: 536-542.
- Negro F, Levrero M. Does the hepatitis C virus replicate in cells of the hematopoietic lineage? *Hepatology* 1998b; 28: 261-264.
- Negro F, Pacchioni D, Shimizu Y y cols. Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RNA by *in situ* hybridization and comparison with histopathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2247-2251.
- Neilson J, Harrison P, Milligan DW, Skidmore SJ, Collingham KE. Hepatitis G virus in long-term survivors of haematological malignancy. *Lancet* 1996; 347: 1632-1633.
- Nouri-Aria KT, Sallie R, Sanger D y cols. Detection of genomic and intermediate replicative strands of hepatitis C virus in liver tissue by *in situ* hybridization. *J Clin Invest* 1993; 91: 2226-2234.
- Nuovo GJ, Lidonici K, MacConnell P, Lane B. Intracellular localisation of polimerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 683-690.

- Okumura A, Yoshioka K, Aiyama T, Takayanagi M, Iwata K, Ishikawa T, Kakumu S. Different constitution of hepatitis C virus population in peripheral blood mononuclear cells and plasma in patients with type C chronic liver disease. *Dig Dis and Sci* 1998; 43(2): 377-383.
- Orito E, Mizokami M, Yasuda K, Sugihara K, Nakamura M, Mukaide M y cols. Interferon-alpha therapy in patients dually infected with hepatitis C virus and GB virus C/hepatitis G virus. Virological response of HGV and pretreatment HGV viremia level. *J Hepatol* 1997; 27: 603-612.
- Oshita M, Hayashi N, Mita E, Llo S, Hiramatsu N, Hijioka T y cols. GBV-C/HGV infection in chronic hepatitis C patients: its effect on clinical features and interferon therapy. *J Med Virol* 1998; 55: 98-102.
- Papaevangelou V, Spanou E, Kattamis Ch y cols. GBV-C infection in multiply transfused thalassemia patients with chronic non A-E hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26 (Suppl 1): 91.
- Parks WP, Melnick JL. Attempted isolation of hepatitis viruses in marmosets. *J Infect Dis* 1969; 120: 539-547.
- Parks WP, Melnick JL, Voss WR, Singer DB, Rosemberg HS, Alcott J y cols. Characterisation of marmoset hepatitis virus. *J Infect Dis* 1969; 120: 548-559.
- Persico T, Thiers V, Tuveri R, Di Fine M, Semprini AE, Brechot C y cols. Detection of hepatitis G/GB-C viral RNA but not HCV RNA

in the different semen fractions of infected patients. *J Hepatol* 1995; 23 (Suppl 1): 78.

Pessoa MG, Terrault NA, Detmer J, Kolberg J, Collins M, Hassoba HM, Wright TL. Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology* 1998; 27: 877-880.

Petrit J, Guella L, Wight DG, Pearson GM, Hinton J, Parker H, Allain JP, Alexander GJ. Hepatic histology in hepatitis C virus carriers coinfecting with hepatitis G virus. *Gut* 1998; 42(1): 103-106.

Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Simons JN y cols. Identification of antigenic regions in the GB hepatitis viruses GBV-A, GBV-B and GBV-C. *J Med Virol* 1996; 48: 320-328.

Pontisso P, Poon MC, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *Br Med J* 1984; 288: 1563-1566.

Poutous A, Vargas H, Laskus T, Wang L, Radkowski M, Lee R y cols. Hepatitis G virus infection in HCV-positive liver transplant recipients. *Hepatology* 1996; 24: 420-423.

Powlotsky JM, Germanidis G, Huraux C y cols. Mother to infant transmission of GB virus C (GBV-C) and HCV in HCV-infected pregnant women. *Hepatology* 1996; 24: 225A.

Pramoolsinsap C, Sirikulchayanonta V, Busakorn W, Poovorawan Y, Hirsch P, Theamboonlers A, Lerdverasirikul P. Coinfections with

- hepatitis G and/or C virus in hepatitis B-related chronic liver disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30(4): 741-749.
- Qian C, Camps J, Maluenda MD, Civeira MP, Prieto J. Replication of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells. *J Hepatol* 1992; 16: 380-383.
- Quintero D, Salmerón J, Palacios A, Muñoz De Rueda P, Torres C, Rodríguez L, Caballero T, Ruiz-Extremera A. Estudio de la coinfección por el virus de la hepatitis G en la hepatitis crónica C. *Med Clin* 2000; 114(19): 726-729.
- Radkowski M, Kubicka J, Kisiel E, Cianciara J, Nowicki M, Rakela J, Laskus T. Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. *Blood* 2000; 95(12): 3986-3989.
- Radkowski M, Wang LF, Cianciara J, Rakela J, Laskus T. Analysis of hepatitis G virus/GB virus C quasispecies and replication sites in human subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258(2): 296-299.
- Radkowski M, Wang LF, Vargas HE, Rakela J, Laskus T. Detection of hepatitis C virus replication in peripheral blood mononuclear cells after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1998b; 66(5): 664-665.



- Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J, Laskus T. Lack of evidence for GB virus C/hepatitis G virus replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Hepatol* 1998a; 28: 179-183.
- Ruiz Extremera A, Rey ML, Torres C, Muñoz Rueda P, Carmona I, Quintero D y cols. Estudio retrospectivo de la incidencia de hepatitis postransfusional en recién nacidos de alto riesgo. *Gastroenterol Hepatol* 1998; 21: 8.
- Ruiz-Extremera A, Salmerón J, Torres C, Muñoz de Rueda P, Giménez F, Robles C, Miranda MT. Follow-up of transmission of hepatitis C to babies of immunodeficiency virus-negative women: the role of breast-feeding in transmission. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 511-516.
- Ruiz-Extremera A, Torres C, Cervilla E, Muñoz de Rueda P, Quintero D, Palacios A y cols. Estudio de la transmisión vertical del virus de la hepatitis G (VHG) y virus TT (VTT) en gestantes anti-VHC positivas. Seguimiento a largo plazo. *Rev And Patol Digest* 1999; 22: 65.
- Sáiz JC, Ampurdanés S, Olmedo E, López-Labrador FX, Forsn X, Guilera M y cols. Hepatitis G virus infection in chronic hepatitis C: frequency, features and response to interferon therapy. *J Hepatol* 1997; 26: 787-793.
- Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Asahina Y, Maekawa S, Koizumi K, Sakuma I, Murakami I, Marumo F, Sato C. Comparison of the

- hypervariable region of hepatitis C virus genomes in plasma and liver. *J Med Virol* 1995; 46: 7-11.
- Salmerón FJ, Carmona I, Torres C, Muñoz de Rueda P, Gila A, Ruiz-Extremera A. Estudio retrospectivo de la incidencia de infección por el virus de la hepatitis G en los pacientes transfundidos. *Med Clin (Barc)* 1999; 112: 409-411.
- Sangar DV, Carrol R. A tale of two strands: reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of hepatitis C virus replication. *Hepatology* 1998; 28(5): 1173-1176.
- Sansonno D, Lotesoriere C, Cornacchiulo V, Fanelli M, Gatti P, Iodice G, Racanelli V, Dammacco F. Hepatitis C virus infection involves CD34⁺ hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. *Blood* 1998; 92(9): 3328-3337.
- Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1994; 68: 3631-3641.
- Sarrazin C, Herrmann G, Roth WK, Lee JH, Marx S, Zeuzem S. Prevalence and clinical and histological manifestation of hepatitis G/GBV-C infection in patients with elevated aminotransferases of unknown etiology. *J Hepatol* 1997; 27: 276-283.
- Sata M, Ide T, Noguchi S, Suzuki H, Nagao Y, Tanikawa K. Negative-strand HCV RNA was not detected in bone marrow cells of patients with HCV infection. *Kurume Med J* 1998; 45(1): 39-43.

- Schlauder GG, Dawson GJ, Simons JN y cols. Molecular and serologic analysis in transmission of the GB hepatitis agents. *J Med Virol* 1995; 46: 81-90.
- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374.
- Schlueter V, Schmolke S, Stark K, Hess G, Ofenloch-Haehnle B, Engel AM. Reverse transcription-PCR detection of hepatitis G virus. *J Clin Microb* 1996; 34(11): 2660-2664.
- Schmidt B, Korn K, Fleckenstein B. Molecular evidence for transmission of hepatitis G virus by blood transfusion. *Lancet* 1996; 347: 909.
- Sherker AH, Twu S, Reyes GR, Robinson WS. Presence of viral replicative intermediates in the liver and serum of patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol* 1993; 39: 91-96.
- Sherman KE, O'Brien J, Gutiérrez AG, Harrison S, Urdea M, Neuwald P, Wilber J. Quantitative evaluation of hepatitis C virus RNA in patients with concurrent human immunodeficiency virus infections. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2679-2682.
- Shimizu H, Mitsuda T, Fujita S, Yokota S. Perinatal hepatitis B virus caused by anti-hepatitis B positive maternal mononuclear cells. *Arch Dis Child* 1991; 66: 718-721.
- Shimizu YK, Igarashi H, Kanematu T, Fuliwaea K, Wong DC, Purcell KA, Yoshikura H. Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver and peripheral blood

- mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol* 1997; 71: 5769.
- Shindo M, Arai K, Okuno T. Long-term follow-up of hepatitis G virus/GB virus C replication in liver during and after interferon therapy in patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *J Gastroenterol* 1999; 34(6): 680-687.
- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Med* 1995b; 1: 564-569.
- Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, Muerhoff AS, Erker JC, Buijk SL, Chalmers ML, Van Sant CL, Mushahwar IK. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995a; 92: 3401-3405.
- Simons JN, Mushahwar IK. Los virus GB de la hepatitis. *Hepatol Clin* 1996; 4:1-16.
- Stark K, Bienzle U, Hess G, Engel AM, Hegenscheid B, Schlüter V. Detection of hepatitis G virus genome injecting drug users, homosexual and bisexual men, and blood donors. *J Infect Dis* 1996; 174: 1320-1323.
- Tabor E, April M, Seeff LB. Acquired immunity to human non A non B hepatitis: cross-challenge of chimpanzees with three infectious human sera. *JID* 1979; 140: 789-793.

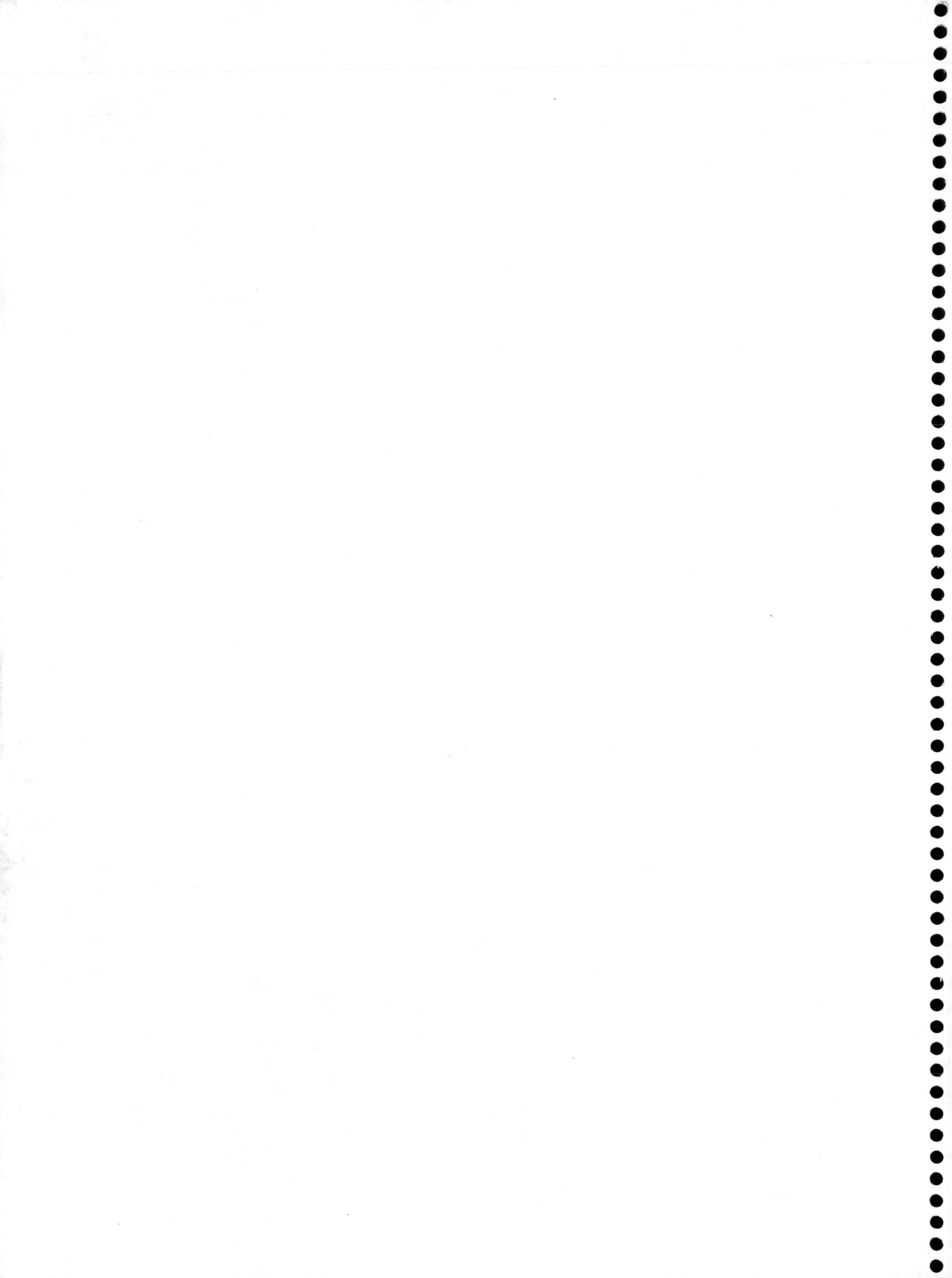
- Tacke M, Ofenloch-Haehnle B, Hess G y cols. HGV-E2 antibody: a marker for virus clearance?. *Hepatology* 1996; 24: 414A.
- Tagariello G, Infantolino D, Biasin MR, Davoli PG, Traldi A. Hepatitis G viral RNA in Italian haemophiliacs with and without hepatitis C infection. *Lancet* 1996; 348: 760-761.
- Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Tomasoni V, Portera G y cols. A case control study on GB virus C/hepatitis G virus infection and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 26: 1653-1657.
- Takeda S, Shibata M, Morishima T y cols. Hepatitis C virus infection in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1992; 70; 2255-2259.
- Takehara T, Hayashi N, Mita E, Hagiwara H, Ueda K, Katayama K, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Detection of the minus strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: implications for hepatitis C virus replication in infected tissue. *Hepatology* 1992; 15: 387-390.
- Taliani G, Badolato MC, Lecce R, Poliandri G, Bozza A, Duca F, Pasquazzi C, Clementi C, Furlan C, De Bac C. Hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: Relation with response to interferon treatment. *J Med Virol* 1995; 47; 16-22.
- Tameda Y, Kosaka Y, Tagawa S, Takase K, Sawada N, Nakao H y cols. Infection with GB virus C (GBV-C) in patients with fulminant hepatitis. *J Hepatol* 1996; 25: 842-847.

- Tanaka E, Alter HJ, Nakatsuji Y, Shih SWK, Kim JP, Matsumoto A y cols. Effect of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1996; 125: 740-743.
- Tanaka M, Nishiguchi S, Tanaka T, Enomoto M, Fukuda K, Takeda T y cols. Prevalence of GBV-C and hepatitis G virus variants in patients with fulminant hepatic failure in Japan. *J Hepatol* 1997; 27: 966-972.
- Theodorf D, Lemon SM. GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus? *Hepatology* 1997; 25: 1285-1286.
- Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, Hunt JC, Marshall R, Astemborki J, Nelson KE. Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis* 1998; 177(3): 539-542.
- Tibbs C, Williams R. Viral causes and management of acute liver failure. *J Hepatol* 1995; 22 (Suppl 1): 68- 73.
- Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C y cols. Prevalence of GBV-C RNA and E2 antibodies in liver transplant recipients: E2 antibodies protect from GBV-C infection. *J Hepatol* 1997; 26 (Suppl 1): 69.
- Tobin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.

- Toniutto P, Ferroni P, Gasparini V y cols. Detection of hepatitis G virus infection by enzyme immunoassay and polymerase chain reaction. *Hepatology* 1996; 24: 414A.
- Tsutsumi M, Sawada M, Ueshima WB, Hawahara H, Takase S. Prevalence of hepatitis G virus in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1996; 24: 591-594.
- Tucker TJ, Smuts HE, Eedes C, Knobel GD, Eickhaus P, Robson SC, Kirsch RE. Evidence that the GBV-C/hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J Med Virol* 2000; 61(1): 52-58.
- Uzunlimoglu O, Sipahi N, Dokmeci A, Ozden A, Sumer N, Kesim E, Centikaya H y cols. A link between hepatitis C infection and diabetes mellitus in a Mediterranean population. *J Hepatol* 1995; 23(S1): 179.
- Villari D, Raimondo G, Freni MA y cols. Histological behaviour of chronic hepatitis in patients treated with alpha interferon. *Pathology* 1992; 24: 243-246.
- Wang JT, Sheu JC, Lin JT, Wang TH, Chen DS. Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Infec Dis* 1992a; 166: 1167-1169.
- Wang JT, Tsai FCh, Lee ChZ, Chen PJ, Sheu JC, Wang TH y cols. A prospective study of transfusion-transmitted GB virus C infection: similar frequency but different clinical presentation compared with hepatitis C virus. *Blood* 1996; 88: 1881-1886.

- Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin JT, Chen DS. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses. *J Med Virol* 1992b; 36: 28-31.
- Wartelle C, Gerolami V, Planells R y cols. Impact of HGV / GBV-C infection on patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1997; 26 (Suppl 1): 216.
- Weiner AJ, Bonino F, Rosenblatt J y cols. Detection of hepatitis C viral sequences in non A non B hepatitis. *Lancet* 1990; 355: 1-3.
- Westaway EG. Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res* 1987; 33: 45-90.
- Willems M, Moshage H, Yap SH. PCR and detection of negative HCV RNA strands. *Hepatology* 1993; 17: 526.
- Willems M, Peerlinck K, Moshage H, Deleul, Van den Eynde C, Vermylen J, Yap SH. Hepatitis C virus-RNAs in plasma and in peripheral blood mononuclear cells of hemophiliacs with chronic hepatitis C: Evidence for viral replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1994; 42: 272-278.
- Yoo BJ, Spaete RR, Geballe AP, Selby M, Houghton M, Han JH. 5' end-dependent translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translational control elements within the 5' untranslated region. *Virology* 1992; 191: 889-899.

- Yoshizawa H, Itoh Y, Iwakiri S y cols. Demonstration of two different types of non A non B hepatitis by reinjection and crosschallenge studies in chimpanzees. *Gastroenterology* 1981; 81: 107-113.
- Young KC, Chang TT, Liou TC, Wu HL. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. *J Med Virol* 1993; 41: 55-60.
- Yun ZB, Lindh G, Weiland O, Johanson B, Sonnerborg A. Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA by PCR related to antibodies in serum and liver histology in Swedish blood donors. *J Med Virol* 1993; 39: 57-61.
- Zampino R, Pickering J, Iqbal M, Gaud U, Thomas HC, Karayiannis P. Hepatitis G virus/GBV-C persistence: absence of hypervariable E2 region an genetic analysis of viral quasispecies in serum and lymphocytes. *J Viral Hepat* 1999; 6(3): 209-218.
- Zignego AL, De Carli M, Monti M, Careccia G, La Villa G, Giannini C, D'Elios NM, Del Prete G, Gentilini P. Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in crhronically infected patients. *J Med Virol* 1995; 47: 58-64.
- Zignego AL, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti, Foschi M, Maggi E, Romagnani S, Gentilini P, Bréchet C. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 1992; 15: 382-386.
- Zuckerman AJ. Alphabet of hepatitis viruses. *Lancet* 1996; 347: 558-559.





Biblioteca Universitaria de Granada



01066532