

T 23853

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina



* 5 3 0 9 8 8 5 2 9 9 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-397568-4

**“VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS VIRUS C Y G DE LA
HEPATITIS EN PACIENTES COINFECTADOS”**

Tesis Doctoral

M^a Luisa Manzano Alonso

Madrid, 1999



BIBLIOTECA

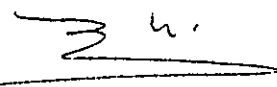
INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

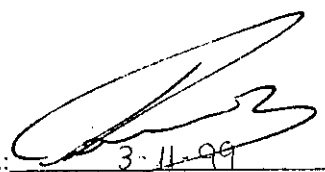
DR. D. VICENTE CARREÑO GARCÍA, JEFE DE SERVICIO DE HEPATOLOGIA DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

INFORMO: que el trabajo realizado por D^a M^a LUISA MANZANO ALONSO titulado: "VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS VIRUS C Y G DE LA HEPATITIS EN PACIENTES COINFECTADOS", reúne los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis doctoral. Los resultados obtenidos en este trabajo son originales, y con él, el doctorando demuestra haber alcanzado los objetivos docentes pretendidos por el tercer ciclo de los estudios universitarios, ya que prueba que está capacitado para generar hipótesis de trabajo, plantear y realizar la metodología requerida para lograr los objetivos, y para presentar los resultados y discutirlos de forma adecuada.

Vº Bº
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis


Fdo.: 3/11/1999
(Fecha y firma)
DNI 334527


Fdo.: 3-11-99
(Fecha y firma)
DNI 267440

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

DR. D. EDUARDO DÍAZ-RUBIO , DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORMO: Que una vez examinado el Trabajo presentado por D^a. M^a LUISA MANZANO ALONSO titulado: "VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS VIRUS C Y G DE LA HEPATITIS EN PACIENTES COINFECTADOS", dirigido por el Dr. D. VICENTE CAREÑO GARCÍA Y TUTOR D. JOSÉ ANTONIO SOLIS HERRUZO, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

El Director del Departamento

25 NOV. 1999



Fdo.: Eduardo Díaz Rubio
(Fecha y firma)

*A mis padres, que me lo han dado todo, y a mis
hermanos, por su aliento y su comprensión*

A Inés

*A mi estimado compañero y mejor amigo,
a Carlos*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vicente Carreño, director de esta tesis, quiero agradecerle la confianza que depositó en mí para la realización de este trabajo y, por supuesto, su estímulo constante.

Al Dr. José Antonio Solís, que me enseñó gran parte de lo que sé de la especialidad de Aparato digestivo, por su apoyo y su colaboración como tutor de esta tesis.

A todos los miembros del Servicio de Hepatología, especialmente a M^a José, que tanto tiempo dedicó a este trabajo, por su paciencia y por su inestimable ayuda.

A Carmen, por estar tan cerca de mi en los momento especiales, y a Cristina, siempre dispuesta a ayudarme.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	1
I.1.1. Epidemiología y vías de transmisión.....	1
I.1.2. Biología molecular del virus C.....	4
I.1.2.1. Estructura genómica del virus C.....	4
I.1.2.2. Variabilidad genética del virus C.....	7
I.1.3. Manifestaciones clínicas e historia natural de la hepatitis C.....	12
I.1.3.1. Hepatitis aguda por el virus C.....	12
I.1.3.2. Hepatitis crónica por el virus C.....	13
I.1.3.3. Manifestaciones extrahepáticas de la infección por el virus C.....	15
I.1.4. Diagnóstico de la infección por el virus C.....	17
I.1.4.1. Métodos serológicos.....	17
I.1.4.2. Métodos de biología molecular.....	18
I.1.5. Tratamiento de la infección por el virus C con Interferon.....	23
I.2. VIRUS DE LA HEPATITIS G.....	30
I.2.1. Epidemiología y vías de transmisión.....	30
I.2.2. Biología molecular del virus G.....	32
I.2.3. Significado clínico de la infección por el virus G.....	33
I.2.3.1. Hepatitis aguda por el virus G.....	34
I.2.3.2. Hepatitis crónica por el virus G.....	35
I.2.3.3. Coinfección del virus G con el virus C.....	36
I.2.4. Diagnóstico de la infección por el virus G.....	38
II. OBJETIVOS.....	39
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
III.1. Pacientes.....	40
III.2. Métodos.....	43
III.2.1. Métodos de Laboratorio.....	43
III.2.2. Métodos de biología molecular.....	44
III.3. Análisis estadístico.....	50

IV. RESULTADOS.....	51
IV.1. Respuesta al tratamiento de los virus C y G en pacientes coinfectados.....	51
IV.2. Comparación de las características de pacientes coinfectados según la respuesta C y G.....	54
IV.3. SSCP de la región NS3 de los virus C y G.....	66
IV.4. Divergencia de las secuencias 5'UTR/NS3 de los virus C y G.....	69
V. DISCUSIÓN.....	71
VI. CONCLUSIONES.....	81
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	82

I.INTRODUCCIÓN

I.1. VIRUS DE LA HEPATITIS C

I.1.1. Epidemiología y vías de transmisión

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) presenta una distribución universal. Se considera que más de 500 millones de personas en el mundo se hallan infectadas por el VHC, con variaciones geográficas en la prevalencia de anticuerpos en suero frente al VHC (anti-VHC) que oscila entre el 0.3% en Canadá y Norte de Europa, el 0.6-0.8% en EEUU y centro de Europa, el 1.2-1.5% en Japón y sur de Europa y el 4-6% en África (1,2).

La transmisión del VHC se realiza fundamentalmente por vía *parenteral* o *percutánea*, por exposición directa a sangre y otros productos derivados contaminados, principalmente por transfusiones o por el uso de agujas contaminadas entre los adictos a drogas por vía parenteral (ADVP). Aproximadamente el 70% de los donantes con anti-VHC positivos por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) se confirman por RIBA (recombinant immunoblot assay) y la mayoría tiene lesión histológica hepática (3). Sin embargo, el dato más concluyente para determinar si un donante está infectado por el VHC sería la positividad del RNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). En la actualidad se estima que el riesgo de transmisión de la hepatitis C a través de sangre donada que ha pasado todas las pruebas de cribado reglamentarias (detección de anti-VHC) es inferior a 1 caso entre 103.000, reduciéndose el riesgo de hepatitis asociada a transfusión de un 0.19% a un 0.03% por unidad transfundida (4).

La prevalencia de infección en ADVP oscila entre el 60 y 90% y, a pesar de que en los últimos años se ha reducido considerablemente el número de casos de hepatitis aguda entre los usuarios de drogas vía parenteral, este grupo continúa representando la mitad de las infecciones adquiridas anualmente y, probablemente, el 50% o más de todas las infecciones crónicas por el VHC (5).

La prevalencia de infección por el VHC entre los pacientes en hemodiálisis es del 10-20% y, en estos casos, se suma el riesgo de las transfusiones al uso compartido de dializadores y las frecuentes venopunciones (6). Los pacientes receptores de trasplantes de órganos se consideran también población de alto riesgo para la hepatitis C (7).

Los profesionales sanitarios presentan un riesgo de infección por VHC ligeramente superior que el de la población general, si bien la tasa de infección tras el pinchazo accidental con aguja es bajo, oscilando entre el 5 y el 10%. Parece que el VHC puede haberse diseminado también iatrogénicamente a través de la utilización de agujas y jeringas no desechables, así como por la práctica de técnicas curativas tradicionales que incluyan la punción cutánea, como en el caso de la acupuntura. Aunque infrecuente, está documentada la transmisión del virus C a partir de cirujanos infectados y en los usuarios de drogas inhaladas (8).

La *transmisión vertical* (maternofilia) es infrecuente (aproximadamente de un 5%), excepto en los casos en que exista una elevada carga viral en suero materno, demostrándose un incremento en la posibilidad de transmisión si la viremia es mayor de 10^6 copias/ml, o

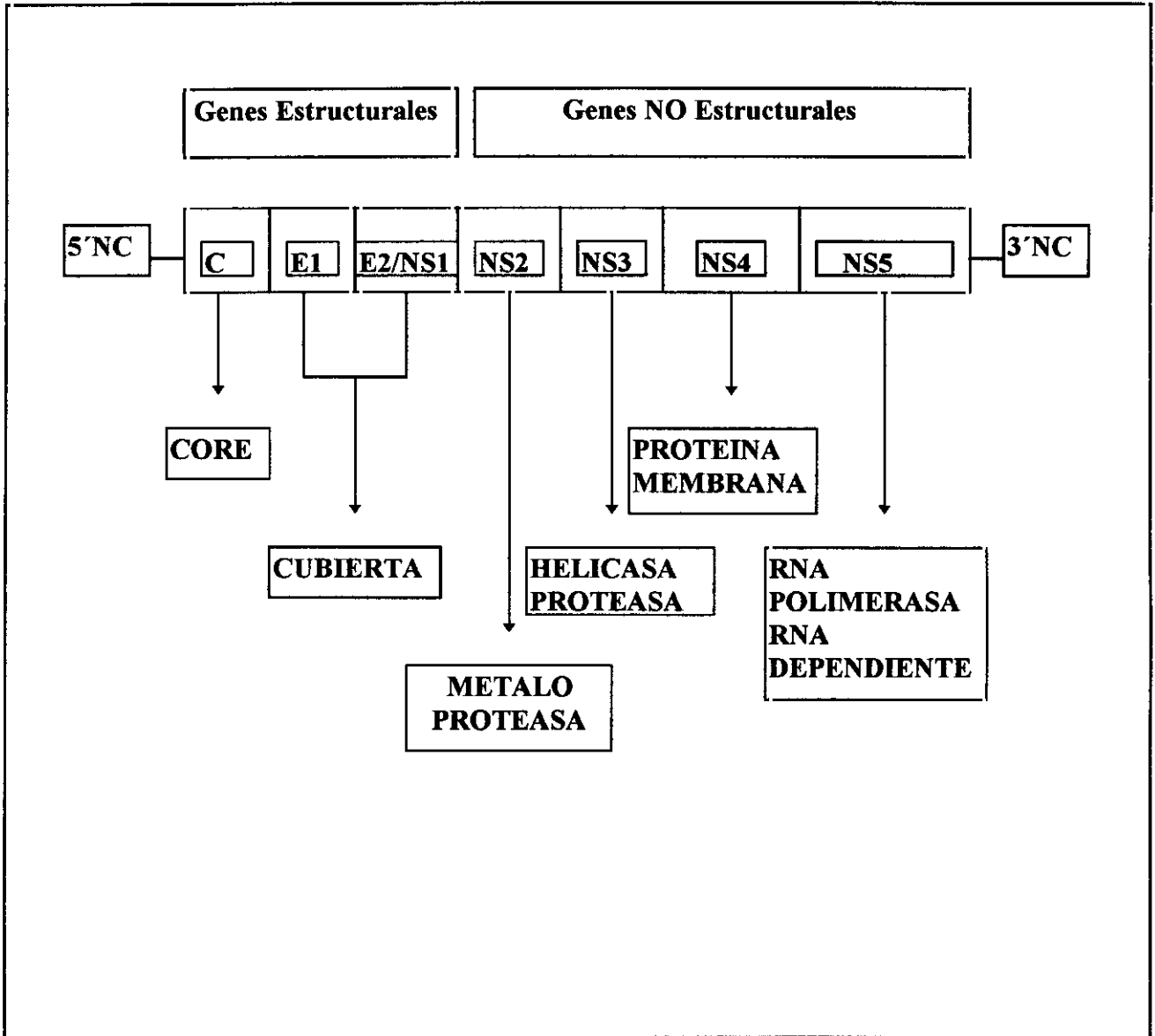
bien en presencia de infección materna concomitante por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (9).

La *transmisión sexual* ocurre raramente (es menor del 5%), pero el riesgo aumenta con la duración del matrimonio, en individuos coinfectados por VIH, en relación con mayores niveles de RNA en estos pacientes inmunodeprimidos, y en caso de múltiples parejas sexuales. El riesgo de transmisión es mayor de hombre infectado a mujer que a la inversa, probablemente por una vía de transmisión percutánea inaparente, pues no se ha detectado el RNA del VHC en semen de los pacientes infectados (10,11). La prevalencia de anti-VHC en individuos homosexuales no ADVP oscila entre el 1 y el 18%, lo cual está en proporción al número de parejas sexuales a lo largo de la vida.

La *transmisión intrafamiliar* (no sexual) del VHC se produce aproximadamente entre el 0 y el 11% de los contactos de pacientes con hepatitis C crónica, generalmente por transmisión percutánea inaparente al compartir hojas de afeitar, cepillos de dientes, etc (12).

El grupo de riesgo más prevalente es el de las *hepatitis esporádicas*, que representan aproximadamente el 50% de los pacientes con hepatitis C, en quienes no se reconocen antecedentes de transfusión sanguínea ni drogadicción, lo que no implica necesariamente que la transmisión ocurriera por un mecanismo no parenteral. Posibles causas de infección en estos casos son inoculaciones parenterales con material médico contaminado (en hospitales, clínicas odontológicas o inyecciones con material no desechable antes de 1970) o con alguna inoculación de drogas no confesada (13).

Figura 1
ESTRUCTURA GENÓMICA DEL VIRUS C



I.1.2. Biología molecular del virus C

1.1.2.1. Estructura genómica del virus C

El genoma del VHC consta de una molécula de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de polaridad positiva que posee unos 9400 nucleótidos, con una amplia región de lectura abierta (open reading frame, ORF), que codifica una única poliproteína de 3010 ó 3011 aminoácidos, precursora de las diferentes proteínas estructurales y no estructurales del virus, flanqueada por dos regiones no codificantes de secuencias muy conservadas entre los diferentes aislados descritos del virus y que podrían estar implicadas en la regulación de la replicación viral (14-16).

El análisis y comparación de la secuencia de nucleótidos del RNA-VHC ha demostrado que posee homología parcial y comparte su organización genómica con otros miembros de la familia *Flaviviridae* (17), que incluye flavivirus humanos y pestivirus animales, y actualmente se considera al VHC como un nuevo género dentro de dicha familia (18).

La región de lectura abierta del genoma del VHC presenta diferentes zonas y su procesamiento por enzimas proteolíticas de origen celular y vírico da lugar a las proteínas estructurales, componentes del virión del VHC (19,20), y a las proteínas no estructurales, respectivamente (Figura 1) (21,22).

Entre las *proteínas estructurales* se conocen: una derivada de la región C del genoma, que da lugar a la *nucleocápside o core* del virus (23) y comprende los primeros 191 aminoácidos de la poliproteína, y dos glicoproteínas derivadas de las regiones E1 (gp31) y E2/NS1 (gp70) del genoma, que forman parte de la envuelta externa del virus (22).

La proteína del core está bastante conservada entre los diferentes aislados del virus C y tiene capacidad inmunogénica, pues presenta varios epítomos en su extremo N-terminal que son reconocidos por las células B, dando lugar a la producción de anticuerpos por el huésped (24).

Las glicoproteínas de la envuelta viral contienen importante epítomos neutralizantes, incluyendo una región hipervariable (RHV) en el extremo aminoterminal de la región E2/NS1, que bajo la presión inmune mutan rápidamente, permitiendo así al virus eludir la respuesta inmune del huésped y persistir (8,16,25).

Con respecto a las *proteínas no estructurales* (NS2-NS5), implicadas en la replicación viral, el análisis de las secuencias de aminoácidos ha permitido definir la existencia de secuencias consenso típicas de varias actividades enzimáticas: una actividad helicasa, que eliminaría la estructura secundaria del RNA permitiendo su replicación, una actividad serin-proteasa, implicada en el procesamiento de la poliproteína precursora, y una RNA polimerasa dependiente del RNA, que estaría encargada de la replicación del genoma del virus (15,20).

La región NS3 comprende las actividades enzimáticas helicasa y serin-proteasa, además de la actividad nucleótido-trifosfatasa ATP-dependiente, y se solapa con NS2 en la formación de una proteasa.

La proteína NS4A funciona como un cofactor de la serin-proteasa, implicada en la escisión entre NS4B y NS5A.

La proteína NS5A es una fosfoproteína serínica cuya función todavía no se conoce, mientras que la proteína NS5B posee tanto actividad de RNA polimerasa dependiente del RNA como de transferasa terminal (8,26).

En el extremo 5' del genoma viral existe una *región no codificante* (5'NC o 5'UTR: 5'untranslated region), de 341 nucleótidos, que adopta una estructura secundaria en forma de horquilla (hairpin) y es la porción más conservada del genoma del virus C. Por la gran estabilidad que esta región presenta, debe desempeñar un importante papel regulador en los procesos de replicación y traducción viral, iniciándose esta última por la unión de los ribosomas a secuencias internas (IRES: internal ribosomal entry site) presentes en esta región (27,28).

En el extremo 3' existe otra región no codificante, más corta, también muy conservada, seguida de una cola de poli-A o poli-U, según la variante viral, y cuya función no es totalmente conocida, pero parece jugar un papel en la replicación del VHC (26,29).

I.1.2.2. Variabilidad genética del Virus C

El estudio por secuenciación del material genómico del VHC a partir de muestras obtenidas en diferentes localizaciones geográficas, ha permitido comprobar la existencia de una gran variabilidad genética asociada al VHC. Esta variabilidad se produce principalmente por mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos, dado que al ser un virus RNA replica a través de una ARN polimerasa-ARN dependiente sin capacidad de corrección de errores (16,30).

La comparación de secuencias tanto parciales como completas, ha permitido identificar y clasificar al menos seis amplios grupos, denominados *genotipos*, y numerosos *subtipos*, que representan cepas con secuencias similares dentro de cada genotipo (31,32). Además, puede existir variabilidad de nucleótidos en los virus circulantes en un mismo individuo. Estas variantes se denominan *cuasiespecies*, concepto que se define como la mezcla de genomas capaces de circular en un mismo individuo infectado, predominando un genoma principal junto a un amplio número de mutantes (33,34). En cualquier región genómica estudiada deben distinguirse dos componentes dentro de la heterogeneidad de las cuasiespecies:

1. *Complejidad* genética, que se define como el número total de variantes genéticas principales dentro de la población de cuasiespecies.

2. *Diversidad* genética, que es la distancia media que existe entre las diferentes variantes de la población de cuasiespecies.

Existe una clasificación consensuada de los genotipos, basada en el porcentaje de homología entre diferentes virus C en secuencias del genoma relativamente bien conservadas que han mostrado ser definitorias de genotipo, como el core, E1 y la región NS5 (31,35,36): los grupos de virus C que presentan una homología con las secuencias consenso < 70% se clasifican como genotipos; aquellos cuyas homologías oscilen entre 70 y 85% se consideran como diferentes subtipos dentro del mismo genotipo; los que muestran homologías en torno al 98-100% se denominan cuasiespecies y, para distinguirlos generalmente se utilizan secuencias de la RHV. A los genotipos se les asigna un número del 1 al 6 y a los subtipos una letra (a, b, c) según el orden de descubrimiento (37).

Sin embargo, no todas las regiones del genoma del VHC tienen la misma capacidad de admitir cambios en su secuencia. Además de la altamente conservada región 5'NC, las secuencias de aminoácidos de los productos codificados por los genes del core, NS3 y NS4 también están bien conservadas en la mayoría de los aislados. Por el contrario, las glicoproteínas de la envuelta codificadas por los genes E1 y E2/NS1, y las proteínas codificadas por los genes NS2 y NS5 muestran una mayor variabilidad entre los diferentes aislados (26,30,34). Este hecho es especialmente notorio en el extremo aminoterminal de la glicoproteína gp70 (E2/NS1) que contiene una RHV, como ya se ha mencionado (38,39).

Esta distribución segmentaria de la heterogeneidad en el genoma del VHC probablemente se debe a las diferencias existentes entre genes que codifican proteínas esenciales para la replicación del virus, que pueden tolerar pocas mutaciones, y otros genes no esenciales para dicha replicación, como los de las proteínas de la envuelta. Además algunas mutaciones pueden ser ventajosas para el virus; así, los cambios antigénicos en las

proteínas estructurales derivadas de la RHV dan lugar a epítopos específicos para cada virus que son inductores de anticuerpos neutralizantes o son específicos de células T, lo cual permitiría al virus C eludir la respuesta inmune del huésped (mutantes "escape") y ello da lugar a la persistencia de la infección y a la ausencia de inmunidad protectora en el individuo, que puede ser reinfectado por el mismo o por una variante diferente del virus C.

Las tasas de aparición de estos mutantes vienen determinadas no sólo por la tasa de mutación del virus, sino también por las condiciones de la respuesta inmune del huésped que permita la supervivencia de variantes. La variación en la secuencia de nucleótidos en un individuo infectado aumenta con la progresión de la lesión hepática. Por tanto, la selección inmune de estas variantes explicaría las elevadas tasas de persistencia del virus en el tiempo y la tendencia a la cronicidad de la infección por el VHC. Asimismo, el grado de complejidad de las cuasiespecies y la diversidad de la región hipervariable están estrechamente relacionados con la respuesta al tratamiento con interferón alfa: los pacientes recidivantes y no respondedores muestran mayor grado de diversidad nucleotídica en el análisis de sus regiones hipervariables (40-42).

Respecto a la distribución mundial, los genotipos 1a y 1b se distribuyen por todo el mundo, siendo el 1b el más extendido y con especial prevalencia en Europa y Japón (16). Por el contrario, el subtipo 1a es más prevalente en Estados Unidos. El tipo 2 se encuentra mayoritariamente en Japón, Inglaterra y Estados Unidos. El tipo 3 se ha identificado en Tailandia así como prácticamente en toda Europa y en Estados Unidos. En Oriente Medio y regiones de África como Zaire y Gabón se han identificado cepas del tipo 4. Los tipos 5 y 6 hasta el momento quedan más restringidos geográficamente, habiéndose identificado, respectivamente, en pacientes de Sudáfrica y Hong Kong (38,43).

Implicaciones epidemiológicas y clínicas de la infección por los diversos genotipos del virus C

1. La *epidemiología de la infección*: en general, se ha definido un patrón parenteral de transmisión en los pacientes infectados por el tipo 1, asociándose a transfusiones de sangre y hemoderivados. El genotipo 1b es el más prevalente en los casos de hepatitis esporádica. La coinfección por varios genotipos se ha relacionado con determinadas vías de transmisión: se ha descrito un mayor número de infecciones mixtas en hemofílicos, lo que estaría asociado con la recepción de hemoderivados de múltiples donantes (44). La infección en individuos ADVP se ha relacionado con los tipos 1a y 3 (45). El genotipo también ayuda a esclarecer otras vías de transmisión del VHC: en caso de sospecha de transmisión sexual, el hallazgo de un genotipo diferente en cada uno de los miembros de la pareja excluye esta vía como responsable de la transmisión de la infección por el virus C.

2. La variabilidad genética del VHC determina *diferentes antigenicidades*. La existencia de epítomos tipospecíficos puede traducirse en respuesta serológica con producción de anticuerpos tipospecíficos, hecho que explicaría la serología negativa en un pequeño porcentaje de pacientes con infección por el VHC, dado que los anticuerpos específicos producidos durante la infección por un determinado genotipo no reconocen los antígenos incluidos en las pruebas comerciales que derivan del virus C prototipo (46).

3. La gravedad de la *lesión hepática* en la hepatitis C puede estar condicionada, entre otros factores, por el genotipo infectante (47,48). Así, se ha asociado la infección por el genotipo 1b, y, en general por el tipo 1, con una hepatitis crónica de mayor severidad y

evolución a cirrosis. No obstante, se ha demostrado que los pacientes infectados por el genotipo 1b tienen mayores concentraciones séricas de RNA-VHC que los pacientes infectados por otros genotipos, pudiendo ser ésta la causa principal de que exista una mayor lesión histológica hepática. Este mismo genotipo ha sido relacionado con el desarrollo de hepatocarcinoma, pues es el más prevalente en los casos en los que se detecta este tumor (49).

4. La mayor utilidad de la determinación del genotipo viral es quizá como factor predictivo de la *respuesta al tratamiento* con interferón (IFN) (50). El genotipo 1b se ha asociado a una menor repuesta al tratamiento con IFN (51), mientras que, en general, el resto de los genotipos presenta una respuesta más favorable a este fármaco.

En resumen, la heterogeneidad genética que presenta el VHC proporciona a éste la de habilidad para "escapar" al control inmunológico del huésped, conduciendo en más del 80% de casos a una infección crónica y a una ausencia de inmunidad protectora en el huésped frente a reinfecciones en repetidas exposiciones individuales al virus.



I.1.3. Manifestaciones clínicas e historia natural de la hepatitis C

La hepatitis C representa un serio problema sanitario, ya que es la causa más importante de hepatopatía crónica; se estima que alrededor del 70% de las hepatitis crónicas están causadas por el virus C.

I.1.3.1. Hepatitis aguda por el virus C

El virus C es el causante del 20% de las hepatitis agudas. La mayoría de los pacientes que presentan infección aguda están asintomáticos, y sólo desarrolla ictericia un escaso porcentaje (inferior al 25%) (52,53). El periodo de incubación es de unas 7 semanas, con un rango de 3-20 semanas. La elevación de transaminasas es transitoria y ocurre prácticamente en todos los pacientes infectados.

Al comienzo de la enfermedad no es posible realizar un diagnóstico serológico ya que existe un intervalo entre la exposición al virus y la detección de anticuerpos anti-VHC de unas 10 semanas (periodo ventana). El único marcador precoz de infectividad es la detección del RNA del VHC, que puede ser positivo desde la primera semana tras la exposición al virus (54). Aunque ocurre raramente, la hepatitis aguda C puede evolucionar a hepatitis fulminante, detectándose marcadores de infección por el virus C aproximadamente en un 2% de los casos de fallo hepático fulminante (55).

En los casos autolimitados, el RNA-VHC se negativiza en unas pocas semanas desde el comienzo de los síntomas y las transaminasas retornan a la normalidad, pero

desafortunadamente, la mayoría de los pacientes con hepatitis aguda C progresan a una infección crónica (85% de los casos), según se demuestra por la persistencia de RNA-VHC en el suero (12). Los anticuerpos frente al virus C, en general, no confieren inmunidad ni son neutralizantes, pudiendo persistir durante años tras la resolución de la infección aguda, por lo que es necesario determinar el RNA viral para distinguir entre infección activa o resuelta.

I.1.3.2. Hepatitis crónica por el virus C

Uno de los motivos por los que la hepatitis C fue durante tiempo una enfermedad desconocida es la frecuencia con la que el curso clínico es silente. La hepatitis crónica puede asociarse a síntomas inespecíficos como astenia, artralgias y malestar general, si bien los síntomas no suelen aparecer hasta que surgen las complicaciones o las manifestaciones extrahepáticas generadas por el virus C. Por ello, es frecuente que la infección se detecte incidentalmente al efectuarse una analítica rutinaria o bien al donar sangre. La mayoría de los pacientes presentan elevaciones persistentes o intermitentes de las transaminasas séricas, no existiendo correlación entre la cifra de transaminasas y la lesión histológica hepática (56).

Prácticamente todos los pacientes con infección crónica por el VHC desarrollan un *patrón histológico* de hepatitis crónica, incluyendo inflamación portal, necrosis de la membrana limitante o "piecemeal necrosis" y lesión lobular. Es característica de la hepatitis crónica C (aunque no diagnóstica) tanto la presencia de esteatosis como de agregados linfoides portales y de lesiones en los conductos biliares (57).

Un porcentaje considerable de pacientes con infección crónica por VHC (aproximadamente 1/3) presenta *transaminasas persistentemente normales*. La biopsia hepática realizada en este subgrupo de pacientes no muestra lesiones aproximadamente en el 30% de los casos, que se consideran como "portadores sanos" (58), pero presenta alteraciones propias de la hepatitis crónica en un porcentaje elevado de casos (65-70%), y, a veces, muestra una hepatopatía evolucionada, si bien de forma global su afectación hepática es significativamente menos grave que la de los pacientes con hipertransaminasemia. La evolución a largo plazo de este subgrupo es incierta y deben ser controlados para valorar su progresión (59).

Las reactivaciones en el seno de una hepatitis crónica C, definidas como abruptas elevaciones de las transaminasas, se producen con frecuencia, cursando el 55% de forma asintomática, con alteraciones histológicas poco severas y sin guardar relación con la evolución subsiguiente de la enfermedad. En las reactivaciones se detecta un aumento de la concentración del RNA viral en suero en el 61% de los casos y un incremento de los niveles de anticuerpos tipo IgM frente a proteínas del core, sin que se produzcan cambios en el genotipo, aunque algunos autores sugieren que la superinfección por un genotipo diferente puede contribuir al desarrollo de exacerbaciones agudas (40).

Aunque la hepatitis crónica C suele cursar con nula o mínima sintomatología, progresa a *cirrosis* en el 20% de los pacientes, generalmente a partir de los 20 años desde el comienzo de la infección. La aparición inicial de fibrosis hepática en el estudio histológico parece tener un importante valor predictivo del futuro desarrollo de cirrosis (60). Existe un amplio espectro de susceptibilidad respecto a la evolución hacia la cirrosis hepática y, de los

posibles factores predictivos estudiados, parece que los más relacionados son el sexo (más frecuente en varones), la edad superior a los 50 años en el momento de la infección, la ingesta abundante de alcohol, la coinfección por el virus de la hepatitis B y la infección por el genotipo 1b del VHC (61).

Las *complicaciones* de la infección crónica C (incluyendo la insuficiencia hepática y el hepatocarcinoma) aparecen generalmente en individuos con cirrosis y, dado que ésta suele tardar años en establecerse, la infección por el VHC puede cursar silente durante décadas antes de ponerse de manifiesto la existencia de signos de hipertensión portal o la presencia de encefalopatía hepática (62). Pese a ello, la hepatitis C constituye la primera causa de hepatopatía que precisa trasplante hepático. En Estados Unidos se ha estimado que la hepatitis C es responsable de 8.000 a 10.000 fallecimientos anuales. Además, anualmente pueden desarrollar un *hepatocarcinoma* entre el 1 y el 4% de los pacientes con cirrosis establecida, estimándose que el tiempo medio de aparición de este tumor es de aproximadamente unos 30 años desde el comienzo de la infección por el virus C (63,64).

I.1.3.3. Manifestaciones extrahepáticas de la infección por el Virus C

Una característica interesante de la hepatitis C es su asociación a diversas manifestaciones extrahepáticas que incluyen: artritis, liquen plano, glomerulonefritis y crioglobulinemia mixta esencial (CME). Tanto la crioglobulinemia como la glomerulonefritis se deben a vasculitis de pequeño vaso (65).

La hepatitis C es la principal causa de CME, síndrome caracterizado por la aparición de varios síntomas como astenia, artralgias y mialgias, artritis, lesiones cutáneas (púrpura,

vasculitis), neuropatía y glomerulonefritis. Las crioglobulinas, detectadas en suero, están compuestas por inmunocomplejos antígeno VHC-anticuerpo-VHC, factor reumatoide y complemento. Este síndrome ocurre en un 1-2% de los pacientes con hepatitis C, aunque es posible detectar crioglobulinas en suero en 1/3 de los portadores de infección por el virus C. La resolución de la hepatitis C conlleva la resolución de la CME.

La porfiria cutánea tarda (PCT) también se asocia con la hepatitis por el virus C; un 62-82% de casos de pacientes con PCT tienen marcadores de infección por el VHC y esta relación se incrementa cuando se determina el RNA-VHC tanto en células mononucleadas de sangre periférica como en el hígado de los pacientes con porfiria (66), aunque se desconoce si es la infección viral o la lesión hepática asociada la que desencadena el síndrome (67).

Otros procesos con los que la asociación está menos documentada son el Síndrome de Sjögren secundario, la úlcera corneal de Mooren, la anemia aplásica, la fibrosis pulmonar y el hiper o el hipotiroidismo.

En cuanto a la patogenia de estas manifestaciones extrahepáticas, se especula que podría participar un mecanismo inmunológico desencadenado en respuesta a la infección viral, o bien podrían ser la consecuencia de la invasión viral y replicación en los tejidos y órganos extrahepáticos afectados (8,62,68).

I.1.4. Diagnóstico de la infección por el VHC

Los métodos diagnósticos de la infección por el VHC se pueden dividir en 2 categorías (69): *métodos indirectos o serológicos* basados en la detección de anticuerpos séricos frente al virus C y *métodos directos o de biología molecular*, basados en la detección del genoma viral y su cuantificación.

I.1.4.1. Métodos serológicos

En la actualidad existen varios enzimoimmunoanálisis (EIA) muy sensibles para la detección de anticuerpos anti-VHC que se basan en la utilización de una combinación de proteínas virales recombinantes, incluyendo una porción de la proteína del core (c22), NS2 (c33), NS3/4 (c200) y, en las versiones más recientes (de 3^a generación), un péptido NS5 (70). Pese a las diversas modificaciones realizadas, destinadas a incrementar la sensibilidad, estos métodos siguen presentando reactividades falsamente positivas, especialmente entre individuos con bajo riesgo de infección por VHC, como los donantes de sangre voluntarios.

En un alto porcentaje de las infecciones crónicas por VHC se detectan anticuerpos de clase IgM frente a proteínas no estructurales (71), que podrían ser neutralizantes, y que son útiles como marcador positivo de respuesta al tratamiento con IFN (72). También se detectan anticuerpos de clase IgM frente a proteínas del core, que se asocian a altos niveles de replicación viral (73), y que aparecen tanto en la fase aguda de la infección como en las exacerbaciones agudas de la hepatitis crónica por virus C. Los pacientes con anticuerpos de

tipo IgM frente a proteínas del core responden peor al IFN, pues estos anticuerpos son un marcador de elevada carga viral.

Para determinar la especificidad de los EIA es importante confirmar su reactividad con *test de confirmación* como las técnicas de inmunoblot recombinante (RIBA, Chiron) y péptidos sintéticos (Innolia, Innogenetics), que detecta anticuerpos frente a las proteínas del virus previamente aplicadas sobre tiras de nitrocelulosa. Es necesaria la reactividad al menos en dos bandas para considerar el suero como positivo.

Los test de confirmación deben efectuarse en todos los casos con reactividad anti-VHC mediante EIA en los que exista alguna duda sobre el diagnóstico, como aquellos con transaminasas normales o con hipergammaglobulinemia. Existe una buena correlación, aunque no absoluta, entre un resultado positivo con RIBA y la presencia de RNA-VHC documentada por PCR (74).

I.1.4.2. Métodos de biología molecular

Los anticuerpos anti-VHC pueden no ser detectables tanto en los estadios iniciales de la infección aguda C como en individuos inmunodeprimidos, por ejemplo en pacientes con insuficiencia renal y con sida. En estos casos resulta apropiado investigar directamente la presencia del virus mediante la determinación del RNA-VHC en suero que es la prueba más precisa, siendo también posible su determinación en hígado y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (75).

El RNA viral está presente en escasas cantidades en el suero y tejidos, y para su detección es necesario amplificarlo mediante PCR con un paso previo de transcripción reversa (RT: reverse transcriptase) de RNA a cDNA: la RT-PCR permite la detección no cuantitativa de pequeñas cantidades de RNA viral tras las amplificaciones. Es importante la selección de las secuencias de nucleótidos ("primers"), utilizándose habitualmente la región 5'UTR por estar altamente conservada entre las diferentes variantes del virus (76).

La sensibilidad y especificidad se incrementan con la RT-nested PCR o PCR en forma de nido, en la que se añade una segunda fase de amplificación utilizando diferentes "primers" del DNA obtenido (77). Deben considerarse los falsos positivos de la técnica, normalmente debidos a contaminación, y los falsos negativos, en su mayoría por degradación o deficiente extracción del RNA.

Además de la detección cualitativa es posible determinar la cantidad de RNA-VHC existente en el suero (carga viral), de gran utilidad para la monitorización del tratamiento e importante porque parece demostrado que aquellos pacientes con mayores cargas virales pueden ser más contagiosos y presentan peor respuesta al tratamiento con interferón (78). Los niveles de RNA-VHC pueden sufrir grandes fluctuaciones en un mismo individuo en diferentes determinaciones y la PCR puede ser falsamente negativa si el nivel de replicación es bajo o si la persistencia viral está limitada a compartimentos no sanguíneos.

La PCR es positiva a los 5-10 días de exposición al VHC. Sus principales aplicaciones clínicas son:

- 1) el diagnóstico de la infección aguda,

- 2) la evaluación de viremia en pacientes anti-VHC+ con transaminasas normales, para descartar infección o inmunidad,
- 3) el diagnóstico de hepatitis crónicas seronegativas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos,
- 4) en la monitorización del tratamiento antiviral, y
- 5) en estudios de transmisión vertical del VHC.

Para la determinación del genotipo viral se han descrito varios métodos de tipificación: a) mediante ELISA con oligopéptidos de la región NS4 se ha determinado el efecto de la variabilidad de secuencias entre distintos tipos del VHC sobre la antigenicidad, comercializándose un ELISA que permite detectar anticuerpos frente a los tres primeros grupos filogenéticos del virus C. Los anticuerpos tipospecíficos detectados (serotipos) se correlacionan casi exactamente con el análisis genotípico de las secuencias del VHC amplificadas por PCR (79); b) métodos basados en el análisis de los productos de PCR por secuenciación directa (27), usando primers específicos (80), por análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (PLFR) (81), o con sondas de DNA específicas (82). Estas técnicas se han aplicado a la región 5'UTR, al core y a NS5.

Con respecto al análisis de las cuasiespecies del VHC, generalmente se estudia la región HVR-1, y es preciso realizar la amplificación y la secuenciación de la misma, lo cual resulta muy complejo y se emplea cuando interesa conocer la *diversidad* genética de las cuasiespecies. Existe un método sencillo y rápido para la detección de la población de cuasiespecies de un mismo genotipo de virus C, denominado "Análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla" (Single strand conformation polymorphism, SSCP).

El SSCP es una técnica directa y con una elevada sensibilidad que se basa en la diferente movilidad de un fragmento de una cadena sencilla de DNA (sDNA), según su conformación, en una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante, teniendo en cuenta que las mutaciones que se produzcan en un fragmento definido de DNA causan diferentes conformaciones en el sDNA y ello conlleva diferente movilidad electroforética (83). El número de bandas que se visualiza refleja el número total de variantes virales “mayores” presentes en suero, es decir, la *complejidad* genética del genoma viral.

Diversas técnicas como la *hibridación in situ*, la *RT-PCR in situ* y la *inmunohistoquímica* se han aplicado para la localización específica del genoma y los productos genéticos del VHC en muestras de biopsia hepática.

Respecto a la hibridación in situ (HIS), el conocimiento de las secuencias genómicas de los virus ha permitido la obtención de sondas con las que poder localizarlos en suero (84) y tejido. Para ello es necesario que se produzca la hibridación entre 2 secuencias complementarias, la viral y la de sonda marcada. Posteriormente, con un sistema de detección visualizamos el lugar donde se encuentra la sonda hibridada.

La HIS es una técnica complementaria a la inmunohistoquímica, ya que esta última localiza las proteínas derivadas de la traducción viral (85) y la HIS detecta el tropismo celular del virus y su lugar de replicación (86), siendo una técnica con poca sensibilidad debido a los bajos niveles de VHC (87).

La PCR in situ permite amplificar el genoma viral directamente sobre una preparación y después visualizarlo; sin embargo, es una metodología todavía en fase de experimentación que presenta ciertos problemas de especificidad (88). De todas formas, la sensibilidad es bastante mayor con respecto a la HIS (89,90).

La inmunohistoquímica ha sido ampliamente utilizada hasta el momento pero los resultados han sido desiguales según los autores; todavía no se ha encontrado el anticuerpo monoclonal adecuado y es preciso un mayor perfeccionamiento técnico antes de poderla emplear de forma generalizada (91,92).

I.1.5. Tratamiento de la infección por el virus C con Interferon

La infección por el VHC genera una considerable morbilidad y mortalidad secundarias a las consecuencias a largo plazo de la enfermedad hepática, por lo que no queda duda sobre la apremiante necesidad de hallar una terapia efectiva para esta enfermedad.

A diferencia de lo que ocurre con la hepatitis crónica B, la hepatitis crónica C no posee tendencia a la remisión espontánea (93), por lo que el tratamiento siempre es preferible a la abstención terapéutica.

El interferón (IFN) es el único fármaco autorizado para el tratamiento de la hepatitis crónica C, pero su utilidad está limitada por su insuficiente eficacia, su elevado coste y los efectos secundarios que produce.

Los IFNs son una familia de glicoproteínas secretadas por las células nucleadas principalmente en respuesta a la infección viral; existen varios tipos, alfa, beta y gamma, que se agrupan según su estructura, sus efectos antivirales y sus propiedades inmunomoduladoras (94): a los IFNs alfa y beta se les denomina de *tipo I* y son producidos por las células linfoides, epiteliales y fibroblastos, mientras que el IFN gamma se denomina de *tipo II* y es producido por células T activadas y células NK (natural killer).

En humanos el IFN alfa (α) está codificado por un total de 13 genes localizados en el brazo corto del cromosoma 9, que dan lugar a diferentes proteínas con similar acción. Las preparaciones disponibles para uso clínico contienen IFN α_2 recombinante, obtenido por

transfección bacteriana, o son mezcla de subtipos producidos por células linfoblastoides humanas (namalwa) o leucocitos humanos estimulados por el virus Sendai.

En general, los IFNs de tipo I tienen un potente efecto antiviral, inmunomodulador y antiproliferativo (95); para ejercer sus funciones, los IFNs deben unirse a un receptor específico en la membrana de la célula diana y ello inicia una serie de mecanismos intracelulares que conducen a la activación, a nivel nuclear, de la región reguladora de los genes inducidos por el IFN, denominada ISRE (IFN-stimulated response element), dando lugar a la producción de ciertas proteínas que participan en las diferentes acciones biológicas mediadas por los IFNs (96,97): algunas actúan inhibiendo la replicación viral, como la *proteína Mx* que posee gran actividad inhibitoria de la replicación del virus de la influenza y probablemente otros virus, el sistema *2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5'OAS)* que activa una ribonucleasa que degradan la doble cadena de RNA formada durante la replicación de los virus RNA, y una *proteinkinasa* que inhibe la síntesis de proteínas virales; en cuanto a los efectos inmunomoduladores, el IFN tipo I aumenta la expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) clase I en las células infectadas por virus, facilitando su reconocimiento y destrucción por las células T citotóxicas.

Los objetivos fundamentales de la terapéutica en la hepatitis crónica por virus C son: inhibir la replicación viral y lograr la erradicación definitiva del VHC de todos los reservorios, inactivar la hepatitis desde el punto de vista bioquímico e histológico y evitar la progresión hacia la cirrosis y las complicaciones que conllevan las fases avanzadas de la enfermedad hepática. Todos estos objetivos sólo se consiguen en los pacientes que presentan una respuesta estable después del tratamiento.

La utilización del IFN se asocia con frecuencia a un descenso en la cifra de transaminasas y de la cantidad circulante del RNA del virus C, en general hasta valores indetectables (98). Sin embargo, en muchos casos al suspenderse la terapia vuelven a elevarse la cifra de transaminasas y del RNA del VHC hasta los valores preterapéuticos.

La respuesta óptima o *respuesta completa mantenida* se define como la existencia de transaminasas persistentemente normales y ausencia de RNA en suero tanto al final del tratamiento como durante un seguimiento de al menos 6 meses después de su finalización; se produce en el 15 a 20% de los pacientes tratados con IFN y la mayoría de los pacientes de este grupo se mantendrán en remisión (8,99). En el 50% de los pacientes tratados se consigue una *respuesta completa*, con normalización de transaminasas (alanin aminotransferasa, ALT) y negativización del RNA viral durante el tratamiento, pero sólo la mitad o menos de los pacientes respondedores presentan una respuesta mantenida al suspender la medicación (100). La *respuesta parcial* o *ausencia de respuesta* se produce cuando no se modifican la cifra de ALT y la viremia, o bien, si se producen, no se mantienen durante el periodo de tratamiento. Este "fenómeno de escape" o *breakthrough* parece deberse a la selección de mutantes del VHC resistentes al IFN, a alteraciones de la respuesta inmune del huésped o a la aparición de anticuerpos anti-IFN (101).

Por desgracia la erradicación del virus es difícil de lograr, ya que aproximadamente entre un 10 a 40% de los pacientes con respuesta bioquímica (transaminasas normales) sostenida vuelven a tener viremia detectable en el seguimiento (disociación bioquímica-viroológica) (102,103), y en otros con viremia no demostrable es posible detectar el genoma

viral en el hígado o en las CMPS, donde también se replica el virus, a pesar de la normalidad de las transaminasas (104).

Los resultados obtenidos con el IFN, por lo tanto, distan mucho de satisfacer los objetivos ideales propuestos y, mientras no se disponga de agentes terapéuticos más eficaces, es necesario buscar estrategias que mejoren la efectividad del tratamiento con IFN, basadas en 2 aspectos fundamentales: la búsqueda de la pauta óptima para administrar el IFN y la selección de aquellos pacientes más susceptibles de beneficiarse del tratamiento.

Respecto a los factores dependientes del IFN, un importante número de ensayos terapéuticos realizados en todo el mundo han evaluado la importancia del tipo de IFN, de la dosis, de la duración del tratamiento, de la idoneidad de pautas con dosis crecientes o decrecientes o de la administración de ciclos repetidos.

En cuanto al tipo de IFN, no parecen existir diferencias ni en eficacia ni en cuanto a los efectos secundarios entre los IFNs alfa recombinantes o el IFN linfoblastoide (105). El IFN beta ha sido empleado con buenos resultados, por vía intravenosa (106). El IFN gamma se ha mostrado ineficaz (107).

Existe discrepancia respecto a la dosis óptima de IFN, pues algunos estudios sugieren una mayor eficacia del IFN a dosis de 5 ó 6 mU en lugar de 3 mU, y otros demuestran respuestas sostenidas en pacientes tratados con dosis bajas, de 1,5 mU. La dosis más empleada en la actualidad es intermedia, es decir, 3 mU (100,108).

El empleo de dosis ascendentes o descendentes según la normalización de las transaminasas, en comparación a pautas con dosis fijas, no ofrece mejores resultados (109).

Los tratamientos de duración inferior o igual a seis meses son insuficientes en la

mayoría de los casos. Estudios recientes demuestran una tasa mayor de respuesta mantenida con tratamientos de doce o dieciocho meses frente a tratamientos de seis meses (108). No obstante, la duración del tratamiento es un factor a tener en cuenta exclusivamente en pacientes que presentan normalización de transaminasas y negativización del RNA viral en suero a las 4-8 semanas de iniciado el tratamiento. Si en este intervalo de tiempo no se consigue respuesta completa, la prolongación del tratamiento no parece mejorar las expectativas de respuesta sostenida (110).

El segundo aspecto importante de la problemática del tratamiento es la identificación de los pacientes que realmente puedan beneficiarse del mismo. Los factores que pueden influir en la respuesta al tratamiento pueden ser de tipo epidemiológico, bioquímico, histológico o virológico (111,112).

Dentro de la primera categoría se encuentran como factores predictivos de buena respuesta al tratamiento la menor edad, el sexo femenino, el antecedente de infección reciente y la adicción a drogas por vía parenteral como mecanismo de contagio de la enfermedad. Son factores analíticos relacionados con la respuesta favorable al tratamiento una cifra correcta de leucocitos, plaquetas y ferritina, un cociente AST/ALT inferior a 0,5 y una GGT normal. La existencia de una cirrosis hepática se considera un factor predictivo de mala respuesta.

Existen factores específicos del virus que en el análisis univariado han demostrado ser factores predictivos independientes de respuesta al IFN: el *genotipo* y la *carga viral*. Los pacientes infectados por el genotipo 1b del virus C y con niveles elevados de RNA del VHC presentan casi siempre una pobre respuesta al tratamiento con IFN (111).

Recientemente se ha demostrado que una menor diversidad en la RHV del VHC es un factor predictivo independiente de respuesta completa mantenida al IFN en los pacientes con hepatitis crónica C (113). Además, el tratamiento con IFN puede inducir o aumentar la variabilidad de esta región del genoma, haciendo al virus resistente al tratamiento (114).

En este sentido, Enomoto (115) secuenció la totalidad del genoma del VHC del genotipo 1b en varios pacientes no respondedores al IFN, antes y después del tratamiento, hipotetizando que la terapia podría aclarar las cuasiespecies sensibles al IFN, persistiendo las resistentes al fármaco. La comparación de secuencias de aminoácidos demostró que éstas habían variado después del tratamiento y que el cambio más consistente ocurría en la región carboxiterminal del gen NS5A, entre los aminoácidos 2209 y 2248, denominándola *región determinante de la sensibilidad al IFN (ISDR: interferon-sensitivity determining region)*. Según estos autores, las variantes virales que presentaban una secuencia en la ISDR igual a la del genotipo 1b "salvaje" eran resistentes al IFN, persistiendo después del tratamiento, y los aislados con múltiples sustituciones ($> \text{ó} = 4$) en la ISDR, denominados "tipos mutantes", desaparecían durante el tratamiento con IFN. Los aislados con sustituciones en número de 1 a 3 se denominaron "tipo intermedio" y presentaban una respuesta intermedia entre los dos tipos anteriores al tratamiento con IFN.

Estos datos han sido confirmados en Japón (116,117) pero no en Europa (118), probablemente por la existencia de una menor proporción de los tipos mutantes en Europa con respecto a Japón, lo que podría explicar las diferencias observadas en la respuesta al tratamiento entre ambas áreas geográficas.

Parece que la región NS5A debe intervenir en el proceso de replicación viral y se especula que en el genotipo 1b tipo salvaje esa región pudiera codificar una proteína que

colaborara a la resistencia del VHC frente al efecto inhibitorio del IFN sobre la síntesis de proteínas virales, o en la persistencia del RNA viral en el interior de las células (119).

No obstante, varios factores sugieren que la ISDR podría jugar sólo un limitado papel en la determinación de la sensibilidad al IFN. En primer lugar, la asociación sólo se ha realizado en el genotipo 1b, y la falta de respuesta al IFN en pacientes portadores de otros genotipos no quedaría explicada por este mecanismo. Segundo, la carga viral es otro factor predictivo de respuesta al IFN, y se ha asociado a múltiples sustituciones en la ISDR, de forma que la presencia de genotipos 1b mutantes correlaciona estrechamente con unos bajos niveles de RNA-VHC en suero (116) y el análisis multivariante demuestra que la carga viral inicial es mejor factor predictivo de respuesta que la secuencia de la ISDR. Finalmente, en la mayoría de los estudios realizados la correlación no es absoluta y probablemente intervengan otros factores que están por determinar (119), lo que hace necesario un mayor conocimiento de la variabilidad genética del VHC mediante un análisis de su biología molecular.

I.2. VIRUS DE LA HEPATITIS G

I.2.1. Epidemiología y vías de transmisión

Desde su descubrimiento (120), diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el virus de la hepatitis G (VHG) está mundialmente distribuido y que se transmite por vía parenteral (121-124). La observación de una alta prevalencia de coinfección con el VHC (entre un 10 y 20%) en algunos grupos de riesgo como los ADVP, sugiere que el virus G se transmite por las mismas vías que el virus C, incluyendo la vía sexual y la transmisión vertical (125,126). Además, es posible que existan otras posibles vías de transmisión, ya que como sucede con el VHC, el virus G se ha aislado en pacientes sin factores de riesgo conocidos.

El VHG se ha detectado en el 1.7% de los donantes sanos voluntarios en Estados Unidos, una prevalencia superior a la del VHC; Linnen y cols. (121) han evaluado los datos según la normalidad o no de las transaminasas no encontrando mayor riesgo de infección en los sujetos con elevación de las mismas. De todas formas, a pesar de ser alta la prevalencia de la detección del virus G en los donantes, resulta baja en los receptores (127), a la inversa de lo que ocurre con el VHC, y esto podría demostrar una menor infecciosidad del VHG, probablemente porque las diferencias estructurales que presenta respecto al virus C y la menor viremia facilitan su eliminación por el sistema inmune del huésped.

La prevalencia de infección por el virus G es considerablemente alta entre las personas expuestas, como los sujetos politransfundidos (hemofílicos, pacientes con talasemia, etc), los ADVP o los pacientes en programa de hemodiálisis.

Entre los primeros, la tasa de positividad del ARN del VHG oscila entre el 6 y el 14%, alcanzando hasta el 47% en pacientes politransfundidos por hemopatías malignas, en quienes la inmunodepresión haría más difícil la eliminación del virus (128).

En los ADVP la tasa de infección por el virus G es muy elevada, oscilando entre el 24 y 49%, siendo común un alto índice de coinfección por el VHC en este grupo (129). La tasa de positividad del ARN del VHG es más elevada en los casos en que el inicio de la drogadicción es reciente que en drogadictos más veteranos (125), con una tasa de positividad de anticuerpos anti-E2 más reducida en los primeros que en los segundos (130).

Heringlake y cols. (131) han detectado ARN del virus G en el 16.8% y anticuerpos anti-E2 en el 56.8% de los pacientes infectados por el VIH que han estudiado, demostrando que en los enfermos que presentan viremia es mayor el recuento de células CD4 y progresan con menor frecuencia hacia estadios más avanzados de la infección por VIH, lo que indica un pronóstico más favorable de estos pacientes.

Se detecta ARN del virus G en un 10% de pacientes con infección por el virus de la hepatitis B (VHB), un 20% con infección por el VHC, un 10% de los pacientes diagnosticados de hepatopatía alcohólica y un 8% de casos de hepatitis autoinmune; la gran mayoría de estos pacientes (75-100%) tienen historia de exposición a sangre o hemoderivados o son ex-advp (132).

I.2.2. Biología molecular del virus G

El virus G pertenece a la familia flaviviridae. Es un virus RNA de cadena simple con polaridad positiva, de aproximadamente 9400 nucleótidos que codifican una proteína de 2873 aminoácidos. Su organización genómica es similar a la del VHC y presentan una homología global de un 26% (121,133). Tiene una amplia región de lectura abierta (ORF) que codifica para proteínas estructurales (E1 y E2) situada en el extremo N-terminal, y para proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) en el extremo C-terminal, situada entre dos zonas no codificantes, NC o UTR, a nivel del extremo 5' y 3'.

Existen algunas particularidades del genoma del VHG que pueden tener interés en la patogenia de la infección: en la región que codifica para proteínas estructurales no ha sido posible determinar la presencia de core, que en otros flavivirus codifica para las proteínas de la nucleocápside, y las regiones que codifican para las proteínas de la envuelta están muy conservadas, es decir, el virus G no presenta una región hipervariable, lo cual da lugar a una menor capacidad en la generación de mutantes de escape del control inmunológico del huésped, hecho que le podría conferir una menor patogenicidad y persistencia en comparación al VHC (134).

El análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos de la región 5'UTR entre las diferentes variantes del virus G ha revelado la existencia de varios subtipos virales con diferente prevalencia según las áreas geográficas, como ocurre con el VHC, aunque se desconocen las implicaciones clínicas a que los diferentes subtipos pueden dar lugar.

El subtipo 1 se ha identificado en las variantes del virus G del oeste de África, los subtipos 2a y 2b en Europa y Estados Unidos y el subtipo 3 en Asia (135), con un porcentaje de variación de sus secuencias de aproximadamente un 11-13%, lo cual indica una mayor conservación en las secuencias, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, entre los diferentes subtipos del VHG que en el VHC. La razón de esta diferencia entre los virus G y C no se conoce, pero presumiblemente refleja una variación en la presión inmunológica ejercida por el huésped durante la infección viral.

Además, se ha demostrado que el virus G, como otros virus RNA, existe como una mezcla heterogénea de virus en un mismo individuo, es decir, como cuasiespecies, a pesar de que no presenta una región hipervariable, y ello puede dar lugar a una diferente respuesta al IFN, ya que en un mismo huésped algunos tipos desaparecen durante el tratamiento mientras que otros muestran resistencia al IFN y persisten tras el tratamiento (136).

1.2.3. Significado clínico de la infección por el virus G

Los estudios dirigidos a evaluar la relevancia clínica de la infección por el virus G como agente patogénico de enfermedades agudas y crónicas del hígado, así como su posible implicación en la patogenia de algunas enfermedades extrahepáticas, indican que el potencial patógeno de este virus es escaso y muy inferior al de otros virus hepatotropos.

I.2.3.1. Hepatitis aguda por el virus G

Se ha demostrado la presencia de ARN-VHG en suero en alrededor del 15% de los pacientes con hepatitis postransfusional no A no C, con un periodo de incubación similar al VHC (10-12 semanas) y aparentemente con una clínica más leve.

Asímismo, respecto a las alteraciones bioquímicas, los pacientes presentan concentraciones de transaminasas inferiores a las observadas en la hepatitis aguda por virus C y la elevación de éstas es transitoria, pudiendo persistir la viremia durante tiempo pero sin acompañarse de alteraciones en la bioquímica hepática ni de una evolución histológica hacia la cronicidad (137).

Aproximadamente el 0.3% de los casos de hepatitis aguda esporádica o adquirida en la comunidad serían atribuibles al virus G, e igualmente, no se ha demostrado una evolución a la hepatitis crónica pese a la persistencia de viremia durante largos periodos de tiempo (121,123).

Diversos estudios han sugerido la posibilidad de que el virus G pueda participar como factor etiológico en el desarrollo del fallo hepático fulminante, pero los resultados al respecto son discordantes y son precisas nuevas investigaciones para la obtención de conclusiones definitivas (138,139).

I.2.3.2. Hepatitis crónica por el virus G

Existe una gran controversia con respecto al posible papel del virus G en el desarrollo de hepatitis crónica. Pese a la detección del ARN-VHG en pacientes con hepatitis crónica criptogénica y a la persistencia del genoma viral en sangre durante años tras la infección aguda, aún no se ha documentado la progresión histológica de hepatitis aguda a crónica.

En un 55% de los casos que presentan virus G existe una elevación constante de las transaminasas, mientras que en un porcentaje del 45% la infección por este virus cursa con transaminasas normales, lo que sugiere que puedan existir portadores sanos del virus. Se desconoce la evolución a largo plazo de estos enfermos, aunque es posible el aclaramiento del virus por el organismo, con desaparición de la viremia y presencia de anticuerpos protectores (anti-E2) en un tiempo variable (hasta 17 años), cesando así la situación de portador sano del VHG (140).

Por otro lado, se ha detectado la infección por el virus G en pacientes cuyas biopsias demostraban una hepatitis crónica, en quienes se había descartado la infección por los virus B y C.

Las conclusiones respecto al papel del virus G en el desarrollo de hepatitis crónica están limitadas por el escaso número de pacientes infectados exclusivamente por este virus, sumado al de las biopsias hepáticas realizadas, por presentar la mayoría de pacientes con infección aislada por el VHG unos niveles normales de transaminasas. Este último dato no significa necesariamente que no existe lesión histológica hepática, como ya se ha demostrado en el caso del VHC (59).

I.2.3.3. Coinfección del virus G con el virus C

Son mucho más abundantes y esclarecedores los estudios realizados en relación con la coinfección por virus G en pacientes con hepatitis crónica por el virus C. El VHG presenta una alta prevalencia entre los pacientes con factores de riesgo parenteral, como los ADVP o los hemodializados, y comparte las mismas vías de transmisión que el VHC, por lo que los pacientes con VHC pueden estar coinfectados por los dos virus, lo que ocurre hasta en un 20% de casos (141). En todas las series estudiadas es común el alto índice de antecedentes de riesgo de transmisión parenteral, como transfusión, uso de drogas por vía intravenosa y, menos frecuentemente, el riesgo ocupacional (132). Sin embargo, en muchos casos no existe ningún factor de riesgo, lo que hace pensar en la posibilidad de que pudieran existir mecanismos desconocidos de transmisión parenteral, como ocurre con los virus B y C, o a través de otras vías todavía no identificadas.

Los pacientes que presentan seropositividad para el ARN del virus G tienden a ser más jóvenes que los no infectados, y en algunas series esta tendencia alcanza significación estadística (142). Este hecho podría indicar que, a diferencia de lo que ocurre con el virus C, la infección por el virus G puede remitir en el tiempo mediante la generación de una respuesta inmune competente por el huésped, lo que resultaría en la desaparición de la viremia detectable. Enomoto y cols. (143) han demostrado que la mitad de los pacientes con hepatitis crónica por virus C han estado expuestos al VHG y en una proporción de los mismos se ha eliminado este virus en un tiempo variable y sin mediación de tratamiento antiviral, apareciendo anticuerpos anti-E2 detectables en el suero de estos pacientes.

En el resto de características clínicas, bioquímicas e histológicas no existen diferencias entre los pacientes con infección aislada por el virus C y los coinfectados por ambos virus. Tampoco existen diferencias en las características virológicas de la infección por VHC: la distribución de genotipos es similar así como la carga viral.

También se ha estudiado la posible implicación de la coinfección por el virus G en la respuesta al tratamiento con IFN de los pacientes con hepatitis crónica C (144,145). Se ha comprobado que el virus G es sensible a dicha terapia, la cual induce una disminución de viremia hasta hacerla indetectable en algunos casos. Sin embargo, al igual que ocurre en la hepatitis C, es frecuente que esta respuesta sea sólo transitoria y que en la mayoría de los casos el virus G reaparezca al interrumpir el tratamiento. De hecho, la completa desaparición de la viremia del virus G sólo ocurre en los pacientes con baja carga viral antes de empezar el tratamiento, como se observa de forma característica con el VHC (144,146).

La sensibilidad del VHG al IFN es comparable a la del virus C pero independiente del mismo, y parece que ésta no es igual entre los diferentes tipos del virus de un mismo huésped, al igual que sucede con el VHC, por mecanismos aún no conocidos (136).

La coinfección con VHG no influye en la respuesta al IFN de los pacientes con hepatitis crónica por el virus C (147), llamando la atención la existencia de una importante disociación entre la presencia o no del virus G y la cifra de transaminasas. Las transaminasas aparecen alteradas o normales según el ARN-VHC esté presente o ausente, respectivamente, mientras que su valor parece independiente de la presencia o ausencia de ARN-G detectable (144,148). Esta observación constituye otro argumento en favor de la baja patogenicidad del virus G.

I.2.4. Diagnóstico de la infección por el virus G

El diagnóstico de la infección por el virus G se basa en la identificación en suero, aunque también en otros compartimentos como tejido hepático y CMSP, de secuencias del genoma viral mediante técnicas basadas en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de diversas regiones bien conservadas del genoma viral, como 5'NC, NS3 y NS5A (149,150). Como es obvio, esta técnica únicamente puede detectar la presencia de infección en sujetos con viremia. Estos procedimientos son complejos y caros, lo cual dificulta su aplicación en los laboratorios clínicos.

Recientemente se han descrito técnicas inmunológicas simples para la identificación de anticuerpos contra proteínas de la envoltura (anti-HGenv o anti-E2), codificadas por la región E2 del genoma del virus, obtenidas mediante técnicas de recombinación genética (130,140).

Estos anticuerpos se detectan en una elevada proporción de sujetos teóricamente expuestos a la infección, pero no en sujetos con viremia, lo que sugiere que la presencia de anticuerpos anti-E2 es indicativa de exposición-infección en el pasado por el virus G. Además, la presencia de anti-E2 antes del trasplante hepático se asocia a la ausencia de infección por el virus G después del trasplante, lo cual indica un posible papel protector de los anticuerpos anti-E2 en estos pacientes (151).

II. OBJETIVOS

Como ha quedado expuesto, el virus C posee una mayor heterogeneidad genética que el virus G en las regiones genómicas estudiadas. La complejidad de las cuasiespecies del virus C, en su región hipervariable, influye en la respuesta al tratamiento con IFN, y el IFN modifica la población de cuasiespecies tanto del virus C como del virus G, demostrado en las regiones hipervariable y NS5A en el virus C y en la región E2 en el virus G. Sin embargo, no se conoce la población de las cuasiespecies de otras regiones de los virus C y G, ni su dinámica en relación con el tratamiento en situación de coinfección.

Por estos motivos se ha realizado este estudio, con los siguientes objetivos:

1. Estudiar a nivel basal la complejidad genética de las cuasiespecies en la región NS3 de los virus C y G en pacientes coinfectados y compararla.
2. Valorar la influencia del IFN sobre las cuasiespecies de NS3 de ambos virus en pacientes coinfectados.
3. Comparar basalmente la diversidad de las cuasiespecies de las regiones 5'UTR y NS3 en los pacientes coinfectados por los virus C y G.
4. Estudiar la influencia del IFN sobre la diversidad genética de dichas regiones de los virus C y G en coinfección.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. 1. Pacientes

Se han estudiado retrospectivamente las muestras de suero de 161 pacientes, con hepatopatía crónica por virus C demostrada mediante biopsia hepática, presencia de anti-VHC en suero y evidencia de replicación viral con RNA positivo por PCR. En la tabla I se resumen las características basales de estos 161 pacientes.

Todos los pacientes recibieron tratamiento con Interferon α en distintos regímenes en cuanto a dosis y duración, variando entre 3 y 6 MU/m² de superficie corporal 3 días en semana y entre 6 y 12 meses (68 y 93 pacientes respectivamente). Los pacientes fueron evaluados cada dos semanas durante el primer mes de tratamiento, y después cada cuatro semanas durante los restantes meses de tratamiento y los seis meses de seguimiento tras completar el tratamiento. Antes de comenzar el tratamiento (basalmente) y en cada una de las revisiones durante los periodos de tratamiento y seguimiento, se practicaron las siguientes exploraciones: examen clínico y exploración física, hemograma y bioquímica completa incluyendo enzimas hepáticas.

Basalmente, al finalizar el tratamiento y al 6º mes de seguimiento se obtuvieron muestras de suero, que se congelaron inmediatamente a -70°C hasta su utilización, para determinación del RNA VHC mediante PCR. Se evaluó la respuesta al tratamiento como: **respuesta bioquímica** cuando la ALT era normal (<45 UI/L) al finalizar el tratamiento; **respuesta virológica** si el RNA VHC era negativo al concluir el tratamiento; **respuesta completa** cuando el nivel de ALT era normal y el RNA VHC eran negativo al finalizar el tratamiento, y **respuesta mantenida** si los niveles de ALT se mantenían dentro de los

Tabla I. Características basales de los pacientes

N° de pacientes	161
Edad (años *)	45 ± 14 (rango 18 - 68)
Sexo (hombres/mujeres)	65/96
GPT basal (UI/l *)	293 ± 137
Histología:	
- Hepatitis crónica portal	22 (13%)
- Hepatitis crónica periportal	83 (52%)
- Cirrosis hepática	56 (35%)

* Datos expresados como media ± estandar de la media

valores normales al finalizar las 24 semanas del periodo de seguimiento después del tratamiento y no se detectaba viremia C. La **recaída** o **recidiva** se definió como la elevación de los valores de ALT durante el periodo de seguimiento y presencia de VHC en suero, en aquellos pacientes que habían presentado una respuesta completa al tratamiento.

Retrospectivamente, en los sueros de los 161 pacientes se determinó el RNA del virus G mediante PCR en la muestra basal, y, en aquellos que fue positivo, se evaluó la presencia del RNA viral al final del tratamiento y al 6° mes de seguimiento. En algunos casos de coinfección se determinó el genotipo del virus C y se realizó la cuantificación de la viremia C cuando fue posible.

El estudio de las secuencias genómicas 5'UTR y NS3 para análisis y comparación de la complejidad y diversidad de las cuasiespecies virales únicamente se realizó en los pacientes no respondedores al tratamiento o en los que presentaron recidiva durante el periodo de seguimiento y además el virus G era positivo en las muestras postratamiento, es decir, en los que era posible detectar simultáneamente ambos virus en suero mediante PCR al final del tratamiento o al finalizar el seguimiento. Los pacientes que reunieron estas condiciones fueron, por tanto, incluidos en el grupo de estudio, que denominamos **grupo 1**, mientras que aquellos pacientes coinfectados por los virus C y G que no presentaban positividad simultánea de ambos virus en las muestras postratamiento se denominaron **grupo 2**.

III. 2. Métodos

III. 2. 1. Métodos de laboratorio

Determinaciones hematológicas

Para el recuento de hematíes, leucocitos y plaquetas, así como para la cuantificación de hemoglobina y fórmula leucocitaria, se utilizó el autoanalizador Coulter-counter, modelo S-plus.

Determinaciones bioquímicas

La determinación de los parámetros de bioquímica hepática y elemental se realizó mediante métodos estándar (Smac 20, Technicon Instrument Corporation, NY, USA).

Determinación de anticuerpos anti-VHC

Para la detección de anticuerpos anti-VHC se utilizó un inmunoensayo de segunda generación (ELISA 2, Ortho Diagnostic System, Inc., Raritan, NJ, USA) frente a los antígenos c33-C y c22-3. El test se consideró positivo si la densidad óptica de la muestra era la del control negativo + 0.400. Las muestras con resultado positivo para el método anterior se confirmaron mediante la técnica de segunda generación de inmunoblot recombinante (RIBA 2, Ortho Diagnostic System, Inc., Raritan, NJ, USA), que incorporan los péptidos c100-3, 5-1-1, c22-3 y c33-C.

III. 2.2. Métodos de biología molecular

Aislamiento del RNA VHC y VHG

Para extraer RNA total de una muestra de 250 μ l de suero se utilizó el reactivo Trizol LS (GIBCO BRL, NY, USA), seguido de la precipitación con isopropanol.

Cuantificación del RNA VHC

La cuantificación de la viremia VHC se realizó mediante la técnica "Amplicor HCV-Monitor test" (Roche Diagnostics Systems, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), sistema de PCR que incluye una cuantificación interna estándar que se coamplifica con el blanco para monitorizar la eficacia de la reacción de amplificación. La técnica se basa en una única transcripción reversa combinada con una reacción de amplificación del RNA VHC presente en las muestras (100 μ l) usando la enzima rTth DNA polimerasa. Después de la amplificación, los productos se diluyen de forma seriada a 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, y se hibridan paralelamente con los pocillos específicos de VHC (KY 150) y con otros pocillos que contienen Internal Quantitation Standard (IQS), que es una molécula sintética de RNA que presenta sitios de unión de primers idénticos a los del VHC, y una única y específica secuencia sonda para esta molécula. Los resultados se expresan como unidades de absorbancia (A_{450nm}). La mayor dilución que da un A_{450} entre 0.5 y 2 en placa de micropocillos KY 150, y la mayor dilución que da un A_{450} entre 0.5 y 2 en la placa de micropocillos IQS son seleccionadas y, la detección en un lector de placa de micropocillos permite su conversión en copias/ml de RNA VHC mediante un programa informático.

Determinación de los genotipos del virus C

El genotipaje se realizó mediante INNO-LIPA HCV II (Innogenetics N.V., Zwijndrecht, Bélgica), test basado en las variaciones encontradas en la región 5'UTR de los diferentes VHC que permite la determinación de los 6 principales tipos de VHC. Consta de unas sondas específicas de tipo que por la acción de una deoxinucleotidil transferasa acaban en una cola de poli (T), unidas a membranas de nitrocelulosa. En primer lugar se realiza la amplificación de la región 5'UTR, incorporando un grupo biotina mediante un primer 5'biotinilado, y el producto marcado se hibridará reversiblemente con una sonda de la tira que dé una pareja de secuencias perfecta, permitiendo una estrecha discriminación del tipo viral. Tras la hibridación, se añade estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, que se une a cualquiera de los híbridos biotinilados. La incubación con cromógeno BCIP/NBT da un precipitado de color morado a marrón, y la aparición de una línea de este color indica, por lo tanto, que hay un perfecto apareamiento entre la sonda y los productos de PCR biotinilados. El INNO-LIPA HCV II incluye una gráfica de interpretación, y utilizando ésta se deduce el genotipo recogiendo los números de las líneas positivas; la tira de INNO-LIPA contiene una línea de control de la prueba y 20 líneas paralelas de sonda de DNA. La línea de control conjugada es un control para la reacción de coloración, y la línea de control de amplificación contiene sondas universales que se hibridan con productos amplificados de cualquier tipo de VHC. La reactividad de un fragmento amplificado con una o más líneas de la tira permite un fácil reconocimiento del genotipo del VHC.

Amplificación de las regiones 5'UTR y NS3 del RNA VHC y VHG

El RNA precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada y se utilizó una alícuota de 5 µl para la amplificación de las regiones 5'UTR y NS3 de los virus C y G, mediante transcripción inversa a DNA complementario (RT-PCR). Las secuencias y la posición de los primers en cada RT-PCR se muestran en la tabla II.

En el caso del virus G, la amplificación de estas regiones genómicas se realizó según la técnica descrita por Madejón y cols. (152), utilizando unos primers externos antigenómicos (A1 y AMS3 para las regiones 5'UTR y NS3 respectivamente) para iniciar la síntesis del DNA complementario (cDNA). Posteriormente, después de un primer paso de desnaturalización del RNA (5 minutos a 95°C), se añadió la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT; Promega corporation, Madison, WI) y se llevó a cabo la transcripción reversa a 42°C durante 30 minutos, inactivando, finalmente, la AMV-RT por calor a 95°C. Seguidamente se añadieron los primer externos genómicos (S1 y AMS1 para la 5'UTR y NS3 respectivamente) y se realizó la PCR con un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, seguido de un paso intermedio de alineamiento de primers a 50°C un minuto y, finalmente, la elongación a 72°C durante un minuto, proceso que se repitió en 35 ciclos, con un paso final de elongación de 7 minutos a 72°C. La 2ª PCR se realizó en las mismas condiciones, utilizando el 10% del producto de la primera PCR y añadiendo simultáneamente los primers internos (A2 y S2 para amplificar la región 5'UTR y AMS2 y AMS4 para NS3).

Con respecto a la región 5'UTR del virus C, se transcribió en reverso a cDNA utilizando 15 unidades de AMV-RT utilizando el primer 2, antigenómico; antes de realizar la PCR nested, la muestra de cDNA se sometió a calor (95°C) durante 45 minutos para

Tabla II. Secuencia de los nucleótidos y posición de los primers utilizados en la amplificación de los virus C y G

		Secuencia de Nucleótidos	Posición
5'UTR			
VHG			
<i>Primers externos</i>	S1	CACTGGGTGCAAGCCCCCAGAA	13-33
	A1	CACTGGTCCTTGTCAACTCGC	358-378
<i>Primers internos</i>	S2	CGACGCCTACTGAAGTAGACG	36-56
	A2	GTACGCCTATTGGTCAAGAGA	336-356
VHC			
<i>Primers externos</i>	1	GGCGACACTCCACCATAGATC	9-29
	2	CATGGTGCACGGTCTACGAGA	315-335
<i>Primers internos</i>	3	CTGTGAGGA ACTACTGTCTT	36-55
	4	CTCGCAAGCACCTATCAGG	283-302
NS3			
VHG			
<i>Primers externos</i>	AMS1	GCTCGCCTATGACTCAGCATC	4194-4214
	AMS3	GTCACCTCAACGACCTCCTCC	4504-4524
<i>Primers internos</i>	AMS2	GAGACAAAGCTGGACGTTGGT	4226-4246
	AMS4	CAACCCACAGTCGGTGACAGA	4478-4498
VHC			
<i>Primers externos</i>	C1	TCTTGGGCATCGGCACAGTCC	4309-4329
	C2	GTCACAAACCTGTAGATGCCT	4820-4840
<i>Primers internos</i>	C3	GTCCTGGACCAAGCGGAGAC	4326-4345
	C4	GTCTCAATGGTGAAGGTGGG	4734-4753

inactivar la transcriptasa inversa. Posteriormente se realizó la primera PCR incluyendo el cDNA total así como el primers externo genómico correspondiente (ver tabla), amplificándose en un termociclador a 94°C durante 0.6 minutos, a 56°C durante 0.7 minutos y a 68°C durante 3 minutos, en un total de 25 ciclos. Del producto amplificado se tomaron 10 µl para llevar a cabo la segunda PCR, en las mismas condiciones que la primera PCR pero en 35 ciclos, utilizando los primers internos 3 y 4 (genómico y antígenómico respectivamente).

Para amplificar la región NS3 del VHC se realizó la transcripción inversa usando 15 unidades de AMV-RT y el primer externo antígenómico (C2), sometiendo después la muestra a 45°C durante 45 minutos. La primera PCR se realizó con la mezcla de cDNA total, añadiendo el correspondiente primer externo genómico (C1), a 94°C durante 2 minutos, a 94°C durante 1 minuto, a 50°C durante un minuto y a 68°C un minuto, durante 35 ciclos, al final de los cuales se incluyó una incubación prolongada a 68°C durante 7 minutos. La segunda PCR se llevó a cabo utilizando 10 µl del producto de la primera PCR, en las mismas condiciones que la PCR inicial, añadiendo los primers internos (C3 y C4).

Los fragmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% mediante luz ultravioleta.

Para evitar resultados falsos positivos se emplearon las medidas de prevención de contaminación descritas por Kwork e Higuchi (153); se incluyeron controles negativos adecuados en cada PCR y cada muestra fue examinada por duplicado en experimentos independientes, siendo la concordancia obtenida del 100% en todos los casos.

Análisis del polimorfismo conformacional de cadena simple de DNA (Single-strand conformation polymorphism, SSCP)

El cDNAs de la región genómica NS3 de los virus C y G se obtuvo mediante RT-PCR, como se ha descrito previamente, de las muestras basal y de seguimiento en aquellos pacientes que presentaban positividad para ambos virus en dichas determinaciones. La siguiente PCR se realizó en presencia de 0.2 μ Ci de 32 P-ATP (actividad específica: 3000 Ci/mmol, Amersham/USB, Buckinghamshire, UK). Un μ l del producto de la PCR se mezcló con 9 μ l de buffer compuesto por formamida al 95%, 20 mM de EDTA y 0.1% de cianol xileno, introduciendo posteriormente la mezcla en un gel de poliacrilamida no desnaturizante (Mutation detection enhancement gel (MDE gel), FMC Bioproducts, Rockland, ME). La electroforesis se realizó durante la noche, a 6W y 20°C, y, finalmente, se autoradiografió el gel.

Como control se amplificó y corrió en un gel de electroforesis 0.1 pg de los plásmidos pCNS3 y pGNS3, que contienen el producto amplificado de la primera PCR de la región NS3 de los virus C y G, respectivamente, clonado en el PCR[®] II-TOPO (TOPO[™] TA Cloning[®], Invitrogen, Calsbad, CA).

Análisis de las secuencias amplificadas

Los productos de PCR correspondientes a la amplificación de las regiones 5'UTR y NS3 de los genomas de los virus C y G se extrajeron del gel de agarosa al 1.5% utilizando el QIA quick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) y se secuenciaron directamente utilizando un secuenciador automático ALF (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). El alineamiento de la secuencia de nucleótidos se realizó utilizando el programa CLUSTAL X, version 1.6.

III.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 6.0, utilizando pruebas no paramétricas dado el tamaño muestral de los grupos. El test de Mann-Whitney se utilizó cuando las variables fueron cualitativas, así como el test de Chi-cuadrado o la prueba de Tau-b de Kendall si las variables eran ordinales, y el test de Wilcoxon se empleó para el estudio de muestras apareadas. El porcentaje de divergencia de las secuencias se comparó mediante el programa GENSTAT para windows, versión 5.3. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando la p fue inferior a 0.05.

IV. RESULTADOS

El RNA del virus G se detectó en el suero basal de 15 (9.3%) de los 161 pacientes estudiados, 10 hombres y 5 mujeres, con edades comprendidas entre 18 y 64 años (media: 40.2 ± 13.2). La dosis de IFN y la duración del tratamiento que recibieron estos pacientes se muestran en la tabla III.

IV. 1. Respuesta al tratamiento de los virus C y G en los pacientes coinfectados

De los 15 pacientes coinfectados por los virus C y G, 7 (46.6%) respondieron al tratamiento con respecto al virus C, negativizando además el virus G y, de ellos, 4 mantenían la respuesta al completar el período de seguimiento (el virus G reapareció en 3), mientras que recidivaron los 3 casos restantes. 8 pacientes (53.3%) no negativizaron el RNA VHC al final del tratamiento y, junto con los 3 pacientes que recidivaron se consideraron como no respondedores (11/15, 73.3%).

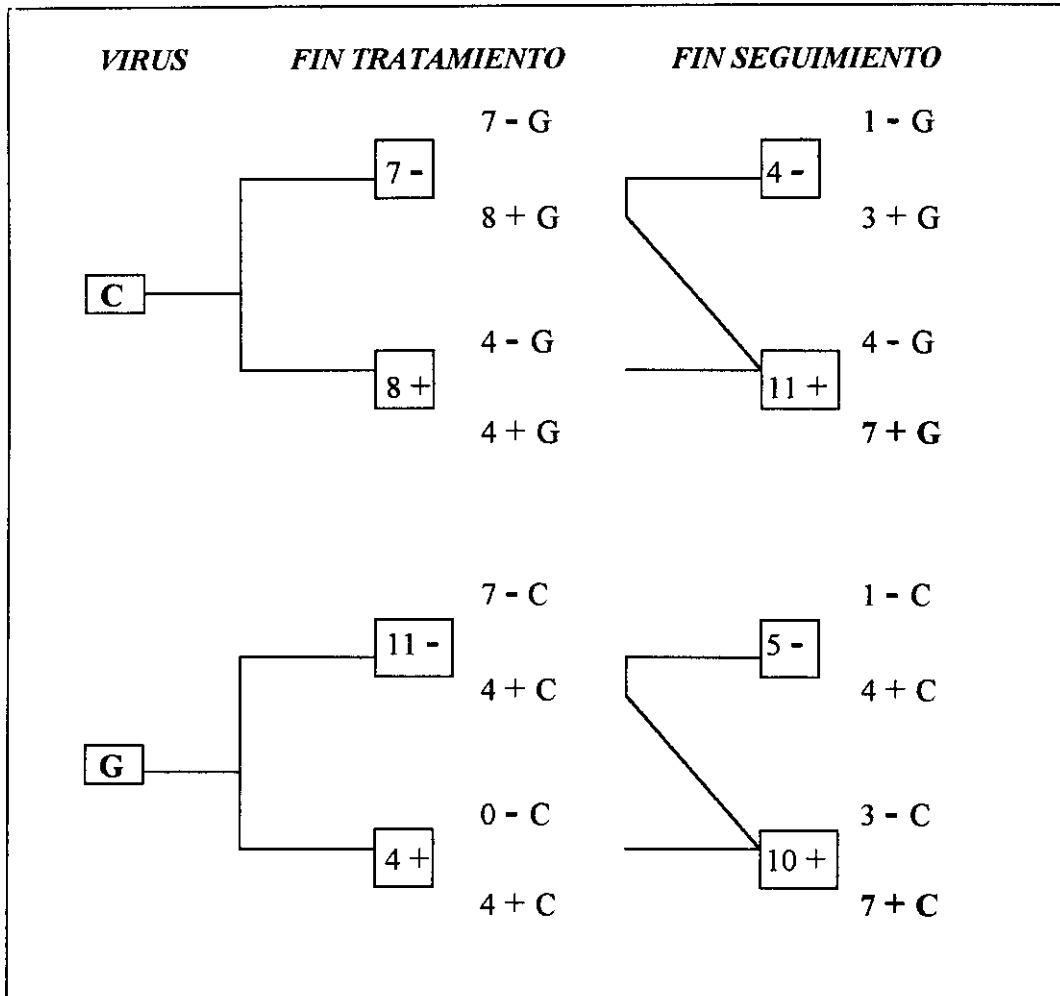
Al finalizar el seguimiento, 7 de los 11 pacientes no respondedores eran positivos para el virus G: 4 de ellos al final del tratamiento y los otros 3 consiguieron la negativización del virus G al final del tratamiento pero fue positivo en la muestra de seguimiento (figura 2).

Por lo tanto, hubo 7 (46.6%) pacientes en los que fue posible la detección simultánea de los virus C y G en las muestras séricas obtenidas al final del tratamiento o bien al 6º mes de seguimiento, es decir, cumplían los criterios para ser incluidos en el grupo de estudio o grupo 1. 8/15 pacientes no reunían las condiciones exigidas puesto que no estaban presentes ambos virus en las muestras postratamiento y se consideraron como grupo 2.

Tabla III. Pautas de tratamiento con IFN en los pacientes coinfectados

Nº Paciente	Tipo de IFN	Dosis (MU)	Frecuencia	Duración (meses)
1	Alfa 2a	6	L-X-V	12
2	Alfa 2a	6	L-X-V	12
3	Alfa 2a	6	L-X-V	6
4	Linfoblastoide	5	L-X-V	6
5	Linfoblastoide	5	L-X-V	6
6	Linfoblastoide	5	L-X-V	6
7	Alfa 2b	3	L-X-V	6
8	Linfoblastoide	6	L-X-V	12
9	Alfa 2b	5	L-X-V	6
10	Alfa 2b	5	L-X-V	6
11	Alfa 2b	5	L-X-V	6
12	Alfa 2b	5	L-X-V	6
13	Linfoblastoide	6	L-X-V	12
14	Linfoblastoide	6	L-X-V	12
15	Linfoblastoide	6	L-X-V	6

Figura 2. Respuesta de los virus C y G al tratamiento en los pacientes coinfectados



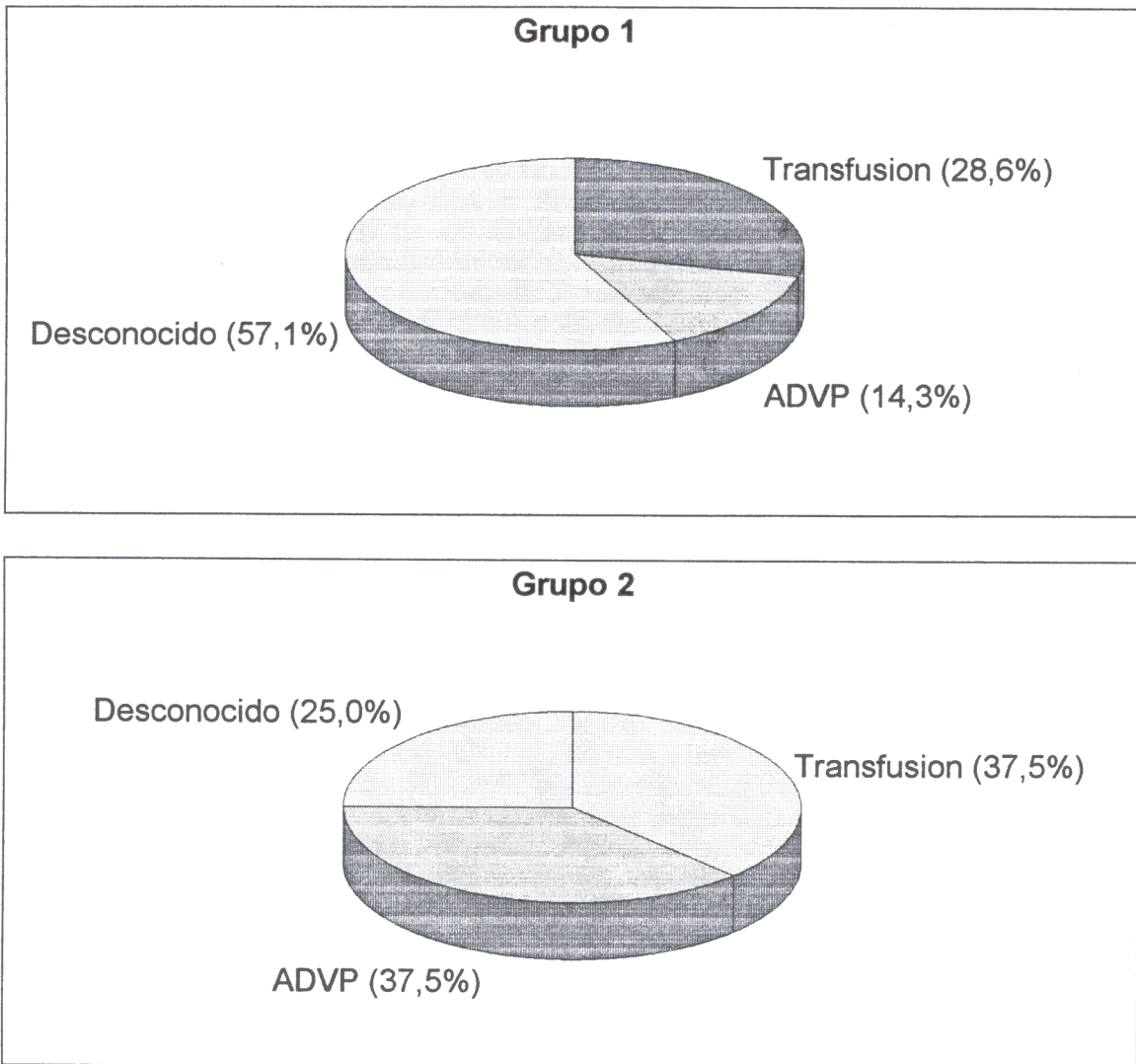
IV.2. Comparación de las características de pacientes coinfectados según la respuesta de los virus C y G

De los 7 pacientes coinfectados por los virus C y G postratamiento (grupo 1), 4 (57.1%) eran hombres y 3 (42.8%) eran mujeres, con una edad media de 45.2 ± 12.5 (rango: 24-64). No hubo diferencia con respecto al grupo 2 en cuanto al sexo (6 (75%) hombres y 2 (25%) mujeres, $p=0.405$), aunque en este grupo hubo un claro predominio del sexo masculino, ni en relación a la edad, ya que en el grupo 2 la edad media fue de $35.8 \pm 13, 10$ años inferior a la del grupo 1, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.132$).

Con respecto a la epidemiología de la infección viral, en el grupo 1 los factores de riesgo para el contagio de la infección fueron (figura 3): la transfusión de hemoderivados en 2 casos, el uso de drogas por vía parenteral en 1 paciente y no se demostró ningún factor de riesgo conocido en los 4 restantes. Los factores de riesgo del grupo 2 fueron: la transfusión en 3 casos, la administración de drogas por vía parenteral en otros 3 y desconocido en 2 pacientes. No se encontró diferencia significativa entre los 2 grupos con respecto al factor de riesgo ($p=0.405$).

El tiempo medio de evolución de la hepatopatía del grupo 1 fue de 47.57 ± 25.8 meses (rango: 13-86 meses), superior al del grupo 2, con un tiempo medio de 41.7 ± 28 meses (rango: 12-88 meses), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.602$).

Figura 3. Distribución de la vía de contagio



La pauta de tratamiento fue similar en los 2 grupos, tanto en dosis como en duración: sólo hubo un paciente de grupo 2 que recibió un dosis menor, 3 M.U., frente al resto que recibieron 5 ó 6 M.U., y en 2/7 y 3/8, respectivamente, el tratamiento tuvo una duración de 12 meses, mientras que en los casos restantes fue de 6 meses.

A nivel analítico, los valores de ALT de los 2 grupos determinados basalmente, al final del tratamiento y al 6° mes de seguimiento aparecen en las tabla IV y V.

Se comparó el valor de ALT basal de los dos grupos (grupo 1: 116.7 ± 64.6 UI/l; grupo 2: 128.8 ± 82.5 UI/l), sin encontrar diferencia significativa ($p=0.867$), y lo mismo ocurrió cuando se comparó la cifra de ALT al final del tratamiento (grupo 1: 74.1 ± 50.2 UI/l; grupo 2: 44.7 ± 29.2 UI/l) ($p=0.121$).

En ambos grupos se apreció un considerable descenso en el valor medio de ALT, que fue más acusado en el 2° grupo, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística; al 6° mes de seguimiento aumentó el valor medio de ALT en los 2 grupos, aunque de forma más importante en el primero con respecto al segundo (grupo 1: 155.5 ± 153.4 UI/l; grupo 2: 73.1 ± 110.6 UI/l), y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (figura 4).

En cuanto a la respuesta bioquímica, en el grupo 1 se alcanzó en dos pacientes (28.6%), siendo una respuesta completa en uno de ellos que negativizó también el VHG, pero al final del seguimiento se observó recaída bioquímica en ambos casos. No obstante, la elevación de ALT (57 y 96 UI/l respectivamente) no alcanzó los valores basales de estos pacientes (65 y 170 UI/l respectivamente).

Tabla IV. Valores de ALT de los pacientes del grupo 1

Paciente	ALT basal	ALT fin tto	ALT seguimiento
1	75	49	66
2	241	75	487
3	86	61	83
4	90	186	101
5	90	73	199
6	65	42	57
7	170	36	96

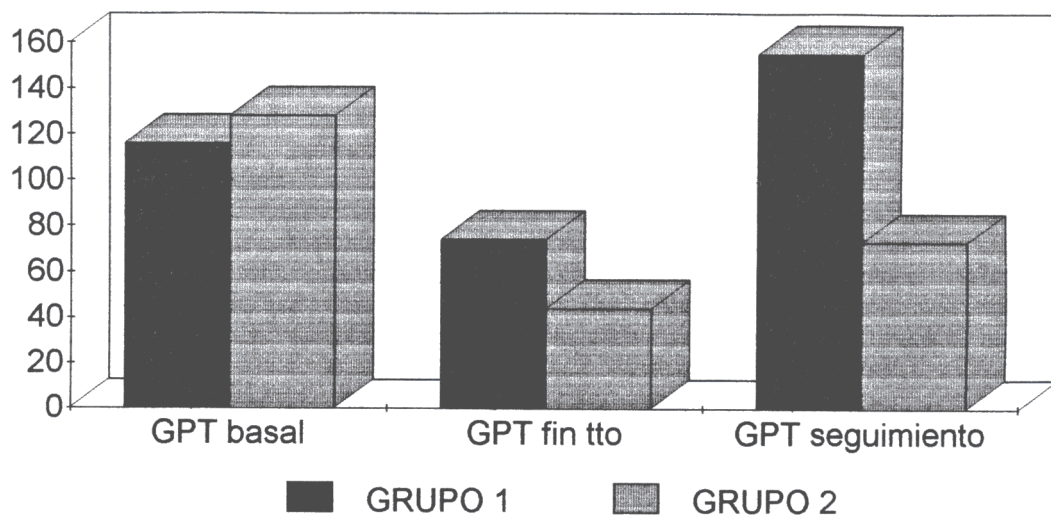
Cifra de ALT expresada en UI/l

Tto: tratamiento

Tabla V. Valores de ALT de los pacientes del grupo 2

Paciente	ALT basal	ALT fin tto	ALT seguimiento
1	252	39	343
2	100	86	52
3	113	31	36
4	268	20	13
5	87	40	12
6	74	13	18
7	75	93	53
8	62	36	58

Figura 4. Evolución bioquímica



En el grupo 2, 6/8 pacientes (75%) tuvieron una respuesta completa al final del tratamiento, negativizando además el virus G. En el seguimiento, 2 pacientes recidivaron, permaneciendo negativos para el virus G, mientras que 4 pacientes mantuvieron la respuesta completa y en 3 de ellos reapareció el virus G (tablas VI y VII).

Solamente se pudo cuantificar la viremia basal en 9/15 pacientes, 5 pertenecientes al grupo 1 y 4 al grupo 2. En el resto de los casos no se dispuso de material suficiente para realizar este análisis. En el grupo 1 la carga viral media fue $3.8 \times 10^5 \pm 5.7 \times 10^5$ copias/ml, con un rango de 1.1×10^3 a 1.3×10^6 copias/ml; en el grupo 2 la viremia media fue menor, de $3.7 \times 10^4 \pm 6.3 \times 10^4$ copias/ml (rango: 1.7×10^3 - 5×10^5 copias/ml), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.624$).

En estos mismos pacientes se determinó el genotipo, que fue 1b en todos los casos.

En relación a la lesión histológica hepática (figura 5), en el grupo 1 hubo 5 pacientes que presentaron una hepatitis crónica periportal, 1 caso mostró una cirrosis y en otro paciente el diagnóstico fue una hepatitis crónica portal. En el grupo 2 presentaron una hepatitis crónica periportal 7 pacientes y una cirrosis el caso restante.

La comparación entre los diagnósticos histológicos de ambos grupos no demostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.529$). Se analizó el IAH (índice de actividad histológica) de ambos grupos, que resultó considerablemente inferior en el grupo 2, con una media de 5.8 ± 1.2 , con respecto al grupo 1, cuya media fue de 7 ± 2.9 , pero la diferencia no alcanzó significación estadística ($p=0.175$).

Tabla VI. Respuesta bioquímica del grupo 1

<i>Paciente</i>	<i>ALTfin</i>	<i>RNA-Cfin</i>	<i>RNA-Gfin</i>	<i>ALTseg</i>	<i>RNA-Cseg</i>	<i>RNA-Gseg</i>
6	42	+	+	57	+	+
7	36	-	-	96	+	+

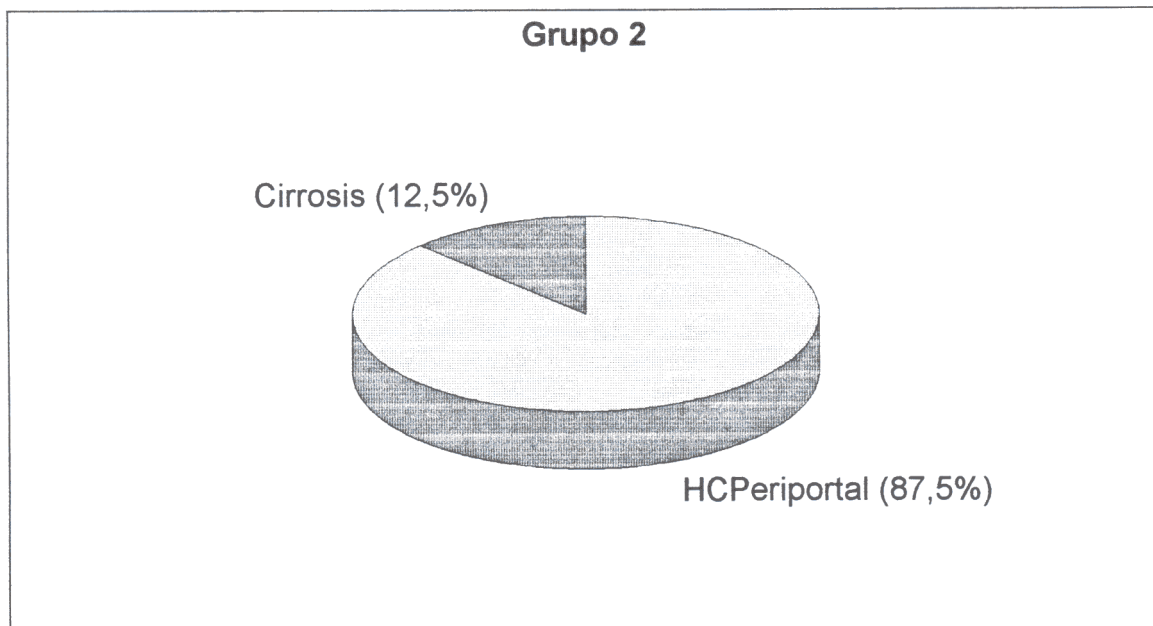
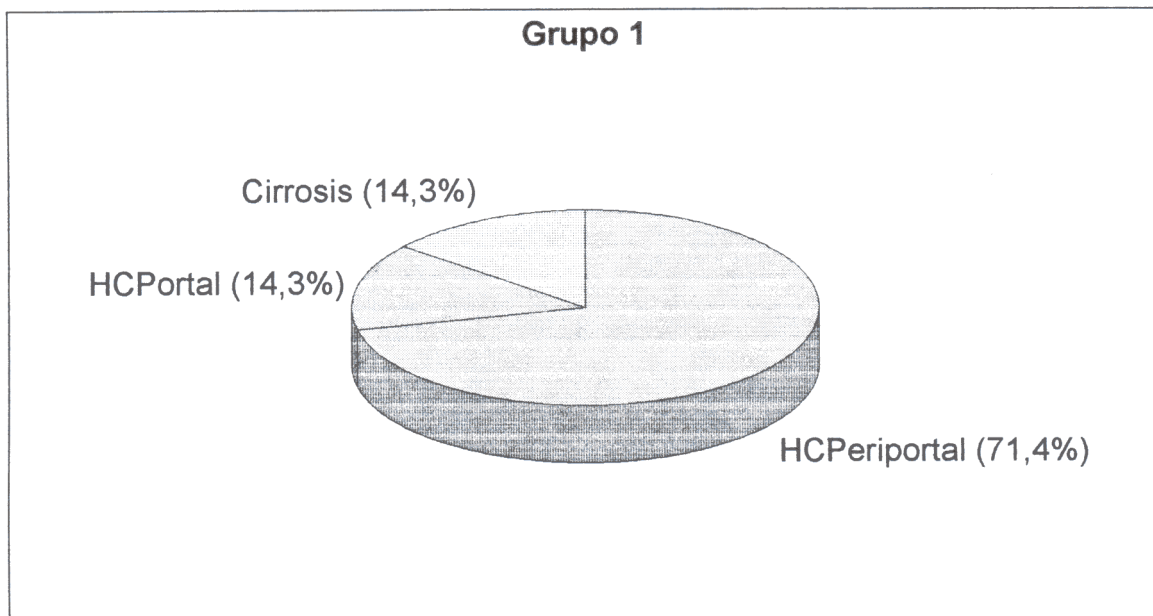
fin: final de tratamiento

seg: seguimiento

Tabla VII. Respuesta bioquímica del grupo 2

<i>Paciente</i>	<i>ALTfin</i>	<i>RNA-Cfin</i>	<i>RNA-Gfin</i>	<i>ALTseg</i>	<i>RNA-Cseg</i>	<i>RNA-Gseg</i>
1	39	-	-	343	+	-
3	31	-	-	36	-	+
4	20	-	-	13	-	+
5	40	-	-	12	-	+
6	13	-	-	18	-	-
8	36	-	-	58	+	-

Figura 5. Distribución de la lesión histológica



Posteriormente se compararon de forma independiente los grados de inflamación periportal (grupo 1: 2.1 ± 1.2 ; grupo 2: 1.7 ± 0.4), portal (grupo 1: 2.7 ± 0.9 ; grupo 2: 2.3 ± 0.9) y lobulillar (grupo 1: 2.1 ± 0.9 ; grupo 2: 1.7 ± 0.8), y no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ($p=0.253$, $p=0.376$ y $p=0.558$, respectivamente). Asimismo, se comparó el estadio de fibrosis de los 2 grupos y tampoco existió diferencia significativa (grupo 1: 2.5 ± 1.1 ; grupo 2: 1.8 ± 1.1 , $p=0.152$). En las tablas VIII y IX se muestran los diagnósticos histológicos por paciente en los respectivos grupos.

Tras finalizar el periodo de seguimiento postterapia, se realizó una biopsia hepática a 9 de los 15 pacientes coinfectados, 4 pacientes de grupo 1 y 5 del grupo 2, y se comparó el resultado histológico con el obtenido previamente al tratamiento. En las tablas X y XI aparecen los diagnósticos histológicos de las biopsias finales.

En 2 pacientes (50%) del grupo 1 (casos 2 y 3) se observó una mejoría histológica que consistió en una menor puntuación tanto del IAH (de 8 a 3 y de 12 a 11, respectivamente) como del estadio (de 2 a 1 y de 4 a 3, respectivamente), mientras que en los otros 2 casos (6 y 7) aumentó el IAH (de 7 a 8 y de 2 a 4, respectivamente) sin variar el estadio. Estos últimos pacientes presentaron respuesta bioquímica con recidiva posterior (en uno de ellos la respuesta fue completa), sin existir respuesta en los 2 primeros casos.

En el grupo 2 la lesión histológica regresó de forma considerable en 3 pacientes (casos 4, 5 y 6), evolucionando desde una hepatitis periportal a una portal en 2 casos y a una curación histológica en el caso restante; en el paciente 3 disminuyó el IAH, de 8 a 3, sin modificarse el diagnóstico ni el estadio y en el último caso se observó un aumento del IAH, de 4 a 5, con reducción del estadio, de 2 a 1. Los 4 (80%) pacientes que presentaron una

regresión de la lesión histológica eran respondedores al tratamiento, de forma mantenida, mientras que fue no respondedor el único paciente en el que la histología no mejoró.

Por lo tanto, globalmente la histología evolucionó de forma favorable tras el tratamiento, pero la mejoría fue más acusada en el grupo 2 coincidiendo con la respuesta completa mantenida al tratamiento.

Tabla VIII. Diagnósticos histológicos de las biopsias basales del grupo 1

Nº Paciente	Diagnóstico	I.A.H.	Inflamación Portal	Inflamación Periportal	Inflamación lobulillar	Estadío
1	HCPeriportal	6	2	2	2	2
2	HCPeriportal	8	3	3	2	2
3	Cirrosis	12	4	4	4	4
4	HCPeriportal con puentes	7	3	2	2	3
5	HCPeriportal con puentes	7	3	2	2	3
6	HCPeriportal	7	3	2	2	2
7	HCPortal	2	1	0	1	1

HC: Hepatitis crónica; I.A.H.: Índice de actividad histológica

Tabla IX. Diagnósticos histológicos de las biopsias basales del grupo 2

Nº Paciente	Diagnóstico	I.A.H.	Inflamación Portal	Inflamación Periportal	Inflamación lobulillar	Estadío
1	HCPeriportal	6	3	1	2	1
2	Cirrosis	6	2	2	2	4
3	HCPeriportal con puentes	8	4	2	2	3
4	HCPeriportal	7	3	2	2	2
5	HCPeriportal	5	2	1	2	1
6	HCPeriportal	5	2	2	1	1
7	HCPeriportal	4	2	2	0	2
8	HCPeriportal	6	1	2	3	1

Tabla X. Diagnósticos histológicos de las biopsias finales del grupo 1

NºPaciente	Diagnóstico	I.A.H.	Inflamación Portal	Inflamación Periportal	Inflamación lobulillar	Estadio
2	HCPeriportal	3	1	1	1	1
3	HCPeriportal con puentes	11	4	4	3	3
6	HCPeriportal	8	3	3	2	2
7	HCPortal	4	3	0	1	1

HC: Hepatitis crónica; I.A.H.: Índice de actividad histológica

Tabla XI. Diagnósticos histológicos de las biopsias finales del grupo 2

NºPaciente	Diagnóstico	I.A.H.	Inflamación Portal	Inflamación Periportal	Inflamación lobulillar	Estadio
3	HCPeriportal con puentes	3	2	0	1	3
4	HCPortal	2	1	0	1	1
5	HCPortal	2	1	0	1	0
6	Parenquima sin alteraciones	0	0	0	0	0
7	HCPeriportal	5	1	1	3	1

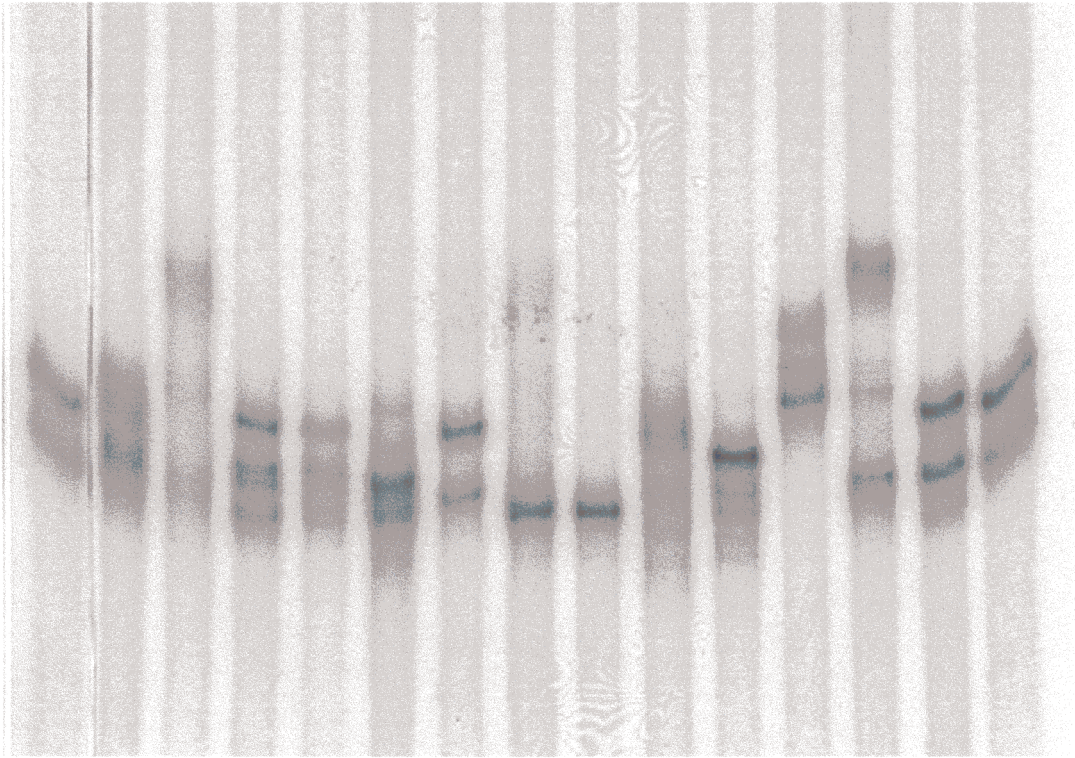
IV.3. SSCP de la region NS3 de los virus C y G

Virus C (figura 6)

El análisis realizado en la muestra basal de los 7 pacientes coinfectados pre y postratamiento mostró un n° medio de bandas de 4.4 ± 1.3 (rango: 2-6 bandas), mientras que en las muestras obtenidas hasta completar el seguimiento el n° medio fue de 3.3 ± 1.4 bandas (rango: 2-5 bandas), aunque este descenso en el n° de bandas con respecto al n° basal no fue estadísticamente significativo ($p=0.06$). En cuatro pacientes (57.1%) disminuyó el n° de bandas, en ningún paciente aumentó y en 3 casos (42.9%) no se modificó dicho número.

En los pacientes que presentaron respuesta bioquímica al final del tratamiento, el n° basal de bandas fue de 5 y 6, respectivamente, similar al n° medio de bandas de los pacientes que no respondieron, con 4.0 ± 1.2 bandas; también fue similar en las muestras posterapia, con un n° de 2 y 5 bandas, respectivamente, en los 2 respondedores y un n° medio de 3.2 ± 1.3 bandas en los casos en que no hubo respuesta.

Figura 6. SSCP de la región NS3 del virus C



C	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	
	<hr/>		<hr/>		<hr/>		<hr/>		<hr/>		<hr/>		
Paciente	1		2		3		4		5		6		7

Virus G (figura 7)

No se observó diferencia en el nº de bandas del SSCP entre las muestras basales (4 ± 1.9 bandas; rango: 2-7 bandas) y las muestras finales (4.4 ± 2.3 bandas; rango: 2-8 bandas) ($p=0.715$). En 3 pacientes (42.9%) fue superior el nº de bandas en la muestra final, habiendo negativizado el virus dos de ellos, con recidiva posterior, mientras que en 3 (42.9%) casos no se modificó el nº de bandas y sólo en un caso (14.2%) fue menor.

En los 2 casos que respondieron bioquímicamente el nº de bandas fue de 4, similar al nº medio de los 5 pacientes no respondedores, 4 ± 2.3 bandas y en las muestras de seguimiento el nº de bandas fue de 4 y 8, respectivamente, en los casos en los que hubo respuesta, y de 3.8 ± 2.1 bandas en los que no la hubo. Como puede observarse en estos dos pacientes, el nº de bandas del virus G aumentó en un caso y no se modificó en el otro.

Comparación virus C-virus G

No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar el nº de bandas de ambos virus en las muestras basales de los 7 pacientes (4.4 ± 1.3 VHC frente a 4 ± 1.9 VHG, $p=0.352$), ni al realizar esta misma comparación en las muestras obtenidas postterapia (3.3 ± 1.4 VHC frente a 4.4 ± 2.3 VHG, $p=0.177$).

Al analizar el nº de bandas basal del SPSS en los 2 virus no se encontró relación entre el nº de bandas y la vía de contagio de la infección, y comprobamos que este número no aumentaba con la edad del paciente, con el tiempo de evolución de la enfermedad ni con

la severidad de la lesión histológica. En este sentido, tampoco hubo relación entre el cambio del nº de bandas postratamiento en los dos virus y la evolución histológica observada en los casos que se biopsiaron postratamiento; así, la regresión histológica (2 casos) se acompañó de una reducción del nº de bandas del SPSS del virus C, y de aumento en 1 caso y de ausencia de variación en el otro para el virus G, y la progresión histológica ocurrió en 2 pacientes en los que disminuyó el nº de bandas del virus C y en el virus G aumentaron en un caso sin modificarse en el otro.

Por otra parte, se observó que las variaciones que aparecían en el SPSS tras el tratamiento no ocurrían paralelamente en ambos virus, sino de forma independiente, ya que los cambios en el nº de bandas de uno de ellos no se acompañaba del mismo cambio en el otro virus, sino que unas veces la cifra no sufría modificaciones y otras se producía el efecto contrario al ocurrido en el primero. Así, en los pacientes que presentaron respuesta bioquímica, el nº de bandas del virus C disminuyó, mientras que aumentaron las bandas del virus G en un caso sin modificarse en el otro.

IV.4. Divergencia de las secuencias 5'UTR y NS3 de los virus C y G

La secuenciación directa de los productos de PCR de las regiones 5'UTR y NS3, tanto a nivel basal como tras tratamiento, mostró que la divergencia de las secuencias era estadísticamente superior en el virus G que en el virus C ($p < 0.01$) (tabla XII).

El porcentaje de divergencia de las secuencias no se relacionó con características como la edad, el sexo, el tiempo de evolución ni con la severidad de la lesión histológica.

Por último, cuando se compararon las secuencias basales y finales de las 2 regiones en cada virus no se encontraron diferencias significativas.

Tabla XII. Comparación de la divergencia de las secuencias 5'UTR/NS3

<i>5'UTR</i>		
	<i>VHC</i>	<i>VHG</i>
Basal	4.1±1.1 (rango: 3-6%)	8.9±1.8 (rango: 6-12%)
Final	4.6±0.8 (rango: 3-6%)	7.6±1.9 (rango: 5-12%)
<i>NS3</i>		
	<i>VHC</i>	<i>VHG</i>
Basal	10.6±2.3 (rango: 6-15%)	21.9±5 (rango: 10-32%)
Final	10.1±2.2 (rango: 7-13%)	20±4.9 (rango: 7-24%)

V. DISCUSIÓN

La heterogenicidad genética del virus C es uno de los factores que pueden contribuir a la cronificación de la infección y a la escasa respuesta al tratamiento antiviral (IFN) en los pacientes con hepatitis C; así, Le Guen (154) en su estudio encuentra correlación entre la complejidad de las cuasiespecies y la respuesta al tratamiento, y Pawlotsky (113) demuestra que a mayor diversidad genética de la RHV del virus C, menor es la posibilidad de respuesta completa mantenida al IFN. Además, el tratamiento con IFN puede actuar sobre la variabilidad genética de esta región genómica, aumentándola (114), probablemente porque el virus es capaz de generar variantes mutantes que “escapan” del control inmunológico del huésped conduciendo a una falta de respuesta al IFN.

En otras secuencias del genoma del VHC, como en la región NS5A, también ha sido posible demostrar la inducción de variaciones en la población de cuasiespecies por el IFN (115), de forma que, tras la terapia, persisten aquellas variantes virales con una secuencia determinada entre los aminoácidos 2209 y 2248, mientras que aquellos con un n° de sustituciones ≥ 4 son eliminados durante el tratamiento. Pero existe discrepancia con respecto a estos resultados y a su interpretación (118,119), por lo que parece necesario ampliar el conocimiento sobre la variabilidad genética del virus C para poder explicar su patogenia y para optimizar la respuesta al tratamiento.

El virus G presenta una mayor conservación de sus secuencias en comparación con el virus C y carece de región hipervariable, aunque circula como cuasiespecies en un mismo individuo; no obstante, hasta el momento es escasa la información existente sobre su variabilidad genética y el efecto del IFN sobre ella, estudiada únicamente a nivel de la región E2 (136).

La distribución genómica en un individuo en forma de cuasiespecies resulta, probablemente, de complejas interacciones entre el huésped y la variante viral infectante, dotando al virus de una significativa ventaja que le permite sobrevivir en un medio adverso, ya que, ante cualquier nueva condición ambiental, existe una rápida selección de aquellos mutantes más capacitados para subsistir. La RHV del virus C es donde más ampliamente ha sido estudiado el fenómeno de las cuasiespecies, y se ha argumentado que la selección de las variantes virales se produce fundamentalmente por una presión selectiva ejercida por el sistema inmune del huésped, puesto que esta región genómica actúa como diana de la respuesta humoral, es decir, de los anticuerpos anti-VHC (113).

En general, es escasa la información existente en relación a las cuasiespecies de otras regiones del virus C (y más aún respecto al virus G), tanto sobre su aparición como acerca de la persistencia en el huésped (sin poder establecer una correlación clínica por ello), y de las posibles presiones selectivas a que son sometidas, especialmente la presión del tratamiento con IFN, y esto es así porque hasta poco tiempo los métodos disponibles para estudio de las cuasiespecies eran tremendamente laboriosos (requerían del clonaje y la secuenciación), de elevado coste y, en muchos casos, de baja sensibilidad (33,38).

Un nuevo método estandarizado, sencillo, rápido, reproducible y con elevada sensibilidad, el SSCP, ha facilitado el análisis de las cuasiespecies (155) y, actualmente, se considera como la mejor técnica para evaluar las “variantes mayores” dentro de la población de cuasiespecies, es decir, la complejidad de las cuasiespecies (113).

Por ello el SSCP fue el método que utilizamos para estudiar la complejidad de cuasiespecies de los virus C y G sobre la región NS3, considerada como una región bastante conservada entre los diferentes aislados del virus C, y con una función relevante en la regulación del ciclo vital del virus C, pues procesa la poliproteína a través de sus actividades

serin-proteasa y RNA-helicasa; por su acción específica, estas enzimas representan una importante diana sobre la que podrían actuar futuros tratamientos antivirales, interrumpiendo así el ciclo viral (21,26), y sería interesante conocer las diferentes variantes virales (cuasiespecies) de NS3 que, según su acción reguladora sobre el ciclo viral podrían influir en la persistencia viral y en la respuesta al tratamiento. Por este motivo analizamos la complejidad de cuasiespecies de esta región de los virus C y G en coinfección, basalmente y tras tratamiento con IFN; además, mediante la secuenciación de los productos de PCR de NS3 y de la región 5'UTR, estudiamos la diversidad de cuasiespecies de los 2 virus en coinfección.

En este estudio un 9.3% de los pacientes con hepatitis crónica C estaban coinfectados por el virus G, porcentaje similar al descrito, pues la prevalencia de la infección por el virus G en los pacientes con hepatitis C se sitúa en el 6-19% (141).

Coincidiendo con otros estudios, la edad media de los pacientes coinfectados (40.2 ± 13.2 años) fue inferior a la de los pacientes con infección aislada por el virus C (45 ± 14 años), hecho cuya significación no se conoce y que para algunos autores podría indicar cómo con el tiempo se podría generar una respuesta inmune competente y conseguir así la eliminación de virus G (142).

En relación con el virus C, la respuesta completa al tratamiento se consiguió en 8/15 pacientes coinfectados, un 53.3%, con recaída de 4/8 casos (50%), por lo que al final del seguimiento alcanzaron la respuesta mantenida 4/15 pacientes (26.6%); estos resultados concuerdan con los datos disponibles sobre la eficacia del tratamiento con IFN en pacientes

portadores de hepatitis crónica C (98,99), y confirman la ausencia de influencia de la coinfección por el virus G en la respuesta al IFN de este grupo de pacientes (146,156).

Con respecto al virus G, se consiguió la negativización del RNA al final del tratamiento en 11/15 pacientes (73.3%), pero en 6 de estos 11 casos (54.6%) fue positivo al 6° mes de seguimiento, por lo que 5/15 pacientes (33.3%) permanecían negativos para el virus G al completar el periodo de seguimiento. Igualmente, la respuesta al tratamiento del virus G está en relación con la obtenida en estudios similares (147,157) y se demuestra que es independiente de la del virus C.

Del total de pacientes coinfectados, se seleccionaron aquellos no respondedores que persistían coinfectados al finalizar el seguimiento, para estudiar la variabilidad genética, y no hubo diferencias significativas respecto a los casos restantes que pudieran explicar la diferente respuesta al tratamiento de los 2 grupos, en relación a:

- el sexo, aunque en el grupo de pacientes no coinfectados postratamiento existía un predominio masculino,
- la edad, que fue inferior en el grupo no coinfectado postterapia, y, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, debe tenerse en cuenta su influencia sobre la diferente respuesta observada en este grupo, confirmando que la edad inferior es un factor predictivo de respuesta favorable al tratamiento (111,112),
- a la vía de contagio, aunque en el grupo de estudio el porcentaje de advp fue inferior con respecto al otro grupo (figura 3), y esta es la vía de contagio que se ha relacionado con una mejor respuesta al tratamiento (111), factor que debemos considerar ante la ausencia de respuesta en este grupo de pacientes y la presencia de respuesta en el contrario,

- al tiempo de evolución de la enfermedad, que aunque resultó superior en el grupo de estudio no lo fue de forma significativa, pero es otro de los factores que pudo contribuir a la no respuesta en estos pacientes,
- la cifra de ALT basal,
- la carga viral basal ni el genotipo infectante, y
- la lesión histológica hepática pretratamiento.

Por lo tanto, no hubo diferencias entre los dos grupos en los factores predictivos de respuesta, ni en lo que se refiere a las características de los pacientes ni en relación con los factores virales que generalmente se estudian, es decir, la carga viral y el genotipo del VHC.

Complejidad de las cuasiespecies de NS3 de los virus C y G a nivel basal

El análisis de las cuasiespecies de la región NS3 mediante SSCP, a nivel basal, no mostró diferencias significativas al comparar el nº de bandas del virus C con el del virus G ($p=0.352$). La complejidad de las cuasiespecies no guardó relación en uno ni en otro virus con el factor de riesgo para adquirir la infección, frente a los resultados de Pawlotsky (113), que tras analizar las cuasiespecies de la RHV del virus C concluye que es mayor la complejidad cuando la vía de contagio es la transfusión que cuando es la drogadicción, y sugiere que es el tamaño del inóculo inicial el que puede dar lugar a la mayor aparición posterior de cuasiespecies.

Además, y en relación con este mismo estudio, el nº de bandas obtenido en el SSCP de la región NS3 de ambos virus (virus C: 4.4 ± 1.3 , rango 2-6; virus G: 4 ± 1.9 , rango 2-7) es inferior al que encuentran estos autores en la región HVR del virus C (5.4 ± 2 , rango 2-11),

como era de esperar, ya que nosotros hemos estudiado una región más conservada y sometida a una menor presión inmunológica que la región HVR del virus C.

Por otra parte, y asintiendo con Pawlotsky, no hemos encontrado ninguna asociación entre el nº de variantes mayores de las cuasiespecies de NS3 en ambos virus y otras características como la edad, el tiempo de evolución de la hepatopatía, el genotipo del virus C, la carga viral, etc.

Los datos obtenidos de este primer análisis permiten concluir que la complejidad de las cuasiespecies de la región NS3 es similar en los virus C y G.

Según Lamonaca (158), la región NS3 representa un epítipo inmunodominante capaz de estimular la proliferación de las células T (CD4), pudiendo ser presentado a éstas por diferentes moléculas HLA de clase II. Dada su elevada conservación entre los diferentes aislados del virus C, esta capacidad hace de esta región un epítipo ideal como componente de una futura vacuna basada en la respuesta inmune celular. En este sentido, recientes estudios han demostrado que existen diferentes patrones proliferativos de las células T y de la producción de citoquinas por las células CD4 antígeno-específicas en los pacientes con infección aguda autolimitada (en los que esta respuesta es más vigorosa) y en aquellos con infección crónica por el virus C (en quienes la respuesta de las células T es menos eficaz), sugiriendo que la intensidad de la respuesta de las células T en estadios iniciales de la infección viral puede ser crítica para controlar la replicación viral y contener la infección (159,160,161).

La infección por el virus C tiende a cronificar en un elevado porcentaje de casos, frente a la escasa tendencia del virus G (120,122). Este estudio no ha demostrado

diferencias en la población de cuasiespecies de NS3 entre ambos virus, que, de existir, podrían generar diferentes epítomos con distinta capacidad para estimular a las células T dando lugar, por tanto, a una diferente eficacia en la respuesta de éstas, y explicaría la diferente cronología de la infección por estos dos virus; no obstante, sería interesante estudiar otros factores implicados en la activación del sistema inmune celular que pueden intervenir en la distinta evolución de la infección por los virus C y G, como son la presentación de este antígeno a las células T por diferentes moléculas HLA-II y la antigenicidad de otras regiones virales también conservadas.

Complejidad de las cuasiespecies de NS3 de los virus C y G al final del seguimiento

Las variantes mayores de las cuasiespecies de NS3 no se modificaron significativamente tras el tratamiento con IFN, ni en el caso del virus C ni en el caso del virus G, y tampoco hubo diferencias al comparar estas variantes finales en los 2 virus. No obstante, el nº de bandas en el SSCP fue superior en el virus G, tanto con respecto al resultado basal como al compararlo con las muestras finales del virus C, lo cual iría a favor de un aumento de la complejidad de cuasiespecies de NS3 del virus G postratamiento, aunque no de forma significativa, y quizá debida a una mayor selección de variantes virales de esta región genómica por el IFN.

La respuesta bioquímica, observada en dos casos, no estuvo en relación ni con el nº de bandas inicial ni con el final, que fue similar al de los no respondedores, y tampoco se observó una relación entre la normalización bioquímica al final del tratamiento y cambio en el nº de bandas final con respecto al inicial, pues en el caso que presentó respuesta completa con recidiva posterior, el nº de bandas del virus C disminuyó postratamiento mientras que

aumentaron en el virus G, y, de los 3 pacientes restantes en los que disminuyó el nº de bandas del virus C, sólo uno de ellos mostró respuesta bioquímica. Tampoco la evolución de la lesión histológica estuvo en relación con el patrón de bandas postratamiento: el nº de bandas del virus C disminuyó tanto en algunos casos en los que la lesión regresó como en otros en los que progresó, y aumentó en otros, mientras que la tendencia en el virus G fue al aumento o la ausencia de cambio en el nº de bandas.

Por lo tanto, el nº de bandas no experimentó modificaciones significativas tras el tratamiento, y los cambios que se produjeron ocurrieron de forma independiente en cada uno de los virus, pero sin un patrón definido que sugiera una relación con la respuesta, con la evolución clínica, etc. Estos resultados coinciden con los expuestos por Hassoba (162), que encontró una complejidad de cuasiespecies de la RHV del virus C similar tanto a nivel basal como postratamiento en los pacientes no respondedores a tratamiento, y con los obtenidos por Gerotto (163), lo que indica que la resistencia al IFN viene dada por la selección de una variante resistente que se hace mayoritaria, que no aparece “de novo” sino que ya estaba presente basalmente, y se selecciona durante el tratamiento por la ventaja selectiva que conlleva, haciéndose predominante.

Según estos resultados, el IFN no modifica significativamente la complejidad de cuasiespecies de los virus C y G en la región NS3, teniendo en cuenta que el nº de pacientes estudiado es demasiado bajo para extraer conclusiones definitivas y que se han analizado exclusivamente los pacientes no respondedores coinfectados también por el virus G postratamiento; es posible que estudios futuros comparativos de la complejidad basal de cuasiespecies entre respondedores y no respondedores al tratamiento que incluyan a un

mayor nº de pacientes, puedan aportar una información más completa con respecto al papel del IFN sobre la población de cuasiespecies de esta región genómica, y contribuyan a la búsqueda de un patrón de SSCP predictivo de respuesta al tratamiento.

Diversidad de las secuencias 5'UTR y NS3 de los virus C y G en coinfección

La divergencia de las secuencias de las regiones 5'UTR y NS3 obtenida en el virus G, tanto a nivel basal como tras tratamiento, coincide con la descrita por Viazov (164) y Pickering (165), y en nuestro estudio este porcentaje de divergencia ha sido superior al del virus C en ambas determinaciones, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Este dato contrasta con estudios que encuentran una menor heterogeneidad del virus G con respecto al virus C al comparar regiones como E2 y 5'UTR (135,136), e incluso con los resultados de Pickering, que obtiene una menor variabilidad de la región NS3 del virus G en comparación con la del virus C. La razón de esta discrepancia puede estar en la región genómica estudiada, ya que la región E2 en ambos virus está sometida a diferentes presiones selectivas inmunológicas que las regiones 5'UTR y NS3, y además, es conocido que el virus G carece de RHV, o bien la diferencia puede deberse a las distintas condiciones en las que se ha estudiado esta característica de la región NS3, puesto que Pickering la analiza en pacientes infectados exclusivamente por el virus G, de los que desconocemos otros aspectos (tiempo de evolución, tratamiento, etc) y los compara con secuencias consenso del virus C, y nosotros realizamos la comparación simultánea in vivo en pacientes coinfectados. No obstante, serían precisos otros estudios para confirmar estas hipótesis.

Por otra parte, en nuestro estudio no existió relación entre la diversidad de las cuasiespecies y la severidad de la lesión histológica, como Honda (166) había referido para el virus C.

Finalmente, la comparación de las secuencias basales y finales de estas 2 regiones en cada uno de los virus no mostró diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que el IFN no afecta a la diversidad de cuasiespecies en estas regiones genómicas de los virus C y G. Unos resultados diferentes obtiene Hassoba (162), que ha estudiado la relación existente entre la ausencia de respuesta al tratamiento con IFN o la respuesta con recaída, y los cambios en la diversidad de cuasiespecies de la RHV del virus C. En este estudio se demuestra que la diversidad aumenta significativamente con el tratamiento, y el porcentaje de nuevas variantes es significativamente superior en los pacientes no respondedores al tratamiento con respecto a los controles, siendo los cambios menos marcados en los pacientes respondedores al tratamiento con recaída posterior. Estos autores concluyen que estas mutaciones permiten al virus C escapar del efecto antiviral e inmunomodulador del IFN. Probablemente, como hemos mencionado anteriormente, los discordantes resultados obtenidos puedan explicarse por las diferentes presiones selectivas a que son sometidas las regiones 5'UTR y NS3, puesto que las características de los pacientes estudiados, es decir, no respondedores al tratamiento, son similares en los 2 estudios.

VI. CONCLUSIONES

1. La complejidad genética de las cuasiespecies de la región NS3 es similar en los virus C y G en pacientes coinfectados.
2. El IFN no modifica significativamente la complejidad de las cuasiespecies de la región NS3 de los virus C y G en coinfección.
3. La diversidad de las cuasiespecies de 5'UTR y NS3 en pacientes coinfectados es superior en el virus G con respecto al virus C.
4. El tratamiento con IFN no influye en la diversidad de las cuasiespecies de 5'UTR y NS3 en pacientes coinfectados por los virus C y G.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
2. Richards C, Holland P, Kuramoto K, Douville C, Randell R. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in a blood donor population. *Transfusion* 1991;31:109-113.
3. Esteban JL, López-Talavera JC, Genesca J, et al. High rate infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1991;115:443-449.
4. Schreiber GB, Busch M, Kleinman S, Korelitz J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996;334:1685-1690.
5. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson K. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Public Health* 1996;86:655-661.
6. Moyer LA, Alter MJ. Hepatitis C virus in the hemodialysis setting: a review with recommendations for control. *Sem Dial* 1994;7:124-127.
7. Pereira BJ, Milford E, Kirkman R, et al. Prevalence of hepatitis C virus RNA in organ donors positive for hepatitis C antibody and in the recipients of their organs. *N Engl J Med* 1992;327:910-915.
8. Di Biesceglie. Hepatitis C. *Lancet* 1998;351:351-355.
9. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N Engl J Med* 1994;330:744-750.
10. Fried MW, Shindo M, Fong TL, et al. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992;102:1306-1308.
11. Semprini AE, Persico T, Thiers V, et al. Absence of hepatitis C virus and detection of hepatitis G virus/GB virus C RNA sequences in the semen of infected men. *J Infect Dis* 1998;177:848-854.

12. Sharara A, Hunt C, Hamilton J. Hepatitis C. *Ann Intern Med* 1996;125:658-688.
13. Alter MJ. Inapparent transmission of hepatitis C: footprints in the sand. *Hepatology* 1991;14:389-391.
14. Choo QL, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.
15. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;14:381-3881.
16. Choo QL, Richman K, Han J, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-2455.
17. Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley P, et al., eds. *Fields Virology*, 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:931-959.
18. Francki R, Fauquet C, Knudson D, Brown F. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol* 1991;2(suppl):223.
19. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5547-5551.
20. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone S, Rice C. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993;67:1385-1395.
21. Manabe S, Fuke I, Kaji C, et al. Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by NS3. *Virology* 1994;198:636-644.

22. Mizushima H, Hijikata M, Tanji Y, Kimura K, Shimotohno K. Analysis of N-terminal processing of hepatitis C virus nonstructural protein. *J Virol* 1994;68:2731-2734.
23. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1994;68:3631-3641.
24. Nasoff M, Zebedee S, Inchauspe G, Prince A. Identification of an immunodominant epitope within the capsid protein of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5462-5466.
25. Weiner A, Geysen H, Christopherson C, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus putative envelope glycoprotein variants: potential role in HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3468-3472.
26. Major M, Feinstone S. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1527-1538.
27. Bukh J, Purcell R, Miller R. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4942-4946.
28. Tsukiyama-kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 1992;66:1476-1483.
29. Yamada N, Tanihara K, Takada A, et al. Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 1996;223:255-261.
30. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995;21:570-583.
31. Simmonds P, Holmes E, Cha T, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-2399.
32. Takada N, Takase S, Takada A, Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* 1993;17:277-283.

33. Martell M, Esteban JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225-3229.
34. Br  chot CH. Hepatitis C virus. Molecular biology and genetic variability. *Dig Dis Sci* 1996;41(Suppl):6-21.
35. Bukh J, Purcell R, Miller R. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8239-8243.
36. Stuyver L, Van Arnhem W, Wyseur A, Hernández F, Delaporte E, Maertens G. Classification of hepatitis C virus based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10134-10138.
37. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-1324.
38. Bukh J, Miller R, Purcell R. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15:41-63.
39. Koff R. Problem hepatitis viruses: the mutants. *Am J Med* 1994;96(Suppl):52-56.
40. Lai M, Mazzoleni A, Argiulo F, et al. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassemic children. *Lancet* 1994;343:388-390.
41. Shimizu YK, Yoshikura H, Hijikata M, Iwamoto A, Alter HJ, Purcell R. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 1994;68:1494-1500.
42. Weiner A, Geysen H, Christopherson C, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3468-3472.

43. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin of disease. *Hepatology* 1994;19:13-18.
44. Simmonds P, Mc Omish F, Rose K, Chan SW, Yap PL, Holmes E. Classification and detection of genotypes of HCV. International symposium of viral hepatitis an liver disease. 8th Triennial Congress. Tokio,1993.
45. Woodfield D, Harness M, Rix-Trott K, Tsuda F, Okamoto H, Mayumi M. Identification and genotyping of hepatitis C virus in injectable and oral drug users in New Zealand. *Aust N Z J Med* 1994;24:47-50.
46. Bradley DW. Virology, molecular biology and serology of hepatitis C virus. *Transfus Med Rev* 1992;2:93-102.
47. Takada N, Takase S, Enomoto N, Takada A, Date T. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J Hepatol* 1992;14:35-40.
48. Pozzato G, Moretti M, Franzin F, et al. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet* 1991;338:509.
49. Silini E, Botelli R, Asti M, et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a case-control study. *Gastroenterology* 1996;111:199-205.-
50. Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, et al. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994;19:1088-1094.
51. Hopf U, Berg T, König V, Küther S, Heuft HG, Lobeck H. Treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha: long-term follow-up and prognostic relevance of HCV genotypes. *J Hepatol* 1996;24(Suppl):67-73.
52. Aach R, Stevens C, Hollinger F, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. *N Engl J Med* 1991;325:1325-1329.

53. Tong M, El-Farra N, Reikes A, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1994;322:1463-1466.
54. Hoofnagle J. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26(Suppl):15-18.
55. Farci P, Harvey J, Alter MD, et al. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1996;335:631-634.
56. Shakil O, Conry-Cantilena C, Alter HJ, et al. Volunteer blood donors with antibodies to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virological and histological features. *Ann Intern Med* 1995;123:330-337.
57. Goodman Z, Ishak K. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis* 1995;15:70-81.
58. Navas S, Castillo I, Bartolomé J, Marriott E, Herrero M, Carreño V. Positive and negative hepatitis C virus RNA strands in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells in anti-HCV patients: relation with the liver lesion. *J Hepatol* 1994;21:182-186.
59. Alberti A, Morsica G, Chemello L, et al. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 1992;340:697-698.
60. Yano M, Kumada H, Kage M, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:1334-1339.
61. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997;349:825-832.
62. Seeff L. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(Suppl):19-24.
63. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990;12:671-675.

64. Di Bisceglie. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;26(Suppl):34-38.
65. Johnson R, Gretch D, Yamabe H, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C infection. *N Engl J Med* 1993;328:465-470.
66. Navas S, Bosch O, Castillo I, et al. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B viruses infection: a retrospective study. *Hepatology* 1995;21:279-284.
67. De Castro M, Sánchez J, Herrera JF, et al. Hepatitis C antibodies and liver disease in patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1993;17:551-557.
68. Hadziyannis S. Nonhepatic manifestations and combined diseases in HCV infection. *Dig Dis Sci* 1996;41(Suppl):63-74.
69. De Medina M, Schiff ER. Hepatitis C: diagnostic assays. *Semin Liver Dis* 1995;15:33-40.
70. Lee SR, Wood C, Lane MJ, et al. Increased detection of hepatitis C virus infection in commercial plasma donors by a third-generation screening assay. *Transfusion* 1995;35:845-849.
71. Quiroga JA, Campillo ML, Castillo I, et al. IgM antibody to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 1991;14:38-43.
72. Quiroga JA, Bosch O, González E, et al. Immunoglobulin M antibody to hepatitis C virus during interferon therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992;103:1285-1289.
73. Yuki N, Hayashi N, Hagiwara H, et al. IgG and IgM core antibodies and viral replication in hepatitis C virus carriers. *J Hepatol* 1994;21:110-114.
74. Alter HJ. To C or not to C: these are the questions. *Blood* 1995;85:1681-1695.

75. Gretch D, De la Rosa C, Carithers RL, Wilson R, Corey L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. *Ann Intern Med* 1995;123:321-329.
76. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Importance of primers selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:187-191.
77. Garson JA, Tedder RS, Briggs M. Detection of hepatitis C virus sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and predicted infectivity. *Lancet* 1990;335:1419-1422.
78. Gretch D. Diagnostic test for hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(Suppl):34-42.
79. Simmonds P, Rose KA, Graham S, et al. Mapping of serotypespecific, immunodominant epitopes in the NS4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1,2 and 3. *J Clin Microbiol* 1993;31:1493-1503.
80. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992;73:673-679.
81. Nakao T, Enomoto N, Takada A, et al. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J Gen Virol* 1991;72:2105-2112.
82. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993;74:1093-1102.
83. Lee JH, Stripf T, Roth W, Zeuzem S. Non-isotopic detection of hepatitis C virus quasispecies by single strand conformation polymorphism. *J Med Virol* 1997;53:245-251.

84. 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.
85. Blight K, Lesniewski RR, LaBrooy JT, Gowans EJ. Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology* 1994;20:553-557.
86. Nouri Aria KT, Sallie R, Sangar D, et al. Detection of genomic and intermediate replicative strands of hepatitis C virus in liver tissue by in situ hybridization. *J Clin Invest* 1993;91:2226-2234.
87. Haruna Y, Hayashi N, Hiramatsu N, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in liver tissues by an in situ hybridization technique. *J Hepatol* 1993;18:96-100.
88. Komminoth P, Long AA. In situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1993;64:67-73.
89. Komminoth P, Adams V, Long AA, et al. Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR. *Path Res Pract* 1994;190:1017-1025.
90. Nuovo GJ, Lidonnici K, MacConell P, et al. Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA. *Am J Surg Pathol* 1993;17:683-690.
91. Krawczynski K, Beach MJ, Bradley DW, et al. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 1992;103:622-629.
92. González-Peralta RP, Fang JWS. Optimization for the detection of hepatitis C antigens in the liver. *J Hepatol* 1994;20:143-147.

93. Takahashi M, Yamada G, Miyamoto R, et al. Natural course of chronic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:240-243.
94. Díaz M, Allen G. Nomenclature of the human interferon proteins. *J Interferon Res* 1994;14:223-226.
95. Pestka S, Langer T, Zoon K, Samuel C. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 1987;56:727-777.
96. Sen G, Ransohoff R. Interferon-induced antiviral action and their regulation. *Adv Virus Res* 1993;42:57-102.
97. Foster G, Finter N. Are all type I human interferons equivalent?. *J Viral Hep* 1998;5:143-152.
98. Shindo M, Di Bisceglie AM, Cheung L, et al. Decrease in serum hepatitis C viral RNA during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1991;115:700-704.
99. Romero R, Pol S, Berthelot P, Brechot C. Eradication of hepatitis C virus after interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med* 1994;121:276-277.
100. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997;336:347-356.
101. Lebovicks E, Lantin J, Chaurasia G, et al. The breakthrough phenomenon during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C: incidence, management and outcome. *Am J Gastroenterol* 1995;90:951-954.
102. Castillo I, Bartolomé J, Navas S, et al. Virological and biochemical long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with interferon. *Hepatology* 1994;19:1342-1346.

103. Lau JYN, Mizokami M, Ohno T, Diamond DA, Kniffen J, Davis GL. Discrepancy between biochemical and virological responses to interferon α in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993;342:1208-1209.
104. Saleh MG, Tibbs CJ, Koskinas J, et al. Hepatic and extrahepatic hepatitis C virus replication in relation to interferon therapy. *Hepatology* 1994;20:1399-1404.
105. Ideo G, Bellati G, Pedraglio E, et al. Recombinant alpha 2a interferon, lymphoblastoid interferon or no treatment for non-A, non-B chronic active hepatitis: a prospective randomized controlled trial. *Hepatology* 1989;10:637.
106. Kobayashi Y, Watanabe S, Konishi M, et al. Quantitation and typing of serum hepatitis C RNA in patients with chronic hepatitis C treated with interferon β . *Hepatology* 1993;18:1319-1325.
107. Sáez-Royuela F, Porres JC, Moreno A, et al. High doses of recombinant α -interferon or γ -interferon for chronic hepatitis C: a randomized, controlled trial. *Hepatology* 1991;13:327-331.
108. Poynard T, Leroy V, Cohard M, et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology* 1996;24:778-789.
109. Marcellin P, Pouteau M, Martinot-Peignoux M, et al. Lack of benefit of escalating dosage of interferon alfa in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995;109:156-165.
110. Karino Y, Toyota J, Sugawara M, et al. Early loss of serum hepatitis C virus RNA can predict a sustained response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1997;92:61-65.

111. Davis GL. Prediction of response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994;21:1-3.
112. Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, et al. Factors predictive of response to interferon- α therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994;19:1088-1094.
113. Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, et al. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus: influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1998;56:256-264.
114. Enomoto N, Sato C, Kurosaki M, Marumo F. Hepatitis C virus after interferon treatment has the variation in the hypervariable region of envelope 2 gene. *J Hepatol* 1994;20:252-261.
115. Enomoto E, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77-81.
116. Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, et al. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity determining region predict outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997;25:745-749.
117. Kurosaki M, Enomoto N, Murakami T, et al. Analysis of genotypes and amino acid residues 2209-2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon beta therapy. *Hepatology* 1997;25:750-753.
118. Zeuzem S, Lee J, Roth WK. Mutations in the nonstructural 5A gene of european hepatitis C virus isolates and response to interferon- α . *Hepatology* 1997;25:740-744.

119. Herion D, Hoofnagle JH. The interferon sensitivity determining region: all hepatitis C virus isolates are not the same. *Hepatology* 1997;25:769-771.
120. Simons JN, Leary T, Dawson G, et al. Isolation of novel virus like sequences associated with human hepatitis. *Nature Med* 1996;1:564-569.
121. Linnen J, Wages J, Zhong-keck Z, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271:505-508.
122. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver diseases. *N Engl J Med* 1997;336:747-754.
123. Alter HJ. The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. *N Engl J Med* 1996;334:1536-1537.
124. Thomas H, Pickering J, Karayiannis P. Identification, prevalence and aspects of molecular biology of hepatitis G virus. *J Viral Hep* 1997;4(Suppl. 1):51-54.
125. Stark K, Bienzle U, Hess G, Engel AM, Hagenscheid B, Schluter V. Detection of hepatitis G virus genome among injecting drug users, homosexual and bisexual men, and blood donors. *J Infect Dis* 1996;174:1320-1323.
126. López-Alcorocho JM, Millán A, García-Trevijano E, et al. 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.
127. Jarvis LM, Davidson F, Hnaley J, Yap P, Ludlman C, Simmonds P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet* 1996;348:1352-1355.
128. Neilson J, Harrison P, Milligan DW, Skidmore S, Collingham K. Hepatitis G virus in long-term survivors of haematological malignancy. *Lancet* 1996;347:1632-1633.

129. Aikawa T, Sugai Y, Okamoto H. Hepatitis G infection in drug abusers with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1996;334:195-196.
130. Tacke M, Kiyosawa K, Stark K, et al. Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* 1997;349:318-320.
131. Heringlake S, Ockenga J, Tillman H, et al. GB virus C/Hepatitis G virus infection: a favorable prognosis factor in human immunodeficiency virus-infected patients?. *J Infect Dis* 1998;177:1723-1726.
132. Sánchez-Tapias JM. Hepatitis G. *Med Clin* 1997;109:311-316.
133. Leary T, Muerhoff A, Simons J, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol* 1996;48:60-67.
134. Ercker J, Simons J, Muerhoff A, et al. Molecular cloning and characterization of a GB virus C isolate from a patient with non-A-E hepatitis. *J Gen Virol* 1996;77:2713-2720.
135. Muerhoff A, Simons J, Leary T, et al. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol* 1996;25:379-384.
136. Kato T, Mizokami M, Nakano T, et al. Heterogeneity in E2 region of GBV-C/hepatitis G virus and hepatitis C virus. *J Med Virol* 1998;55:109-117.
137. Alter MJ, Gallagher M, Morris T, et al. 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.
138. Tameda Y, Kosaka Y, Tagawa S, et al. Infection with GB virus C (GBV-C) in patients with fulminant hepatitis. *J Hepatol* 1996;25:842-847.
139. Mishiro S, Yoshida M, Okamoto H. GBV-C in the aetiology of fulminant hepatitis. *Lancet* 1996;347:120-121.

140. Tanaka E, Kiyosawa K, Shimoda K, et al. Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J Viral Hep* 1998;5:153-159.
141. Shleicher S, Chaves RL, Dehmer T, Gregor M, Hess G, Flemming B. Identification of GBV-C hepatitis G RNA in chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 1996;50:71-74.
142. Manolakopoulos S, Morris A, Davies S, Brown D, Hajat S, 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.
143. Enomoto M, Nishiguchi S, Fukuda K, et al. 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.
144. Sáiz JC, Ampurdanés S, Olmedo E, et al. Hepatitis G virus infection in chronic hepatitis C: frequency, features and response to interferon therapy. *J Hepatol* 1997;26:787-793.
145. Oshita M, Hayashi N, Mita E, et al. GBV-C/HGV infection in chronic hepatitis C patients: its effect on clinical features and interferon therapy. *J Med Virol* 1998;55:98-102.
146. Orito E, Mizokami M, Yasuda K, et al. Interferon- α 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.
147. Inouet 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;92:1981-1985.
148. Tanaka E, Alter HJ, Nakatsuji Y, et al. Effects of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1996;125:740-743.

149. Schlueter V, Schmolke S, Stark K, Hess G, Ofenloch-Haehnle B, Engel AM. Reverse transcription-PCR detection of hepatitis G virus. *J Clin Microbiol* 1996;34:2660-2664.
150. Leary TP, Muerhoff A, Simons J, et al. Consensus oligonucleotide primers for the detection of GB virus C in human cryptogenic hepatitis. *J Virol Methods* 1996;56:119-121.
151. Tillmann H, Heringlake S, Trautwein C, et al. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology* 1998;28:379-384.
152. Madejón A, Fogeda M, Bartolomé J, et al. 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.
153. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-238.
154. Le Guen B, Squadrito G, Nalpas B, Berthelot P, Pol S, Brechot C. Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in french patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1250-1254.
155. Moribe T, Hayashi N, Kanazawa Y, et al. Hepatitis C viral complexity detected by single-strand conformation polymorphism and response to interferon therapy. *Gastroenterology* 1995;108:789-795.
156. McHutchison J, Nainan O, Alter M, et al. Hepatitis C and G co-infection: response to interferon therapy and quantitative changes in serum HGV-RNA. *Hepatology* 1997;26:1322-1327.
157. Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Muerhoff AS. GB virus C infection in patients with chronic hepatitis C. Influence on liver disease and on hepatitis virus behaviour: effect of interferon alfa therapy. *J Med Virol* 1998;54:26-37.

158. Lamonaca V, Missale G, Urbani S, et al. Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4+ T cells: implications for vaccine development. *Hepatology* 1999;30:1088-1098.
159. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996;98:706-714.
160. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffman RM, et al. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006-1007.
161. Tsai SL, Liaw Y, Chen MH, Huang C, Kuo G. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997;25:449-458.
162. Hassoba H, Bzowej N, Berenguer M, et al. Evolution of viral quasispecies in interferon-treated patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31:618-627.
163. Gerotto M, Sullivan DG, Polyak SJ, et al. Effect of retreatment with interferon alone or interferon plus ribavirin on hepatitis C virus quasispecies diversification in nonresponder patients with chronic hepatitis C. *J Virol* 1999;73:7241-7247.
164. Viazov S, Fiffelmann M, Khoudyakov Y, Fields H, Varenholz C, Roggendorf M. Genetic heterogeneity of hepatitis G virus isolates from different parts of the world. *J Gen Virol* 1997;78:577-581.
165. Pickering JM, Thomas HC, Karayiannis P. Genetic diversity between hepatitis G virus isolates: analysis of nucleotide variation in the NS-3 and putative core peptide genes. *J Gen Virol* 1997;78:53-60.

166. Honda M, Kaneko S, Sakai A, Unoura M, Kurakami S, Kobayashi K. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 1994;20:1144-1151.

