

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**PRESENCIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN PIEL
SANA Y SUDOR DE PACIENTES CON HEPATOPATÍA
POR VIRUS C**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

María Isabel Longo Imedio

Bajo la dirección del Doctor:

Pablo Lázaro Ochaíta

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2607-0



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



Presencia del virus de la hepatitis C en piel sana y sudor
de pacientes con hepatopatía por virus C

María Isabel Longo Imedio

Tesis Doctoral
2003

A mis padres, a Javier y a
Paco

Agradecimientos

A los doctores Pablo Lázaro y Vicente Carreño sin cuyo entusiasmo y dedicación este proyecto no se hubiera llevado a cabo.

Al equipo de investigación de la Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, en especial a los doctores Nuria Ortiz-Movilla, Elena Rodríguez-Iñigo y Javier Bartolomé por su extraordinario apoyo.

Al Dr. Mancheño y demás miembros del Servicio de Bioquímica y a las doctoras Paloma Sánchez-Mateos y Natividad Longo del Servicio de Inmunología, del Hospital Gregorio Marañón por su inestimable ayuda en la obtención y almacenamiento de las muestras.

A los residentes y médicos de la plantilla del Servicio de Dermatología del Hospital Gregorio Marañón, en especial a los doctores Patricia García, Marta Valdivielso, Diego Martínez, Cristina Mauleón, Eva Chavarría, Celso Bueno, José Manuel Hernanz y Miguel Sánchez-Viera que tan generosamente colaboraron con mi actividad asistencial durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Javier Olalquiaga por su estrecha colaboración en este trabajo.

Al Dr. Sánchez Yus por su valiosa ayuda y celeridad en los trámites administrativos.

Al Dr. Francisco Javier Montáns por tantas horas de esfuerzo dedicadas a la presentación de este trabajo.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
3. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL	6
3.1. Biología del virus de la hepatitis C	7
3.1.1. Estructura	7
3.1.2. Replicación	8
3.1.3. Tropismo	8
3.1.4. Patogenia	9
3.2. Epidemiología del virus de la hepatitis C	10
3.2.1. Patrones de distribución geográfica	10
3.2.2. Patrones de transmisión	11
3.2.2.1. Transmisión parenteral	11
3.2.2.2. Transmisión no parenteral	12
3.3. Hepatopatía crónica por virus C	12
3.3.1. Historia natural de la infección	12
3.3.2. Alteraciones inmunológicas	13
3.3.3. Manifestaciones extrahepáticas	14
3.4. Detección del virus de la hepatitis C en piel	16
3.4.1. Técnicas	16
3.4.1.1. Hibridación <i>in situ</i>	16

3.4.1.2. Inmunohistoquímica	18
3.4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa	19
3.4.2. Detección del VHC en patologías seleccionadas	20
3.4.2.1. Vasculitis por crioglobulinemia mixta	20
3.4.2.2. Liquen plano	22
4. MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1. Pacientes	25
4.1.1. Selección	25
4.1.2. Obtención de muestras	25
4.2. Técnicas	26
4.2.1. Cuantificación del RNA viral en suero y determinación de genotipos	26
4.2.2. Hibridación <i>in situ</i>	26
4.2.3. Inmunohistoquímica	27
4.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa en el sudor	27
4.3. Análisis estadístico	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Cuantificación del RNA viral en suero y determinación de genotipos	30
5.2. Hibridación <i>in situ</i>	30
5.2.1. Detección del RNA-VHC en la epidermis	30
5.2.2. Detección del RNA-VHC en la dermis	32
5.3. Inmunohistoquímica	36
5.3.1. Detección de la proteína del core del VHC en la epidermis	36

5.3.2. Detección de la proteína del core del VHC en la dermis	37
5.4. Correlación entre la infección de células epiteliales y la concentración del RNA-VHC en el suero	38
5.5. Reacción en cadena de la polimerasa en el sudor	39
5.6. Cuantificación del RNA-VHC en el sudor y correlación con el RNA-VHC en el suero	40
6. DISCUSIÓN	41
6.1. Diferencias en la metodología empleada para la detección del VHC en piel	42
6.2. Detección del virus de la hepatitis C en epidermis	43
6.2.1. Generalidades	43
6.2.2. Patogenia del VHC en enfermedades con afectación cutánea	45
6.2.2.1. Liquen plano	45
6.2.2.2. Porfiria cutánea tarda	47
6.2.2.3. Psoriasis	48
6.2.2.4. Prurigo	49
6.2.2.5. Urticaria	49
6.2.2.6. Vasculitis	50
6.2.2.6.1. Vasculitis por crioglobulinemia	50
6.2.2.6.2. Periarteritis nodosa sistémica	51
6.3. Detección del virus de la hepatitis C en glándulas secretoras y sudor	53
6.3.1. Generalidades	53
6.3.1.1. Glándulas sebáceas	53
6.3.1.2. Glándulas sudoríparas	54
6.3.1.3. Sudor	55
6.3.2. Vías de transmisión parenteral inaparentes	56

7. CONCLUSIONES	58
8. BIBLIOGRAFÍA	60
9. ANEXOS	84

1. INTRODUCCIÓN

La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) se caracteriza por el desarrollo de diversas manifestaciones extrahepáticas cuyo mecanismo de producción no está completamente aclarado. En individuos inmunocompetentes el virus de la hepatitis C no sólo se replica en los hepatocitos sino también por otros tipos celulares como las células del sistema inmune (linfocitos, macrófagos, neutrófilos). También se ha demostrado la presencia del VHC en el endotelio y epitelio (glándulas salivales, glándulas sudoríparas y queratinocitos) en pacientes con manifestaciones extrahepáticas asociadas a la infección crónica. Algunos autores han postulado que la afectación de las células del sistema inmune podría ser la responsable de múltiples manifestaciones extrahepáticas donde se ha demostrado la presencia de inmunocomplejos como es el caso de la crioglobulinemia mixta.

Es difícil determinar la relevancia que tiene la infección directa de determinados tipos celulares como el endotelio vascular y el epitelio glandular y epidérmico en la producción de manifestaciones asociadas a la infección crónica por el VHC como son la crioglobulinemia mixta (CM), el liquen plano y el síndrome de Sjogren. Esto es debido a que no existen estudios donde se investigue de forma sistemática la presencia del VHC en muestras de tejido aparentemente sano.

La patología cutánea ocupa un capítulo importante dentro del amplio espectro de las manifestaciones extrahepáticas. La vasculitis por crioglobulinemia mixta, la porfiria cutánea tarda y el liquen plano son tres entidades donde se ha observado una asociación estadísticamente significativa con la infección crónica por el VHC en la mayor parte de los estudios aunque de forma menos consistente en el caso del liquen plano.

Otras entidades que se han relacionado con la infección crónica por el VHC son la psoriasis, el prurigo, la urticaria crónica y algunas formas de vasculitis leucocitoclástica (periarteritis nodosa). Se han publicado escasos estudios donde se investigue la presencia del VHC en el tejido cutáneo. Estos trabajos se han realizado casi exclusivamente en

muestras de piel afecta por liquen plano o vasculitis por crioglobulinemia existiendo estudios aislados en casos de psoriasis y prurigo.

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo recientemente un estudio sobre la detección del VHC en lesiones cutáneas de liquen plano donde se investigó parcialmente la presencia del VHC en piel sana.

Los trabajos realizados hasta ahora sobre la localización específica del VHC se han centrado en el estudio de la epidermis (liquen plano) y en las estructuras vasculares (vasculitis por crioglobulinemia). No se ha realizado hasta el momento ningún estudio sistematizado sobre la presencia del VHC en muestras de piel sana en pacientes con infección crónica por el VHC sin antecedentes de enfermedades cutáneas. Dicho trabajo sería interesante por dos motivos. En primer lugar para definir el tropismo celular del VHC en el tejido cutáneo y así ayudar a la comprensión de los mecanismos de producción de las diversas manifestaciones cutáneas en pacientes con infección crónica por el VHC. En segundo lugar para valorar la relevancia de la piel como reservorio y posible fuente de transmisión de la infección por vía percutánea inaparente. Esta vía de transmisión se estima que es la responsable en un elevado número de casos donde no se identifican vías de contagio aparentes.

2.OBJETIVOS

1. Investigar la presencia del virus de la hepatitis C en piel sana de pacientes con hepatitis crónica por virus C sin enfermedades cutáneas asociadas. En caso de estar presente:

A) Identificar de forma sistematizada las estructuras afectadas.

B) Evaluar la capacidad de replicación del virus en las células afectas.

C) Observar si las células afectas presentan signos de alteración patológica mediante estudio con microscopía convencional.

D) Evaluar la correlación entre la presencia del virus en el tejido cutáneo y los niveles de RNA-VHC en el suero.

2. Investigar la presencia del virus de la hepatitis C en los productos de la secreción glandular sebácea y sudorípara en pacientes con hepatitis crónica por virus C. En caso de estar presente:

A) Cuantificar la presencia del virus en los productos de secreción.

B) Identificar las características de las partículas virales presentes.

C) Evaluar la correlación entre los niveles de RNA-VHC en secreciones y en suero.

3. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

3.1. Biología del virus de la hepatitis C

3.1.1. Estructura

El virus de la hepatitis C fue identificado en 1989 por Choo y colaboradores.¹ Se trata de un virus RNA monocatenario de polaridad positiva. Presenta un diámetro inferior a 80nm y por su envoltura es sensible a disolventes orgánicos y a la desecación.² Pertenece a la familia Flaviviridae.³ El genoma del virus tiene una longitud de aproximadamente 9.6kb.¹ En el genoma existe una única región de lectura abierta ORF (open reading frame) que comprende casi todo el genoma y que codifica una proteína de aproximadamente 3000 amino ácidos. Esta poliproteína es procesada a diez proteínas maduras, tres estructurales y siete no estructurales. Las proteínas estructurales incluyen la proteína del core y las proteínas de la envoltura (E1 y E2). Las proteínas no estructurales (NS) incluyen proteasas (NS2, NS3, NS4A), helicasa (NS3), RNA polimerasa-RNA dependiente (NS5B) y otras dos proteínas cuyas funciones aun no han sido completamente caracterizadas (NS5A, p7). En los extremos 5' y 3' existe una región no codificante (UTR) que se considera juega un papel importante en la regulación de la replicación.⁴ En la figura 1 se muestra la estructura del genoma. Las distintas variantes del virus se clasifican en genotipos basándose en similitudes de la secuencia global del genoma.⁵ Se han descrito 6 genotipos y varios

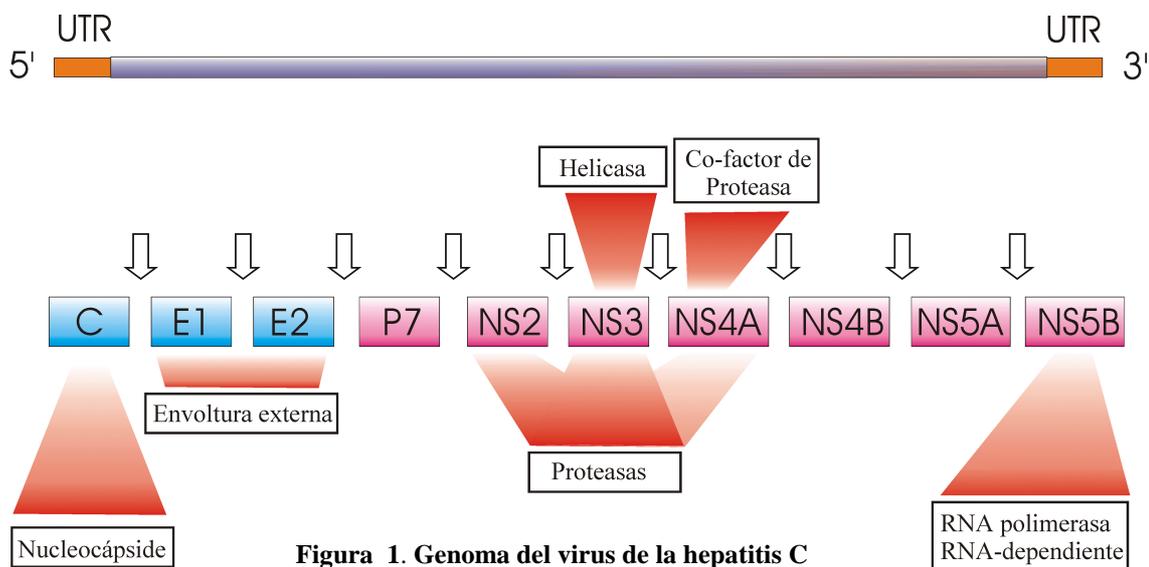


Figura 1. Genoma del virus de la hepatitis C

subtipos (a, b, c) que se diferencian en cuanto a la diversidad, distribución geográfica y vías de transmisión.^{6,7}

3.1.2. Replicación

EL VHC se replica a través de un RNA de polaridad negativa o antígenómica (complementario al RNA de polaridad positiva o genómica). El virus posee una enorme capacidad de replicación. Se estima que se producen aproximadamente un billón de partículas víricas al día, incluso durante la fase crónica de la infección, aunque la tasa de aclaramiento es similar (10^{12} partículas al día).⁸ También posee una gran capacidad de mutación. Esto se debe a que al tratarse de un virus RNA las enzimas encargadas de la replicación (RNA polimerasas-RNA dependientes) carecen de la actividad “correctora de pruebas” que tienen las DNA polimerasas-DNA dependientes.⁹ Esta capacidad de mutación da lugar a la rápida evolución de diversas cuasiespecies relacionadas entre sí en un mismo individuo infectado.

3.1.3. Tropismo

El tropismo del virus no sólo incluye a los hepatocitos sino a otros tipos celulares como las células mononucleares de sangre periférica (monocitos/macrófagos, linfocitos B) y las células polimorfonucleares.^{10,11} En pacientes inmunodeprimidos el virus es capaz de replicarse en otros tejidos como el páncreas, el tiroides, las glándulas suprarrenales, el bazo, la médula ósea y los ganglios linfáticos.^{13,14}

Se han observado diferencias en la distribución de las distintas cuasiespecies detectadas en suero, hígado y células mononucleares de sangre periférica. Estos hallazgos sugieren que existirían determinados factores tisulares que condicionarían el crecimiento de las distintas cuasiespecies.

Aunque no se han identificado los receptores del virus en la superficie celular, se considera que la proteína E2 es la responsable de iniciar la adhesión a la célula huésped ya que al emplear suero anti-E2 se impide dicha unión.^{15,16} Las dos moléculas que se han identificado como posibles receptores son la tetraespanina CD81 y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La molécula CD81 es una tetraespanina que se expresa en la superficie celular de los hepatocitos, linfocitos B y células epiteliales y se especula que funciona como receptor o co-receptor del VHC.^{17, 18} También se ha descrito el receptor de lipoproteínas de baja densidad como vía de entrada mediante endocitosis para el VHC y

otros virus de la familia Flaviviridae. Se ha observado que las partículas del VHC se asocian con beta-lipoproteínas.¹⁹ Utilizando la técnica de hibridación *in situ* para identificar los hepatocitos infectados se demostró una correlación positiva entre el grado de expresión de receptores LDL y el número de células infectadas.²⁰

3.1.4. Patogenia

Los mecanismos responsables del daño hepático no están completamente aclarados.

La lesión hepática no se debe exclusivamente al efecto citopático del virus ya que cambios mínimos en el tejido hepático se pueden asociar con títulos altos del VHC en hígado y suero.²¹ Por otro lado se ha demostrado que una adecuada respuesta inmune es capaz de controlar la infección. La desaparición de la viremia se asocia con el desarrollo de respuestas específicas por parte de los linfocitos T citotóxicos y T cooperadores.²²⁻²⁴ El papel de estos últimos es fundamental ya que la pérdida de los linfocitos T cooperadores se asocia con la reaparición de la viremia²⁵ y los grados más severos de afectación hepática se encuentran en pacientes inmunodeprimidos, sobre todo aquellos con co-infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).²⁶ En los pacientes que presentan una respuesta inmune deficiente es más frecuente el hallazgo de sobreinfección por otros genotipos.²⁷ Se considera que la lesión hepática se produce por una compleja articulación de diversos mecanismos como daño directo inducido por el virus, citotoxicidad mediada por células, efectos mediados por citoquinas, apoptosis y otros eventos que quedan por dilucidar.²¹

3.2. Epidemiología del virus de la hepatitis C

3.2.1. Patrones de distribución geográfica

La prevalencia de la infección por el VHC en poblaciones no seleccionadas de países desarrollados varía entre 1.4-3.6%.²⁸⁻³⁰ En países en vías de desarrollo la prevalencia es superior al 10%, oscilando en algunas zonas como Egipto entre el 18-34%.³¹⁻³³

La estimación de la prevalencia basada en el estudio de donantes de sangre infraestima la prevalencia real en la población general. Los donantes constituyen una población seleccionada ya que los sujetos con factores de riesgo para infecciones transmitidas vía parenteral se autoexcluyen voluntariamente o son excluidos por el personal sanitario en el momento de la donación. La prevalencia de la infección por el VHC en los donantes de sangre de Estados Unidos en 1990 era del 0.6%, tres veces inferior a la de la población general.³⁴

Los estudios sobre prevalencia por grupos de edad específicos demuestran que existen al menos tres patrones de transmisión de la infección que se pueden identificar a nivel mundial.³⁵ En el primer patrón la prevalencia es baja en menores de 20 años, aumenta en la edad adulta (con un pico de prevalencia entre los 30-49 años) y disminuye bruscamente en personas mayores de 50 años. Este patrón es típico de Estados Unidos y Australia y sugiere que la mayor parte de las infecciones fueron adquiridas en el pasado reciente (hace 10-30 años) por adultos jóvenes.^{34, 36}

En el segundo patrón la prevalencia es baja en niños y adultos jóvenes, siendo más alta en mayores de 50 años. Este patrón se suele observar en países como Japón e Italia donde se presume que el mayor riesgo de infección ocurrió en los últimos 30-50 años.³⁷⁻⁴⁰

En el tercer patrón la prevalencia aumenta progresivamente con la edad, encontrándose elevados porcentajes de infección en todos los grupos de edad. Este patrón es típico de países como Egipto e indica que el riesgo para contraer la infección se ha mantenido desde los últimos 30-50 años.⁴¹

3.2.2. Patrones de transmisión

3.2.2.1. Transmisión parenteral

La infección se transmite fundamentalmente por vía parenteral. De hecho, el VHC es el agente causal de la mayoría de los casos de hepatitis postransfusional no-A, no-B.^{30, 42} Desde la implementación del cribaje de productos sanguíneos este riesgo es prácticamente nulo (1/103,000 unidades transfundidas).⁴³ Actualmente los factores de riesgo más significativos para la transmisión son la adicción a drogas vía parenteral (ADVP) y la práctica de tatuajes.

La ADVP es una de las formas más eficientes de transmisión de la infección.⁴⁴⁻⁴⁷ En países como Estados Unidos y Australia el 60% y el 80%, respectivamente, de las infecciones se relacionan con la ADVP.^{34, 36}

Un reciente estudio sobre una población no seleccionada en Estados Unidos demostró que tan sólo el 17% de las infecciones por el VHC se asociaban a ADVP, correspondiendo el mayor porcentaje (41%) a la práctica de tatuajes. Esta notable variación se relaciona con los cambios que se han producido en el estilo de vida en las últimas dos décadas.

Otras vías de transmisión parenteral más infrecuentes son la nosocomial y la ocupacional.

La transmisión nosocomial ocurre sobre todo en unidades de hemodializados.^{48, 49}

La utilización de material no desechable (agujas intramusculares, acupuntura) ha sido la causa de transmisión de la infección hace más de tres décadas en Europa y Japón^{40, 50, 51} y continua siendo una vía de contagio muy prevalente en Egipto.^{33,52} Excepcionalmente se han descrito casos por realización de pruebas diagnósticas (colonoscopia)⁵³ o durante intervenciones quirúrgicas^{54, 55} y por trasplante de órganos.^{56, 57}

Los accidentes con material contaminado no influyen significativamente en la adquisición de la infección. La prevalencia de la infección por el VHC no es mayor en trabajadores sanitarios que en la población general, incluso en aquellos con alto riesgo de exposición percutánea como los dentistas, cirujanos maxilofaciales, cirujanos generales y traumatólogos.⁵⁸⁻⁶⁰

Se estima que el riesgo medio de contraer la infección por el VHC tras un accidente percutáneo es del 1.8% (0-7%)⁶¹⁻⁶⁴, lo cual es un porcentaje intermedio entre el riesgo de contraer el VIH (0.3%) y el virus de la hepatitis B (30%). Los factores de riesgo para la

transmisión ocupacional no están bien definidos aunque parecen estar relacionados fundamentalmente con lesiones punzantes por agujas huecas de grueso calibre.^{62, 64}

También se han descrito casos excepcionales de adquisición de la infección por salpicaduras de sangre en la mucosa conjuntival.^{65, 66}

3.2.2.2. Transmisión no parenteral

La transmisión no parenteral comprende principalmente vías de contagio de bajo riesgo como la transmisión perinatal y la transmisión sexual.

El riesgo de transmisión perinatal es escaso. La proporción ponderada de transmisión vertical basada en una revisión de 77 estudios de cohorte con al menos 10 mujeres con serología positiva para el VHC está en el rango del 1-5%.⁶⁷ No se ha demostrado que exista riesgo aumentado de transmisión perinatal relacionado con el parto vía vaginal^{68, 69} ni con la lactancia materna.⁷⁰⁻⁷²

La frecuencia de transmisión sexual es baja, alrededor del 5%, comparado con la transmisión del VIH (15%) y de la hepatitis B (30%). Algunos factores como la co-infección por el VIH y una hepatopatía severa se han asociado con un mayor riesgo de transmisión sexual de la infección.^{73, 74}

3.3. Hepatopatía crónica por virus C

3.3.1. Historia natural de la infección

La mayoría de los pacientes diagnosticados de hepatitis aguda por virus C evolucionan hacia la cronicidad. Se considera que un paciente padece hepatitis crónica cuando persisten niveles anormales de transaminasas durante al menos 6 meses. Se cree que la cronicidad de la infección se debe al escape inmunológico del virus dada su alta tasa de mutación. También podría contribuir la disregulación ocasionada por la replicación del virus en las células del sistema inmune.⁷⁵

Los factores que se asocian con una hepatopatía más severa o rápidamente progresiva son edad avanzada, etilismo crónico e inmunodeficiencia.

Las complicaciones más importantes de la hepatitis crónica son el desarrollo de cirrosis y de carcinoma hepático. En general la cirrosis tarda varios años en aparecer, registrándose

en un 20-30% de los pacientes tras un período de seguimiento de 10-20 años. El desarrollo de cirrosis se caracteriza por la aparición de astenia, debilidad muscular, edema, ictericia y prurito aunque algunos pacientes pueden permanecer asintomáticos hasta que surgen complicaciones graves como ascitis o hemorragia por varices esofágicas.

El riesgo de carcinoma hepatocelular es de aproximadamente 1-4% por año en pacientes con cirrosis establecida, siendo excepcional su desarrollo en ausencia de cirrosis.^{76, 77}

3.3.2. Alteraciones inmunológicas

En pacientes con hepatopatía crónica por virus C es frecuente el hallazgo de trastornos inmunológicos en pruebas de laboratorio. Se detectan crioglobulinas hasta en el 50%^{78, 79}, factor reumatoide en el 40-70%^{79, 80} y auto-anticuerpos al menos a un antígeno en el 40-65% de los pacientes.^{80, 81}

Los auto-anticuerpos más frecuentes son los anti-nucleares, anti-cardiolipina y los anti-músculo liso. Estos últimos se encuentran con una frecuencia en torno al 20-40% si el límite de detección se establece en una dilución 1/40-1/80, siendo alrededor del 10% si el límite es superior a 1/160.⁸¹ Otros como los anticuerpos microsomales anti-hígado y anti-riñón y los anticuerpos anti-troideos (anti-tiroglobulina y microsomal anti-tiroideo) se detectan en menos del 10% de los pacientes.

La extensa producción de anticuerpos se debe a una respuesta inespecífica de los linfocitos B frente a la estimulación provocada por el VHC. Uno de los receptores de membrana para el VHC, la proteína CD81, está implicada en la activación de las células B. Por otro lado, como ha sido mencionado previamente, el VHC es capaz de replicarse en las células mononucleares de sangre periférica. Algunos autores señalan la importancia del linfotropismo del VHC en el desarrollo de las diversas manifestaciones extrahepáticas asociadas a la infección crónica. Conviene señalar que estos trastornos inmunológicos producen manifestaciones clínicas únicamente en una pequeña proporción de enfermos.

3.3.3. Manifestaciones extrahepáticas de la infección por el VHC

La manifestación extrahepática más frecuente es la crioglobulinemia mixta aunque es sintomática en menos del 15% de los casos.⁷⁸ La crioglobulinemia mixta es una vasculitis mediada por inmunocomplejos que afecta preferentemente a vasos de pequeño calibre.⁸² Los síntomas y signos más frecuentes son los derivados de la afectación cutánea como es la púrpura que aparece en la mitad de los casos.^{83, 84} Las lesiones de púrpura corresponden en su mayoría a una vasculitis leucocitoclástica siendo infrecuente la presencia de vasculitis linfocítica.^{87, 88}

Las formas más severas se asocian a glomerulonefritis membranoproliferativa y afectación del sistema nervioso.

El 55-98% de los pacientes con crioglobulinemia mixta presentan infección por el VHC.^{78, 85, 86} Sin embargo la gran mayoría de los pacientes con infección por el VHC (más del 80%) no presentan crioglobulinemia asociada.^{84, 87} En los pacientes con CM asociada a la infección por el VHC se ha descrito una mayor incidencia de linfomas no Hodgkin⁸⁹⁻⁹¹ (inmunocitoma, mieloma múltiple), síndrome de Sjögren⁹²⁻⁹⁵ y fibrosis pulmonar idiopática.⁹⁶⁻⁹⁸

Otras formas de vasculitis leucocitoclástica asociadas a la infección por el VHC son la periarteritis nodosa (cutánea y sistémica) y de forma anecdótica la urticaria vasculitis⁹⁹ y la vasculitis nodular.⁹³ La prevalencia de serología positiva para el VHC en la periarteritis nodosa (PAN) sistémica oscila entre el 5-12%.¹⁰⁰⁻¹⁰³ En el caso de la periarteritis nodosa cutánea únicamente se ha publicado un estudio retrospectivo que encontró una prevalencia del 31.2%.¹⁰⁴

Otras manifestaciones de probable etiología autoinmune son la tiroiditis^{105, 106} y trombopenia inmunes¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, y la úlcera corneal de Mooren.¹¹⁰

En cuanto a las manifestaciones cutáneas se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa en el caso del liquen plano, porfiria cutánea tarda, psoriasis, prurigo y urticaria crónica, entre otras. Dicha asociación se establece en base a los resultados de la prevalencia de la infección. Ésta última se realiza mediante serología, siendo muy variable la técnica utilizada. En algunos trabajos se emplean técnicas de confirmación como Western blot y RIBA (radio immunoblotting assay) pero, al no realizarse de forma

rutinaria, impide comparar los resultados de diferentes estudios.

Algunas de las enfermedades anteriormente mencionadas como el liquen plano y la psoriasis se exarcebaban tras el tratamiento con interferón alfa al igual que otras entidades de etiología inmune como la tiroiditis autoinmune. En este sentido es necesario valorar el papel tanto de la infección por el VHC como de su tratamiento en la etiopatogenia de estos trastornos.

Por otro lado se ha descrito una asociación positiva en la práctica totalidad de los casos estudiados de otras enfermedades muy infrecuentes como es el eritema necrolítico acral del cual se han publicado menos de 10 casos. Otra entidad poco frecuente donde se ha descrito una elevada prevalencia de la infección por el VHC es el prurigo. Este debe diferenciarse del prurito sin afectación cutánea, el cual es un síntoma frecuente en pacientes con enfermedad hepática asociada a colestasis.¹¹¹ La prevalencia de prurito en pacientes con infección por el VHC varía entre el 2.5-20%.¹¹²⁻¹¹⁴

La aparición de prurito es más frecuente durante el curso de la enfermedad, especialmente en fases avanzadas cuando se producen los fenómenos de colestasis secundarios a la fibrosis.¹¹¹ Esto explicaría la escasa rentabilidad de pruebas diagnósticas para la infección por el VHC en pacientes no seleccionados con prurito generalizado.¹¹⁵

Se cree que el prurito estaría producido por sustancias derivadas de la membrana plasmática de los hepatocitos, no por sales biliares, y estas sustancias podrían ser agonistas opiodes.^{116, 117} Además, en estos pacientes suelen coexistir otros factores como xerosis y efectos adversos por medicación concomitante (interferón alfa) que podrían justificar la aparición de prurito de forma aislada.

Otras entidades descritas cuya asociación con la infección por el VHC es probablemente fortuita son eritema exudativo multiforme^{118, 119}, paniculitis¹¹⁹⁻¹²¹, malacoplasia¹²², hemangiodermatitis (proliferación benigna de células endoteliales)¹²³, pioderma gangrenoso¹²⁴, poroqueratosis¹²⁵, linfoma cutáneo primario de células B^{126, 127}, vitíligo¹²⁸ y eritema discrómico perstans.¹²⁹

Tabla 1. Selección de patologías asociadas a la infección por el virus de la hepatitis C.

- Crioglobulinemia mixta
- Eritema necrolítico acral
- Liquen plano
- Periarteritis nodosa cutánea y sistémica
- Porfiria cutánea tarda
- Prurigo
- Psoriasis
- Síndrome de Sjögren y sialoadenitis crónica inespecífica
- Tiroiditis autoinmune
- Trastornos linfo y mieloproliferativos (linfoma de células B, mieloma)
- Trombopenia autoinmune
- Úlcera corneal de Mooren
- Urticaria crónica

3.4. Detección del virus de la hepatitis C en piel

Las patologías donde con más frecuencia se ha investigado la presencia del VHC son la vasculitis por crioglobulinemia mixta y el liquen plano. La detección del VHC en piel se ha realizado mediante técnicas de hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR).

3.4.1. Técnicas

3.4.1.1. Hibridación in situ

La hibridación *in situ* consiste en la detección y localización de secuencias específicas de RNA mensajero (mRNA) en secciones de tejido o en preparaciones celulares mediante la hibridación de la cadena complementaria de oligonucleótidos (sonda) a la secuencia de interés. Es una técnica muy sensible ya que permite detectar 10-20 copias de mRNA por

célula.

El principio básico consiste en aislar el DNA o RNA de interés, separarlo mediante electroforesis e hibridar las secuencias de interés con una determinada sonda. Las sondas pueden ser de varios tipos: oligonucleótidos, DNA de cadena única, DNA de cadena doble o RNA. Las sondas se pueden marcar con isótopos o con otras sustancias (biotina, digoxigenina).

El método de marcaje condiciona la forma en que se va a detectar el producto de la hibridación. Cuando una sonda ha sido marcada con radioisótopos, el producto de la hibridación se detecta de forma directa mediante película o emulsión fotográfica. Si la sonda no ha sido marcada con isótopos entonces el método de detección es indirecto.

En este caso se emplean anticuerpos anti-biotina o anti-digoxigenina marcados con una enzima (fosfatasa alcalina) que tras añadir el sustrato correspondiente permite visualizar el producto de la hibridación.

Los resultados obtenidos con esta técnica son muy variables en función de las condiciones de temperatura, pH y protocolo de lavados.

Para validar la sensibilidad y especificidad de la técnica se realizan controles positivos y negativos, respectivamente. El control positivo se utiliza para descartar que exista algún problema con la preparación del tejido o con el tejido en sí mismo que sea lo que ocasione la falta de detección de la secuencia de interés. Como control positivo se emplea una preparación que contenga la secuencia de interés y se hibrida con la sonda correspondiente. El control negativo se utiliza para confirmar que la sonda se une a la secuencia diana y no a otros componentes celulares o secuencias relacionadas. Existen varios controles negativos que se pueden emplear. Entre ellos destacan: utilizar sondas con secuencias no relacionadas, pretratar el tejido con RNasa para eliminar el marcaje específico a la secuencia diana y eliminar la sonda en la mezcla de hibridación.

3.4.1.2. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que permite la detección y localización de proteínas en un determinado tejido. La técnica se puede realizar en muestras congeladas y en muestras en parafina. Para ello se utiliza un anticuerpo que se conoce como anticuerpo primario porque es el que se fija a la proteína de interés. Este anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. La diferencia estriba en que los anticuerpos monoclonales presentan mayor especificidad que los policlonales. Todos los anticuerpos (sean monoclonales o policlonales) se pueden utilizar en muestras congeladas pero no sucede lo mismo con las muestras procesadas en parafina.

Para detectar la formación de los inmunocomplejos (anticuerpo primario-proteína de interés) se emplea un segundo anticuerpo. Este anticuerpo secundario está unido a una enzima (fosfatasa alcalina) en su extremo Fc y en su extremo ab se fija a la fracción Fc del anticuerpo primario.

Finalmente se añade el sustrato de la fosfatasa alcalina y mediante la tinción con fuchina (coloración rojiza) o aminoetilcarbazol (coloración marrón) y contra-tinción con hematoxilina es posible detectar la presencia de la proteína de interés. Es necesario inhibir la fosfatasa alcalina endógena (presente en el tejido) mediante levamisol o peróxido de hidrógeno para aumentar la especificidad de la técnica.

Para validar la sensibilidad y especificidad de la técnica se realizan controles positivos y negativos, respectivamente. El control positivo se realiza mediante la utilización de una muestra donde la detección del inmunocomplejo (proteína conocida y su correspondiente anticuerpo) esté estandarizada (ej.: la positividad de las células endoteliales para el factor VIII). El control negativo se realiza procesando una de las muestras a estudio como el resto de las demás pero omitiendo el anticuerpo primario.

3.4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica extraordinariamente sensible que permite detectar secuencias de DNA complementario (cDNA) que están presentes en un determinado tejido o fluido. El límite inferior de detección está en torno a las 10 copias. Para llevar a cabo la reacción se dispone de secuencias de oligonucleótidos (primers) que son complementarias a la secuencia de interés, deoxinucleótidos, DNA polimerasa y su correspondiente solución tampón (buffer).

En el caso del virus de la hepatitis C en el que se detecta RNA es necesario emplear la enzima transcriptasa inversa. Esta enzima permite crear la cadena de DNA complementario (cDNA) sobre la que la DNA polimerasa puede trabajar sintetizando y elongando la secuencia de interés.

El proceso se divide en tres fases: desnaturalización, síntesis y elongación que se generan en varios ciclos a distintas temperaturas en un termociclador. Las altas temperaturas permiten desnaturalizar el cDNA. De esta forma las dos cadenas del DNA quedan expuestas y las secuencias de oligonucleótidos se unen a las secuencias complementarias en el DNA. La DNA polimerasa comienza entonces a añadir los deoxinucleótidos que permiten elongar la cadena. Este proceso repetido unas 20-40 veces genera millones de copias de DNA que puede ser detectado posteriormente.

Cuando la reacción no genera suficiente producto se realiza una modificación de la técnica que se conoce como "nested" PCR. Esta modificación consiste en realizar una segunda ronda de amplificación de una secuencia que ya ha sido amplificada por PCR utilizando un nuevo par de oligonucleótidos.

Una vez terminados los ciclos se realiza electroforesis del producto en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para detectar la banda de la secuencia de interés.

Para validar la sensibilidad y especificidad de la técnica se realizan controles positivos y negativos, respectivamente. El control positivo consiste en añadir una muestra que

contenga la secuencia conocida junto con los oligonucleótidos. Para los controles negativos se coloca una muestra con los oligonucleótidos (primers) pero sin el cDNA.

3.4.2. Detección del VHC en patologías seleccionadas

3.4.2.1. Vasculitis por crioglobulinemia mixta

Mediante hibridación *in situ* Agnello y colaboradores han detectado partículas virales en el endotelio, queratinocitos y epitelio ductal de piel afecta por vasculitis por crioglobulinemia mixta.¹³⁸ En todos estos casos se detectó la cadena positiva (genómica) del virus y únicamente en un tercio de las muestras se detectaron escasos acúmulos de la cadena negativa (antigenómica) a nivel de la epidermis y la dermis. La señal de las cadenas positivas en la epidermis se localizaba preferentemente en las células suprabasales. A nivel de la dermis la señal se localizaba alrededor de los vasos inflamados y en el epitelio ductal. No se detectó RNA del VHC en las células inflamatorias de las lesiones de vasculitis ni en las células endoteliales aparentemente no inflamadas. En una biopsia de piel normal que se obtuvo de uno de los pacientes estudiados no se detectó RNA viral.

Mediante inmunohistoquímica Sansonno y colaboradores han detectado antígenos relacionados del virus de la hepatitis C dentro de los vasos dérmicos y en la pared de los mismos en un 40% de pacientes con lesiones de vasculitis por crioglobulinemia mixta.¹³⁴ Se observaron dos patrones de depósito vascular de los antígenos que se localizaban preferentemente en arterias de pequeño calibre. Los depósitos podían ser gruesos y prominentes rellenoando prácticamente los espacios vasculares o podían localizarse en la pared del vaso y espacios perivasculares sin afectar la luz vascular. Un 35.7% de los pacientes presentaba reactividad antigénica en hígado y piel, un 28.6% sólo presentaba positividad en hígado y un 35.7% no mostraba reactividad ni en hígado ni en piel. Los dos subgrupos de pacientes que presentaban inmunoreactividad positiva (en tejido hepático y piel o en tejido hepático únicamente) se asociaban con más frecuencia a hepatitis crónica

activa (80%) y a hepatitis crónica persistente o cirrosis (75%). Estos hallazgos contrastaban con el subgrupo que mostraba inmunoreactividad negativa, donde la frecuencia de hepatopatía crónica era del 60%. También los signos clínicos de vasculitis activa eran más frecuentes en los primeros dos subgrupos que en el tercero siendo la frecuencia del 60%, 50% y 40%, respectivamente.

En la piel perilesional (aparentemente sana) de estos pacientes se demostró inmunoreactividad positiva en las paredes de los vasos. Los autores no comentan la inmunoreactividad en el resto de la biopsia cutánea por lo que se infiere que es negativa. En aquellos casos de infección por el VHC y vasculitis no crioglobulinémica sólo se detectó reactividad en el tejido hepático (71.4%), siendo negativa en las muestras de piel sana.

La detección del VHC en el tejido hepático es relativamente sencilla¹³⁵, no así en la piel de pacientes con patología asociada como vasculitis por crioglobulinemia mixta. En los casos donde existe un exceso de anticuerpos en relación con antígenos como en la crioglobulinemia mixta la técnica presenta con frecuencia falsos negativos. Esto se debe a que los determinantes antigénicos son enmascarados por los anticuerpos específicos. Mediante electroforesis en condiciones específicas (electroelución ácida) se eliminan las inmunoglobulinas de los antígenos enmascarados sin alterar la antigenicidad de las proteínas; aumentando de esta forma la sensibilidad de la técnica.¹³⁶ Es probable que la falta de detección del VHC en más del 50% de las biopsias cutáneas de los pacientes con vasculitis se deba a limitaciones de la técnica. Los resultados son muy variables en función del anticuerpo empleado, el tipo de fijación de la muestra y la sensibilidad del sistema que detecta el anticuerpo primario.¹³⁷

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa Mangia y colaboradores han demostrado la presencia de la cadena genómica del virus en aproximadamente un tercio de los pacientes con vasculitis por CM.¹³⁰ En este estudio no se evaluó la presencia del virus en piel perilesional o sana.

Esta baja tasa de detección se podría explicar por el lapso de tiempo transcurrido desde la obtención de las muestras hasta su congelación. Se ha descrito que si las biopsias hepáticas se congelan en nitrógeno líquido cinco minutos después de obtenerlas el RNA-VHC puede ser indetectable mediante RT-PCR debido a la degradación parcial del RNA viral.¹³¹

Este efecto sería mucho más notorio en el caso de las biopsias cutáneas ya que la cantidad total de RNA-VHC en las muestras cutáneas es menor que en las de tejido hepático donde hasta un 80% de los hepatocitos pueden estar infectados.^{132, 133}

3.4.2.2 *Liquen plano*

Mediante inmunohistoquímica no se ha detectado señal positiva en biopsias cutáneas de liquen plano.¹⁴¹

Mediante PCR se ha detectado el RNA viral tanto en lesiones cutáneas¹³⁹ como en lesiones mucosas.¹⁴⁰ Sin embargo, debido a la elevada sensibilidad de la PCR, esta técnica no es capaz de distinguir entre el RNA del VHC de la lesión y el que está presente en el plasma y que pudiera haber contaminado la muestra. Mangia y colaboradores¹³⁰, utilizando la técnica de PCR cuantitativa, no detectaron RNA viral en ninguna de las muestras de liquen plano cutáneo analizadas. Estos hallazgos se podrían explicar por la degradación del RNA viral durante el procesamiento de las muestras como ha sido descrito previamente para los casos de vasculitis por CM.

En contraposición a estos hallazgos, nosotros hemos demostrado la presencia del VHC mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en muestras de piel lesional y perilesional de pacientes con liquen plano así como en muestras de piel perilesional de pacientes con otras patologías cutáneas.¹⁴²

Mediante hibridación *in situ* se detectó el RNA-VHC de polaridad genómica y antigenómica en todas las muestras procedentes del grupo a estudio (pacientes con infección crónica por el VHC y liquen plano) así como en el grupo control (pacientes con infección crónica por el VHC con patología cutánea excluyendo liquen plano). En un segundo grupo control (pacientes con hepatitis crónica por VHC sin patología cutánea asociada) incluido a posteriori en el trabajo anteriormente señalado y que es objeto parcial del presente estudio, también demostramos la presencia del virus de la hepatitis C. Las posibles causas de estas diferencias en los resultados comparado con otros estudios serán comentadas en el apartado de discusión.

En el caso del liquen plano mucoso se ha demostrado la presencia de RNA viral mediante hibridación *in situ* en todos los casos analizados.¹⁴³ Incluso la señal fue positiva en las biopsias de mucosa oral procedentes de pacientes con infección por el VHC sin liquen mucoso asociado. La señal de hibridación se detectó únicamente en el citoplasma de las células epiteliales, no en las células del infiltrado inflamatorio. La distribución en el epitelio era aleatoria. El porcentaje de células epiteliales infectadas (4.4%-14.3%) era similar en las biopsias de mucosa normal y de mucosa afecta por liquen. Prácticamente todas las células que mostraban una señal positiva de hibridación para la cadena genómica, también la presentaban para la cadena antigenómica, lo que sugiere que el VHC se replica en las células epiteliales. No se evidenciaron alteraciones morfológicas en las células que mostraban señal de hibridación positiva.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Pacientes

4.1.1. Selección

Se incluyeron pacientes mayores de 18 años con hepatopatía crónica por el VHC sin antecedentes personales de enfermedades cutáneas (grupo a estudio) y pacientes con hepatopatía crónica por otras causas (grupo control). En todos los pacientes estaba previsto realizar una biopsia hepática como parte del protocolo terapéutico. Quince pacientes presentaban hepatitis crónica por el virus C con serología y RNA-VHC positivos en suero. A estos pacientes se les realizó una exhaustiva anamnesis para identificar factores de riesgo para la transmisión del VHC y se determinó el genotipo viral. Diez pacientes presentaban hepatitis crónica de diversa etiología. A este grupo control pertenecían 6 pacientes con hepatitis crónica por virus B (antígeno de superficie y DNA en suero positivos) y 4 pacientes con hepatopatía alcohólica. Ninguno de los pacientes estaba recibiendo tratamiento antiviral o inmunosupresor en el momento de obtener las biopsias de hígado y piel. Otras causas de enfermedades hepáticas como hepatitis autoinmune o coinfección por otros virus hepatotropos fueron excluidas.

4.1.2. Obtención de muestras

Previo consentimiento informado se obtuvieron muestras de piel sana aprovechando la zona de punción para la biopsia hepática. Las muestras se obtuvieron de la zona del costado previamente anestesiada con mepivacaína al 2% (3cc) mediante un cilindro cortante de 4mm (Stiefel Laboratories LTD, Sligo, Ireland). Inmediatamente tras la excisión las muestras se embebieron en formaldehído para su posterior procesamiento en parafina y estudio mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

En el mismo día en que se realizaron las biopsias hepáticas y cutáneas se obtuvieron las muestras de suero y de sudor. En el suero se realizó cuantificación del RNA-VHC y determinación de genotipos.

La obtención del sudor se realizó mediante iontoforesis con pilocarpina. En la superficie medial del antebrazo se colocó un disco de pilocarpina al 0.5% (Pilogel^R, Wescor Inc, Logan UT). Tras estimulación con dispositivo de iontoforesis (Webster Sweat Inducer

3700-SYS, Wescor Inc) el sudor se recolectó a través de un tubo espiral perforado (Macroduct^R, Wescor Inc). En el sudor se realizó cuantificación del RNA-VHC.

4.2. Técnicas

4.2.1. Cuantificación del RNA-VHC y determinación de genotipos en suero

La concentración del RNA-VHC en suero se determinó mediante el Amplicor Monitor Test (HCV Monitor Quantitative Assay, Roche Diagnostic System, Basel, Suiza). La determinación de genotipos se realizó mediante una prueba de sondas (INNO-LIPA HCV II, Innogenetics NV, Zwjnaarde, Bélgica).

4.2.2. Hibridación *in situ*

A partir del producto de la reacción en cadena de la polimerasa de 340 pares de bases (bp) correspondiente a la región no codificante 5'(5'NCR) del genoma del virus de la hepatitis C se generó el plásmido pC5'NCR. Esto se consigue mediante la clonación del producto de la PCR en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen, San Diego, CA). En el plásmido el cDNA está flanqueado por los promotores RNA SP6 (5' a la inserción del cDNA) y T7 (3' a la inserción del cDNA).

El plásmido fue digerido con las enzimas de restricción Hind III o Xba I. Los plásmidos linearizados se transcribieron *in vitro* utilizando las polimerasas del RNA (Roche Molecular Biochemicals) SP6 (plásmido linearizado Xba I) o T7 (plásmido linearizado Hind III) en presencia de digoxigenina 11-UTP (Roche Molecular Biochemicals) para generar sondas de polaridad positiva y negativa, respectivamente.

Las muestras de tejido desparafinadas fueron hibridadas con la correspondiente sonda de polaridad positiva y negativa para detectar el RNA-VHC de polaridad negativa y positiva, respectivamente.

La especificidad de la hibridación *in situ* fue evaluada mediante:

1. Digestión de las preparaciones con RNasa A (0.2mg/ml) (Sigma Corporation, St Louis, Mo) o DNasa I (20U/ml) (Sigma Corporation, St Louis, Mo) durante 2 horas a 37 grados centígrados antes de la hibridación *in situ*.
2. Hibridación con una sonda no relacionada (fragmento de 360bp del gen de cloranfenicol

acetil transferasa generado por PCR y clonado en el vector pCRII-TOPO).

3. Omisión de la sonda en la mezcla de hibridación.

La visualización de las señales se realizó utilizando un microscopio NIKON ELIPSE E-400 con los objetivos 20x, 40x y 100x. Las imágenes se obtuvieron con una cámara de alta resolución monocromática CCD (DIC-N, Wared Precision Instruments, Cambridge, UK).

4.2.3. Inmunohistoquímica

Se realizó de forma automática (Tech Mate 500, Dako, Glostrup, Denmark) utilizando un anticuerpo monoclonal anti-core del virus de la hepatitis C (Hepatitis C virus Monotope™, ViroStat, Portland, ME). Tras la extracción antigénica (3 minutos en tampón de citrato 10mM, pH 6) se realizó la incubación con el anticuerpo primario a una dilución 1/30.

El bloqueo de la peroxidasa endógena se llevó a cabo mediante tratamiento de las preparaciones con peróxido de hidrógeno. El revelado se realizó mediante el procedimiento de tinción Dako Envision, utilizando aminoetilcarbazol como cromógeno.

La especificidad de la reacción se evaluó omitiendo el anticuerpo primario en la detección inmunohistoquímica en preparaciones seriadas de las mismas muestras de piel.

4.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa en muestras de sudor

Las muestras de sudor se centrifugaron a 12,000g durante 10 minutos y los sobrenadantes se dividieron en dos alícuotas de 30µl. Una de las alícuotas se digirió con 0.5mg/ml de RNasa DNA-libre (RNase, DNase Free, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) durante 30 minutos a 37 grados centígrados. Finalmente el RNA total se aisló de los sobrenadantes del sudor digeridos con RNasa y sin digerir mediante la utilización del sistema de aislamiento del RNA total SV (Promega, Madison, WI). La presencia del RNA-VHC de polaridad genómica y antigenómica se evaluó mediante RT-PCR.

4.3. Análisis estadístico

Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los datos cuantitativos. El test de Spearman se utilizó para la correlación de variables cuantitativas y el test de Kendall para la correlación de variables cuantitativas y cualitativas ordinales. Para establecer una diferencia estadísticamente significativa se consideraron valores de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS (SPSS para Windows versión 9.0, SPSS Inc. Chicago, Il).

5. RESULTADOS

5.1. Cuantificación del RNA viral en suero y determinación de genotipos

La concentración del RNA-VHC en suero varió entre 9.5×10^4 UI/mL y 2.0×10^6 UI/mL (media \pm desviación típica fue 673×10^5 UI/mL \pm 586×10^5 UI/mL. El genotipo viral fue 1b en 12 pacientes, 1a en uno, 1b/4 en uno y 2a/2c en otro caso. La distribución de los genotipos según las probables causas de transmisión se recoge en la tabla 2.

5.2. Hibridación *in situ*

5.2.1. Detección del RNA-VHC en la epidermis

La señal de hibridación *in situ* se detectó en el citoplasma de los queratinocitos en las biopsias de piel correspondientes a todos los pacientes con serología positiva para el VHC. La señal se distribuía de forma aleatoria en todos los estratos de la epidermis a excepción del estrato córneo. Los queratinocitos infectados no presentaban alteraciones morfológicas reseñables. El porcentaje medio de queratinocitos que mostraron RNA-VHC genómico y antigenómico fue $6.76\% \pm 2.97\%$ (rango: 0.2% a 10%) y $3.0\% \pm 3.08\%$ (rango: 0.67% a 12%), respectivamente; siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p=0.00037$), (tabla 2 y figuras 2 y 3). No se detectó señal alguna en las muestras de pacientes con serología negativa para el VHC (figura 4).

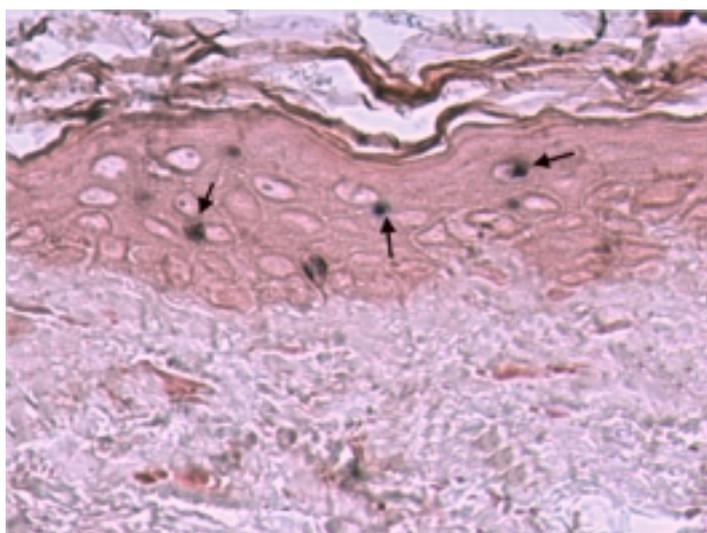


Figura 2. Detección *in situ* del RNA-VHC de polaridad genómica en los queratinocitos de un paciente anti-VHC positivo

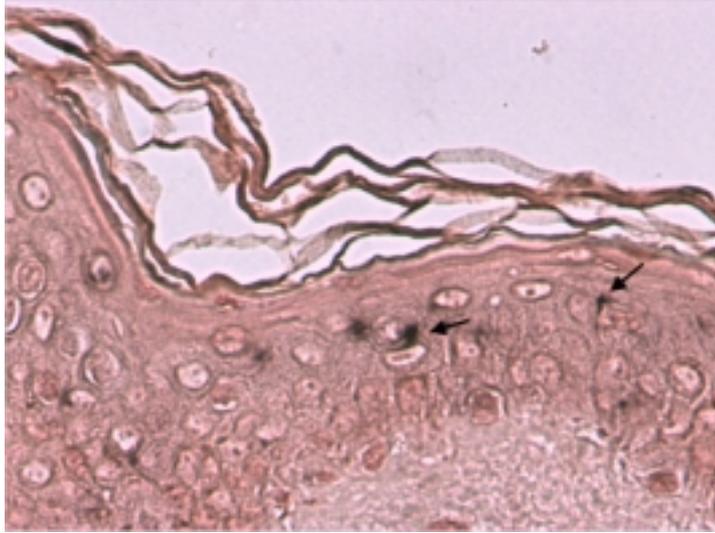


Figura 3. Detección *in situ* del RNA-VHC de polaridad antigenómica en los queratinocitos de un paciente anti-VHC positivo

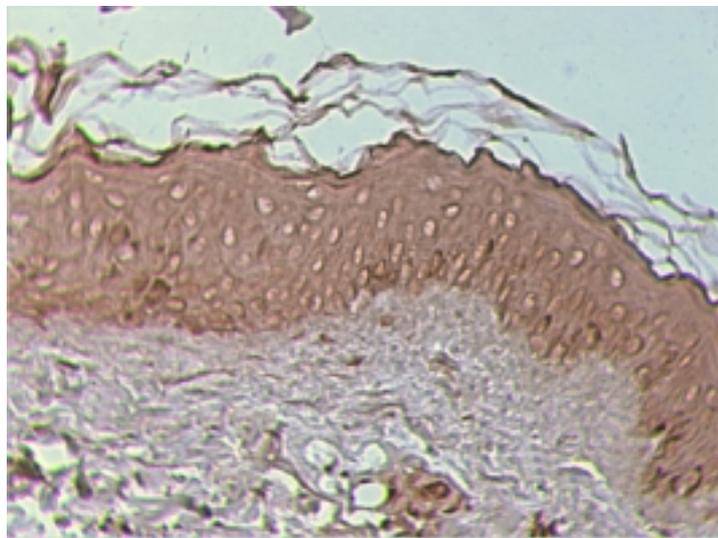


Figura 4. Ausencia de detección *in situ* del RNA-VHC en los queratinocitos de un paciente anti-VHC negativo

5.2.2. Detección del RNA-VHC en la dermis

No se observó señal de hibridación *in situ* en el tejido conectivo.

- Glándulas sebáceas

Debido al proceso de desparafinización las células epiteliales de las glándulas sebáceas desaparecen. Únicamente en algunas preparaciones con desparafinización incompleta de pacientes con serología positiva para el VHC se ha podido detectar la señal de hibridación *in situ* en las células epiteliales. La señal se localizaba en las células del estrato superior del epitelio glandular, no detectándose señal alguna en las células de la capa basal (figura 5). No se detectó señal alguna en las muestras de pacientes con serología negativa para el VHC (figura 6).

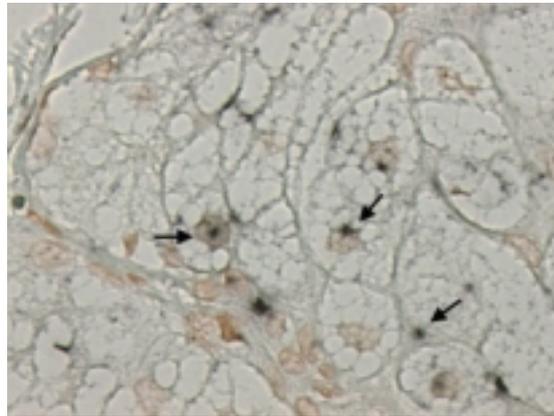


Figura 5. Detección *in situ* del RNA-VHC de polaridad genómica en las glándulas sebáceas de un paciente anti-VHC positivo

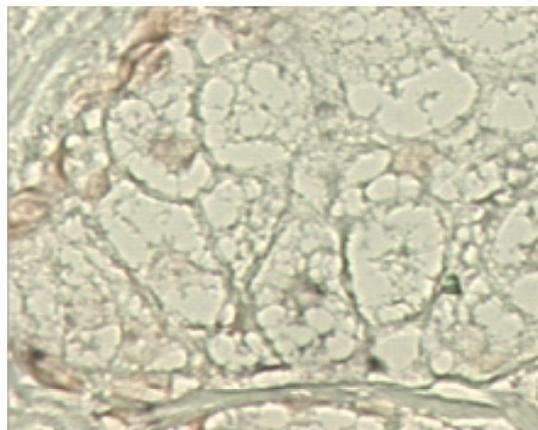


Figura 6. Ausencia de detección *in situ* del RNA-VHC en las glándulas sebáceas de un paciente anti-VHC negativo

- Glándulas sudoríparas

Se detectaron señales de hibridación *in situ* en las células epiteliales de la parte basal del oville glandular en las muestras de los quince pacientes con hepatitis crónica por virus C.

El porcentaje medio de células epiteliales que mostraban señales correspondientes al RNA-VHC genómico fue $9.6\% \pm 5.2\%$ (rango 1.7%-20.1%) (figura 7) mientras que el porcentaje de células que mostraban RNA-VHC antigenómico fue $4.2\% \pm 3.8\%$ (rango 1-12%), figura 8, tabla 2. No se detectó señal alguna en las muestras de pacientes con serología negativa para el VHC (figura 9).

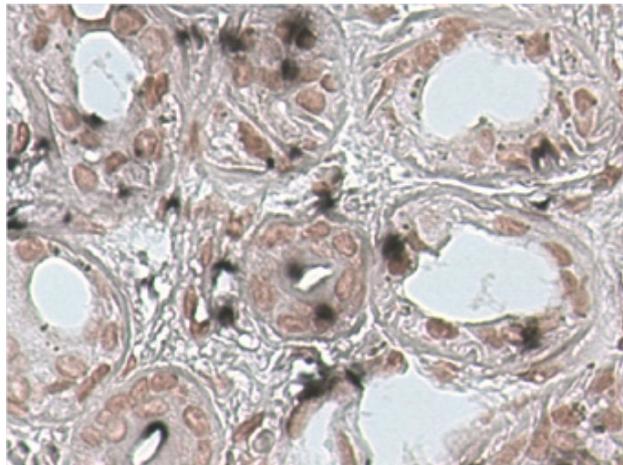


Figura 7. Detección *in situ* del RNA-VHC de polaridad genómica en las glándulas sudoríparas ecrinas de un paciente anti-VHC positivo

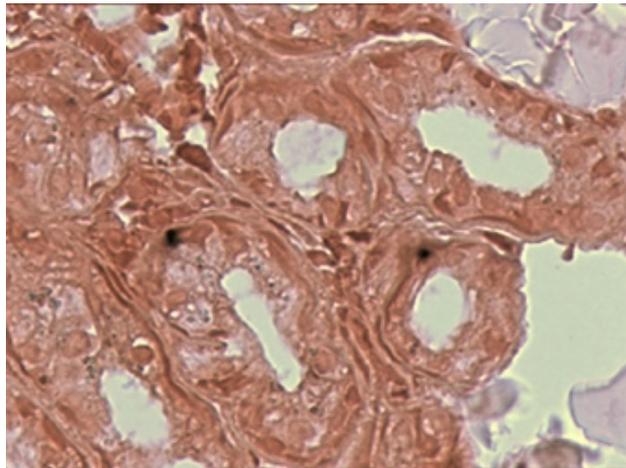


Figura 8. Detección *in situ* del RNA-VHC de polaridad antigenómica en las glándulas sudoríparas ecrinas de un paciente anti-VHC positivo

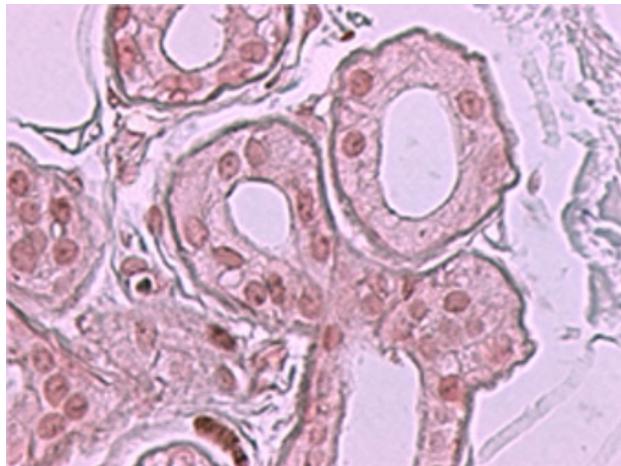


Figura 9. Ausencia de detección *in situ* del RNA-VHC en las glándulas sudoríparas ecrinas de un paciente anti-VHC negativo

Tabla 2. Demografía, cuantificación del RNA viral en suero y porcentaje de células epiteliales positivas para el RNA-VHC.

Edad:sexo	Genotipo	Vía de transmisión	RNA-VHC suero (UI/mL)	Células epidermis HIS positiva		Cél. gl sudoríparas HIS positiva	
				Cadena genómica	Cadena anti-genómica	Cadena genómica	Cadena antigenómica
40:M	1b	Transfusión	800,000	0.2%	0.67%	2.2%	1.2%
35:H	1a	Desconocida	375,000	9.1%	12%	8.59%	11.95%
47:H	1b	Desconocida	807,142	8.18%	3.84%	8.88%	3.02%
44:H	1b	Transfusión	185,000	5.8%	1.1%	5.1%	1.85%
50:M	1b	Desconocida	320,579	6.36%	4.6%	8%	3.6%
40:H	1b/4	ADVP	52,725	3.69%	3%	1.72%	1.58%
56:H	1b	Desconocida	1,780,000	8.8%	1%	15.1%	6%
63:M	2a/2c	Transfusión	850,000	5%	7.5%	14.2%	12.5%
57:M	1b	Transfusión	750,000	6.7%	1.2%	12.7%	7.9%
41:M	1b	Desconocida	763,500	8.2%	1%	17.1%	1%
30:M	1b	Transfusión	263,017	10%	2.31%	7%	5.2%
36:H	1b	Cirugía	9,500	2.1%	1.3%	7.5%	1.3%
40:H	1b	Desconocida	946,000	7.4%	2.4%	10.1%	3.8%
60:M	1b	Desconocida	200,000	10%	1%	6.56%	1%
56:H	1b	Desconocida	2,000,000	10%	2.2%	20.12%	1%

M: mujer, H: hombre; HIS: hibridación *in situ*; ADVP: adicción a drogas vía parenteral.

5.3. Inmunohistoquímica

5.3.1. Detección de la proteína del core del VHC en la epidermis

El antígeno del core del VHC se detectó en el citoplasma de los queratinocitos en las biopsias de piel correspondientes a todos los pacientes con serología positiva para el VHC. La distribución al azar de la tinción en los queratinocitos (figura 10) fue similar a la observada por hibridación *in situ*. El porcentaje de queratinocitos teñidos fue $4.5\% \pm 2.76\%$. No se objetivó tinción positiva en las muestras donde se omitió el anticuerpo primario. Tampoco se objetivó tinción alguna en las biopsias de pacientes con serología negativa para el VHC (figura 11).

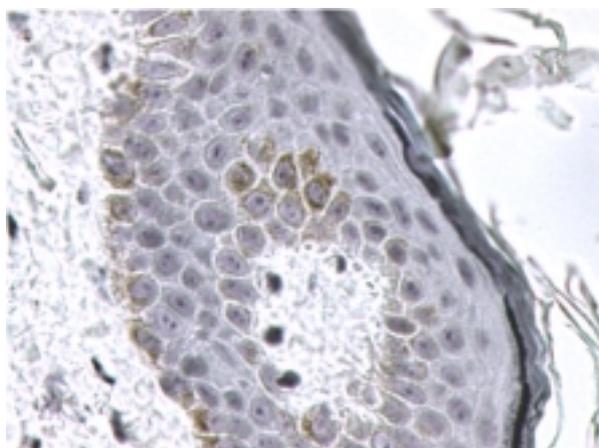


Figura 10. Detección mediante inmunohistoquímica de la proteína core del VHC en los queratinocitos de un paciente anti-VHC positivo

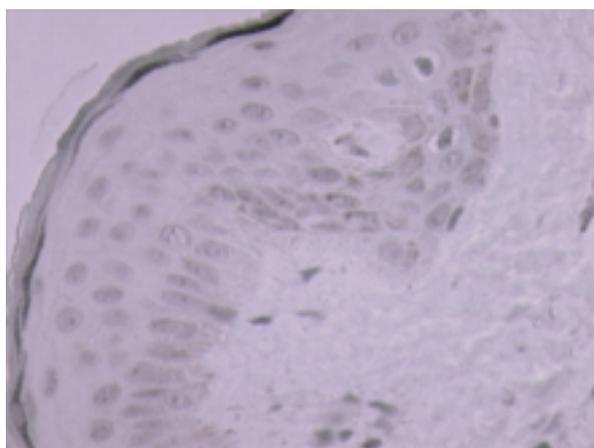


Figura 11. Ausencia de detección mediante inmunohistoquímica de la proteína core del VHC en los queratinocitos de un paciente anti-VHC negativo

5.3.2. Detección de la proteína del core del VHC en la dermis

No se detectó tinción positiva en el endotelio ni en los fibroblastos del tejido conectivo.

En el epitelio de las glándulas sudoríparas se detectó tinción positiva similar a la señal de hibridación *in situ* (figura 12). No se detectó tinción positiva en las biopsias de piel correspondientes a los pacientes con serología negativa para el VHC (figura 13).

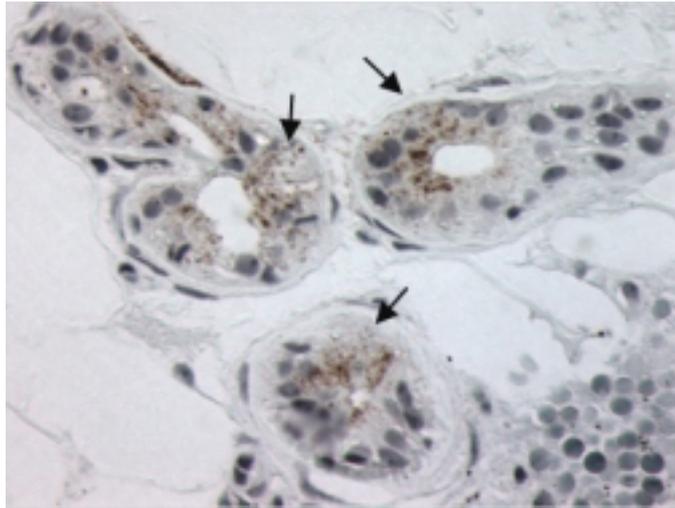


Figura 12. Detección mediante inmunohistoquímica de la proteína del core del VHC en las glándulas sudoríparas ecricas de un paciente anti-VHC positivo

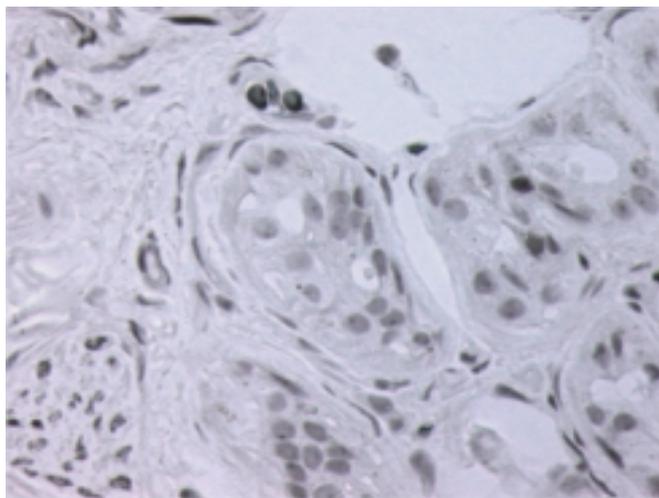


Figura 13. Ausencia de detección mediante inmunohistoquímica de la proteína del core del VHC en las glándulas sudoríparas ecricas de un paciente anti-VHC negativo

5.4 Correlación entre la infección de células epiteliales y la concentración del RNA-VHC en suero

Únicamente se halló correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de células epiteliales de las glándulas sudoríparas que expresaban señal para la cadena genómica y los niveles de viremia, $r=0.75$, $p<0.05\%$ (figura 14). No se halló correlación alguna entre el porcentaje de células epiteliales de las glándulas sudoríparas que expresaban señal para la cadena antigénica y la viremia ni entre el porcentaje de los queratinocitos infectados y la viremia.

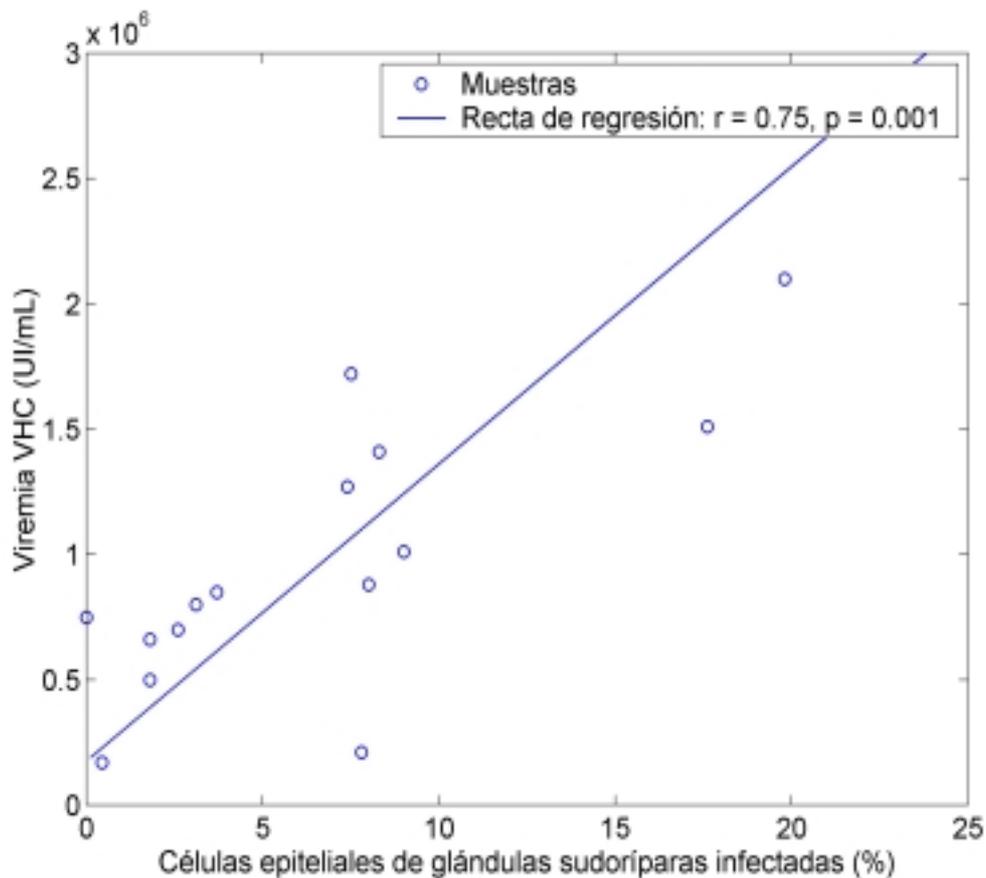


Figura 14. Correlación entre el porcentaje de células epiteliales de las glándulas sudoríparas que mostraban señal de hibridación para la cadena genómica del VHC y la viremia.

5.5. Reacción en cadena de la polimerasa en el sudor

La presencia del RNA-VHC se investigó en las muestras de sudor de 12 de los 15 pacientes con serología positiva para el VHC y en 8 de los 10 pacientes con hepatopatía crónica por otras causas. El RNA-VHC genómico se detectó en las muestras de sudor de los pacientes con serología positiva para el VHC (figura 15 D', E', F' y G') pero no en las muestras correspondientes a los pacientes con serología negativa (figura 15 B y C). La digestión de las muestras de sudor mediante RNasa antes de la extracción del RNA no eliminó la detección del VHC-RNA (figura 15 D, E, F y G). Este hallazgo implica que el RNA viral en el sudor estaba encapsulado. No se detectó VHC-RNA antigenómico en ninguna de las muestras estudiadas.

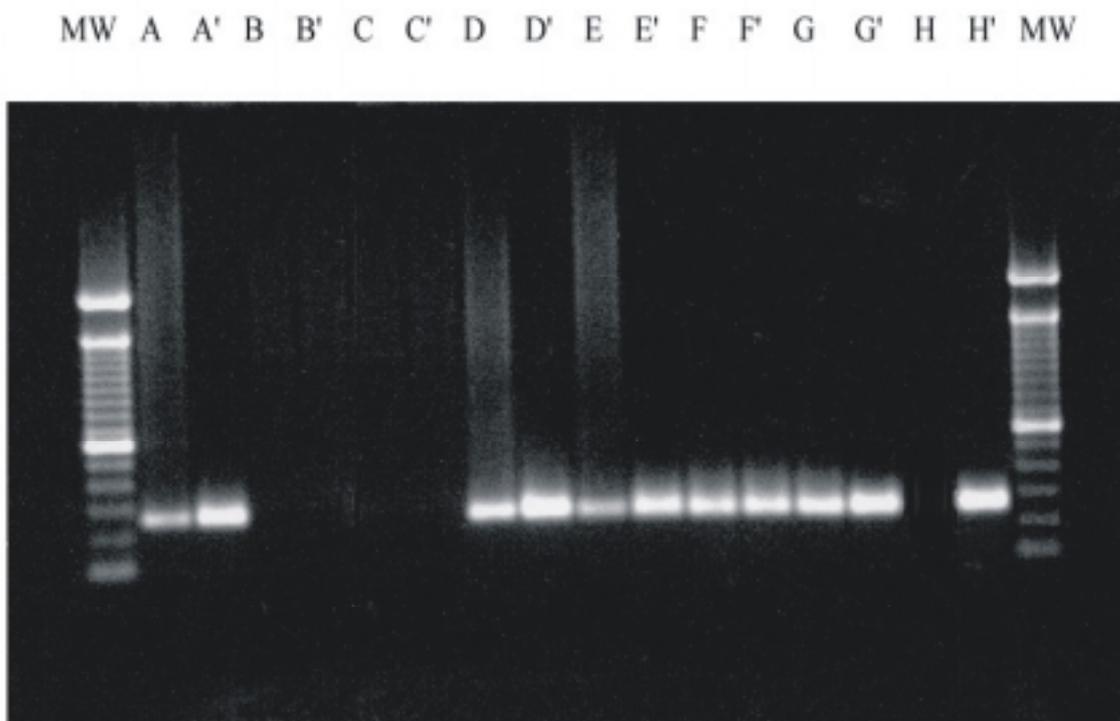


Figura 15. Detección del RNA-VHC en muestras de sudor tras digestión con RNasa (B, C, D, E, F, G) y en muestras de sudor sin digerir (B', C', D', E', F', G'). MW: marcador de peso molecular. A, A': muestra de suero digerida (A) y no digerida (A') de un paciente con hepatitis crónica por virus C. B, B'; C, C': muestras de sudor de dos pacientes con serología negativa para el virus C. D, D'; E, E'; F, F' y G, G': muestras de sudor de 4 pacientes con hepatitis crónica por virus C. H, H': región no codificante 5' del RNA-VHC transcrita *in vitro* del plásmido pC5'NCR, digerida (H) y sin digerir (H').

5.6. Cuantificación del RNA-VHC en el sudor y correlación con el RNA-VHC en el suero

La concentración del RNA-VHC en sudor varió entre 2.9×10^3 UI/ml y 8.2×10^4 UI/ml (media \pm desviación típica fue 2.76×10^4 UI/ml \pm 2.46×10^4 UI/ml), siendo estadísticamente más baja que en suero ($p=0.001$). No se halló correlación estadística entre la concentración de RNA viral en el sudor y en el suero (tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de RNA-VHC en suero y sudor.

Edad:Sexo	RNA-VHC suero (UI/mL)	RNA-VHC sudor (UI/mL)
40:M	800.000	Muestra no disponible
35:H	375.000	33.940
47:H	807.142	49.380
44:H	185.000	9.210
50:M	320.579	14.890
40:H	52.725	6.410
56:H	1.780.000	32.830
63:M	850.000	12.340
57:M	750.000	19.530
41:M	763.500	81.870
30:M	263.017	59.230
36:H	9.500	Muestra no disponible
40:H	946.000	Muestra no disponible
60:M	200.000	8.700
56:H	2.000.000	2.890

M: mujer; H: hombre

6. DISCUSIÓN

6.1. Diferencias en la metodología empleada para la detección del VHC en piel

En este trabajo hemos demostrado que el VHC infecta y se replica en las células epiteliales de todas las capas de la epidermis (excepto en la capa córnea) así como en las glándulas sudoríparas y sebáceas. La presencia del virus ha sido demostrada tanto por hibridación *in situ* como por inmunohistoquímica. Es fundamental realizar los controles adecuados para validar los resultados obtenidos con una determinada técnica, de esta forma se pueden comparar los resultados obtenidos por otros autores.¹⁴⁴

Mediante nuestra técnica de inmunohistoquímica hemos podido detectar la presencia del VHC en piel sana de pacientes con hepatopatía por virus C, en contraposición a otros autores. Estas diferencias se pueden explicar por la diferente metodología empleada. Nuestras muestras fueron procesadas en parafina utilizando un anticuerpo monoclonal distinto al empleado por Sansonno¹³⁴ y Boyd¹⁴¹ lo que podría explicar, entre otros factores, la mayor sensibilidad de la técnica.

Mediante nuestra técnica de hibridación *in situ* hemos podido demostrar la presencia de cadenas genómicas y antigenómicas del VHC en los queratinocitos y células epiteliales de las glándulas sudoríparas y sebáceas en muestras de tejido de piel sana. Otros autores, sin embargo, no han demostrado de forma sistemática la presencia de RNA-VHC de polaridad positiva (genómica) y negativa (antigenómica) en las muestras de piel sana, lo cual contrasta con nuestros resultados.

La sensibilidad de la hibridación *in situ* depende de la proporción del genoma que esté representado en la sonda, de los métodos utilizados para detectar la sonda y de la naturaleza de la sonda en sí.

La especificidad de la prueba depende de la homología de los nucleótidos entre la sonda y la diana y en lo estricto de los protocolos de hibridación y de lavados.¹³⁷ La especificidad de nuestra técnica se demostró al no detectarse señal de hibridación si se pretrataban las preparaciones con RNasa, si se hibridaba con una sonda no relacionada o si se omitía la sonda durante este proceso. Por otro lado se podría aducir que la detección de la cadena de polaridad negativa podría deberse a una hibridación inespecífica entre la sonda de

polaridad positiva (utilizada para detectar RNA viral de polaridad antígenómica) y el RNA-VHC genómico. Sin embargo se ha demostrado previamente que bajo las condiciones en las que se ejecuta nuestra técnica de hibridación *in situ* no existe hibridación cruzada entre la sonda empleada para detectar el RNA-VHC antígenómico y el RNA viral genómico.¹²

6.2. Detección del virus de la hepatitis C en la epidermis

6.2.1. Generalidades

La epidermis es un epitelio estratificado escamoso que se renueva periódicamente. El tiempo medio de migración de una célula en la capa basal hasta el estrato córneo es de dos semanas y tarda otras dos semanas más hasta su descamación.¹⁴⁵

La epidermis está constituida fundamentalmente por queratinocitos que componen el 80% de la población celular y cuya función es contribuir a la formación del estrato córneo. Los diferentes estratos epidérmicos (basal, espinoso, granuloso y córneo) se corresponden con los estadios de diferenciación celular de los queratinocitos.

La capa basal alberga a los queratinocitos mitóticamente activos.

El estrato espinoso se caracteriza por la presencia de queratinocitos con “espinas” en su superficie que corresponden a las estructuras que favorecen la cohesión entre las células epidérmicas que son los desmosomas. En el estrato espinoso los queratinocitos adquieren la capacidad de sintetizar otras queratinas que no están presentes en la capa basal.

En el estrato granuloso las células se caracterizan por la apariencia granular debida a los gránulos de queratohialina que están compuestos por varias proteínas (profilagrina, filamentos intermedios de queratina y loricrina). Es en este estrato granuloso donde se sintetizan y modifican las proteínas maduras a través de los fenómenos de proteólisis y fosforilación. Las células del estrato granuloso también están involucradas en la apoptosis que da lugar a las células queratinizadas del estrato córneo. Los corneocitos han perdido el núcleo y todos los contenidos celulares excepto los filamentos de queratina y la matriz de filagrina. Las enzimas responsables de estos fenómenos de degradación que han sido identificadas en la capa granulosa son DNasas, RNasas, hidrolasas ácidas, fosfatasa,

proteasas y el activador del plasminógeno.

El estrato córneo es una unidad funcional compuesta por células ricas en proteínas (corneocitos) embebidas en una matriz lipídica. El estrato córneo ejerce una excelente función de barrera frente a agentes físicos, químicos y biológicos al mantener la homeostasis de la superficie epidérmica.

Otras poblaciones celulares de la epidermis son los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel.

Los melanocitos componen aproximadamente el 15% de la población celular de la epidermis. Se localizan fundamentalmente en la capa basal y su función es la formación del pigmento melanina que protege a los queratinocitos de la radiación ultravioleta.

Las células de Langerhans derivan de la médula ósea y constituyen entre el 2-8% de la población celular epidérmica. Se localizan preferentemente entre los queratinocitos suprabasales. Pertenecen al grupo de las células presentadoras de antígeno y están implicadas sobre todo en las respuestas mediadas por células T.

Las células de Merkel son células del sistema neuroendocrino caracterizadas por la presencia de gránulos densos en su citoplasma. Están implicadas en la recepción sensorial y se encuentran fundamentalmente en la capa basal.

En la epidermis normal no se suelen encontrar otros tipos celulares a excepción de linfocitos aislados.¹⁴⁶

Nosotros hemos demostrado que el VHC presenta tropismo únicamente por las células epiteliales de la epidermis. Mediante la doble tinción con proteína S-100 descartamos que las células de Langerhans y los melanocitos estuviesen infectados.¹⁴² La identificación de formas replicativas del virus de la hepatitis C en los queratinocitos de las capas basal, granulosa y espinosa podría sugerir que el virus se transmite por contacto directo a través de la piel. Esta hipótesis es poco probable en pacientes con integridad epidérmica ya que no se ha detectado RNA-VHC ni proteína core en el estrato córneo. La digestión enzimática de todas las organelas que se produce a nivel de la capa granulosa sería la responsable de la destrucción de las partículas víricas.

6.2.2. Patogenia del VHC en enfermedades con afectación cutánea

Si el virus es capaz de infectar y de replicarse en células epiteliales, ¿qué implicación tiene en la patogenia de las diversas enfermedades cutáneas asociadas a la infección crónica por el VHC?

El desarrollo de las manifestaciones cutáneas se debe ¿a una disregulación del sistema inmune provocado por el linfotropismo del virus o a un efecto directo sobre los queratinocitos en los que se ha demostrado su capacidad de replicación?

La presencia del VHC se ha investigado en varias dermatosis inflamatorias de origen desconocido como el liquen plano, psoriasis, prurigo y urticaria crónica.

6.2.2.1. Liquen plano

Aunque una gran parte de los estudios publicados encuentra una asociación estadísticamente significativa entre el liquen plano y la infección por el VHC, una relación etiopatogénica ha sido más difícil de establecer. El liquen plano es una dermatosis inflamatoria donde la presencia del virus de la hepatitis C se ha estudiado más extensamente desde las primeras publicaciones que sugerían una posible implicación.¹⁴⁷

La prevalencia de la infección por el VHC en pacientes con liquen plano (cutáneo y mucoso) presenta una considerable variabilidad geográfica (0-60%).¹⁴⁸⁻¹⁵³

La mayoría de los estudios sobre la prevalencia de la infección se basan en resultados de serología. Algunos estudios emplean la reacción en cadena de la polimerasa y/o RIBA (radio immunoblot assay) en suero para confirmar un resultado de serología positivo.¹⁵¹

En la mayoría de los estudios existen sesgos de selección ya que se compara la población a estudio con una población con menor prevalencia de infección como son los donantes de sangre. Por otro lado el diagnóstico de liquen plano no siempre es histológico y en la mayoría de los estudios no se hace referencia a otras posibles causas de dermatitis liquenoide como son los implantes dentales o los fármacos (antihipertensivos). La falta de homogeneidad en el diagnóstico de la infección por el VHC y del liquen plano podría explicar estas notables diferencias. Recientes estudios caso-control han demostrado una prevalencia de la infección en pacientes con liquen plano similar al grupo control.^{148, 154}

También el estudio de amplias series de pacientes con infección por el VHC no ha encontrado que la prevalencia de liquen plano sea superior a la población general aunque sí se ha demostrado una mayor frecuencia de otras manifestaciones cutáneas asociadas bien a la hepatopatía subyacente (prurito, púrpura por fragilidad capilar) o a la crioglobulinemia mixta (púrpura por vasculitis).⁸²

Nuestro grupo de investigación ha aportado interesantes hallazgos en el estudio del VHC en lesiones de liquen plano cutáneo y mucoso como ya se ha comentado previamente. En sujetos con infección por el VHC se ha detectado, mediante hibridación *in situ*, el RNA viral en las células epiteliales de la mucosa oral de pacientes con liquen plano así como en los que no presentaban patología mucosa alguna.¹⁴³ El porcentaje de células positivas para las cadenas positivas y negativas del virus estaba entre el 4.4%-14.3% en todas las biopsias de pacientes infectados independientemente de la presencia o no de lesiones de liquen. Sin embargo en el caso de liquen plano cutáneo el porcentaje de células infectadas era superior en la zona lesional comparado con los hallazgos en piel perilesional. Es posible que la sobreexpresión de receptores LDL en zonas de inflamación¹⁵⁵ facilite la entrada del virus y de esta forma se explicaría la diferente tasa de infección en los casos de liquen plano cutáneo.

En el caso del liquen plano mucoso es posible que existan otros receptores que no se encuentran en la piel y que permitirían la entrada del virus de forma más homogénea. Son necesarios más estudios para investigar ambas hipótesis.

Los autores que defienden un posible papel etiopatogénico del VHC en el desarrollo de las lesiones sugieren que la infección desencadenaría una respuesta autoinmune.¹⁵⁶ A favor de esta hipótesis están los hallazgos clínicos de desarrollo de novo o exacerbación de lesiones de liquen plano en pacientes con hepatopatía crónica por virus C que responden al tratamiento con interferón alfa.^{157, 158, 159, 160}

La gran heterogeneidad geográfica en la asociación de la infección por el VHC y liquen plano podría justificarse por factores que dependen más del huésped que del propio virus.

No obstante son necesarios estudios epidemiológicos más completos, evitando sesgos de selección y con diagnóstico histológico, no únicamente clínico de liquen plano, habiendo

descartado otras causas de reacciones liquenoides para definir mejor cualquier posible asociación.

6.2.2.2. *Porfiria cutánea tarda*

La porfiria cutánea tarda (PCT) es el trastorno más frecuente del metabolismo de las porfirinas.¹⁶¹ Existen dos formas, una familiar y otra esporádica. La forma familiar presenta una herencia autosómica dominante y se caracteriza por el déficit enzimático de uroporfirinógeno decarboxilasa en eritrocitos y hepatocitos.¹⁶²

En la forma esporádica sólo los hepatocitos presentan dicho déficit enzimático y son necesarios determinados factores para desencadenar las manifestaciones clínicas que se producen por fotoexposición.¹⁶³ Entre estos factores destacan el alcohol, fármacos (barbitúricos, carbamacepina, estrógenos, sulfamidas), sobrecarga por hierro y virus (HIV, hepatitis B y C). Se ha demostrado una elevada prevalencia de marcadores del VHC en pacientes con PCT esporádica (50-90%), especialmente en países del sur de Europa como Italia, Francia y España.¹⁶⁴⁻¹⁶⁹ En el norte de Europa se han descrito tasas de prevalencia inferiores, entre 8-18%, pero en cualquier caso superiores respecto a la población general.

170, 171

La gran variabilidad geográfica podría deberse a la distinta prevalencia de determinados genotipos que se identifican con más frecuencia en pacientes con PCT como es el caso del genotipo Ib.¹⁷²

La prevalencia de la infección por el VHC en pacientes con porfiria cutánea tarda es mayor en presencia de cirrosis. Esto también podría explicar las cifras más bajas de prevalencia en algunos estudios.⁸²

No parece que la elevada prevalencia de la infección en los casos de PCT se deba a procedimientos invasivos realizados a estos pacientes ya que un estudio no demostró asociación alguna entre la frecuencia de flebotomías y la prevalencia de la infección.¹⁶⁷ No obstante estos hallazgos requieren confirmación ya que múltiples procedimientos invasivos como en el caso de hemodializados sí que se asocian con un mayor riesgo de adquirir la infección.^{48, 49}

Actualmente se considera que la infección por el VHC actúa como factor desencadenante en el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la PCT en un sujeto genéticamente predispuesto y generalmente en fases avanzadas de la enfermedad. Los mecanismos etiopatogénicos no están del todo aclarados. El daño celular inducido por el VHC en el hígado daría lugar a una disminución de la actividad de la uroporfirinógeno decarboxilasa^{165, 173}, a una alteración del sistema de oxidasas dependiente del citocromo P450¹⁷³, a una respuesta autoinmune¹⁷⁴ y/o a una compartimentalización de los depósitos de hierro.¹⁶⁴ El resultado sería una alteración en el metabolismo de las porfirinas. No se han publicado sobre la presencia del VHC en la piel de pacientes con PCT.

6.2.2.3. *Psoriasis*

La prevalencia de la infección por el VHC en los pacientes con psoriasis varía entre 0-44% aunque son escasas las publicaciones a este respecto.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸

Hay que tener en cuenta que algunos casos descritos se desarrollan en pacientes que estaban en tratamiento con interferón alfa¹⁷⁸ y está ampliamente documentado que el tratamiento con interferón alfa, al igual que ocurre en el liquen plano, exagera o induce la aparición de novo de psoriasis.¹⁷⁹⁻¹⁸²

La detección del RNA viral en lesiones de psoriasis mediante PCR no indica que el VHC constituya una de las causas desencadenantes en la aparición de la enfermedad como sugieren algunos autores.¹⁸³ Un resultado positivo puede ser inespecífico por contaminación de la muestra con suero. Además el hallazgo de RNA viral en piel sana de pacientes con infección crónica realizado en el presente estudio demuestra que el hallazgo aislado del RNA viral en lesiones cutáneas carece de valor para justificar una posible relación etiopatogénica.

Recientes estudios con series amplias de pacientes con infección por el VHC no han encontrado mayor prevalencia de psoriasis respecto a la población general.⁸²

No existen estudios que evalúen la presencia del virus en lesiones de psoriasis mediante inmunohistoquímica o hibridación *in situ*.

6.2.2.4. Prurigo

El prurigo es una entidad infrecuente, de etiología desconocida que predomina en mujeres. Clínicamente se caracteriza por la presencia de lesiones pápulo-nodulares en la superficie de extensión de las extremidades, muy pruriginosas. Se han descrito casos aislados de prurigo asociado a la infección por el VHC.^{184, 185}

Sólo se ha publicado una serie amplia de pacientes con prurigo en los cuales se objetivó una prevalencia de la infección del 38% mediante EIA (enzyme immuno assay) y de 20% mediante PCR comparado con 5% en el grupo control.¹⁸⁶ Son necesarios más estudios para elucidar una posible asociación.

Se considera que el mecanismo subyacente sería, como en el caso de otras manifestaciones extrahepáticas la presencia de inmunocomplejos circulantes inducidos por el VHC.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶

En algunos casos se ha demostrado la presencia de anticuerpos antinucleares, aumento de inmunoglobulinas e hipocomplementemia^{184, 185} aunque estos hallazgos son frecuentes en pacientes con hepatopatía crónica por virus C.

6.2.2.5. Urticaria

La infección por el VHC se ha relacionado con casos de urticaria aguda¹⁸⁷ pero la mayor parte de las asociaciones descritas corresponden a pacientes con urticaria crónica. El 70% de los casos de urticaria crónica son idiopáticos.¹⁸⁸ Las tasas de prevalencia de la infección más elevadas en pacientes con urticaria crónica (24%) se describen en estudios realizados en Japón, donde la prevalencia de la infección por el VHC en algunas zonas es superior al 15% . Estos estudios presentan un sesgo de selección al analizar como grupo control a un gran número de sujetos que son donantes de sangre, lo cual no refleja la verdadera prevalencia de la infección en la población general.¹⁸⁹

Otros estudios, sin embargo, no han demostrado una mayor prevalencia de la infección por el VHC en pacientes con urticaria crónica respecto a la población general.¹⁹⁰⁻¹⁹³

En el momento actual se desestima la asociación entre la infección por el VHC y el desarrollo de urticaria crónica.

6.2.2.6. Vasculitis

6.2.2.6.1. Vasculitis por crioglobulinemia mixta

La manifestación extrahepática más frecuente de la infección por el VHC es la crioglobulinemia mixta. Los niveles de crioglobulinas no se asocian directamente con las manifestaciones clínicas ya que la mejoría que experimentan algunos pacientes tras el tratamiento con interferón alfa no se correlaciona con la desaparición de las crioglobulinas.⁸⁴ Además la mayor parte de los pacientes con crioglobulinemia mixta no presenta manifestaciones clínicas.⁷⁸

Mediante PCR se ha detectado mayor cantidad de RNA viral en el crioprecipitado de estos pacientes comparado con los niveles en suero.^{84, 194}

Mediante hibridación *in situ* como ya se ha comentado previamente se han detectado partículas virales en el endotelio, queratinocitos y epitelio ductal de piel afecta en pacientes con vasculitis por crioglobulinemia mixta e infección por el VHC.¹³⁸

En todos estos casos se detectaron las cadenas positivas (genómica) del virus. La señal de las cadenas positivas en la epidermis se localizaba preferentemente en las células suprabasales. Estas células son las que, precisamente en condiciones de inflamación, presentan el mayor grado de activación. En modelos experimentales de inflamación los niveles elevados de interleucina 1 alfa se asocian más con las células suprabasales que con las células basales.¹⁹⁵ Por otro lado la expresión de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en las células epiteliales se encuentra elevada en condiciones de inflamación como ya ha sido comentado previamente en la discusión sobre liquen plano.¹⁵⁵ A nivel de la dermis la señal de hibridación se localizaba alrededor de los vasos inflamados y en el epitelio ductal.

Únicamente en dos muestras se detectaron escasos acúmulos de la cadena negativa (antigenómica) a nivel de la epidermis y dermis. Estas dos muestras procedían de dos pacientes con los títulos más altos del VHC en suero. Según los autores estos hallazgos no implicarían que el virus se replica ya que consideran que los escasos acúmulos de la cadena negativa constituyen un producto intermedio de la elevada actividad replicativa en

el hígado.¹⁹⁶ No obstante no se puede descartar que las cadenas antigenómicas constituyan un marcador de replicación viral en esos casos.

No se detectó RNA del VHC en las células inflamatorias de las lesiones de vasculitis ni en las células endoteliales sin signos de inflamación. En una biopsia de piel normal que se obtuvo de uno de los pacientes estudiados no se detectó RNA viral posiblemente debido a la degradación parcial del RNA como ya se ha comentado previamente.

Nuestros resultados obtenidos por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica han sido superponibles. En ningún caso detectamos el VHC en las células endoteliales por lo cual no parece que el endotelio no inflamado constituya un lugar preferente de replicación viral comparado con otros tipos celulares como las células epiteliales. De esta forma es poco probable que la infección de las células endoteliales desencadene el daño tisular a través de la generación de anticuerpos o de células T sensibilizadas contra las mismas responsables de la producción de vasculitis.¹³⁴ Estos hallazgos sugieren más bien que en el contexto de una respuesta inflamatoria el VHC se acumularía en las células endoteliales mediante endocitosis a través de receptores expresados en la superficie de dichas células.¹³⁸ Otra posibilidad es que complejos de alto peso molecular (crioglobulinas, IgG y antígenos del VHC) iniciasen la activación de las células endoteliales dando lugar a un aumento de la permeabilidad vascular e infiltración de neutrófilos que permitiría la formación de inmunocomplejos *in situ* y la continuidad del daño vascular.¹³⁸

6.2.2.6.2. *Periarteritis nodosa sistémica*

La periarteritis nodosa sistémica (PAN) es otra entidad donde se ha demostrado una elevada prevalencia de anticuerpos frente al VHC. Es conveniente determinar el RNA viral en el suero de estos pacientes ya que se ha demostrado que un elevado número de casos de periarteritis nodosa sistémica con serología positiva para el VHC realizado por EIA (enzyme immuno assay) corresponden a falsos positivos (por hipergammaglobulinemia o factor reumatoide) cuando se realizan pruebas de confirmación mediante RIBA de segunda generación y PCR.¹⁰³

En la PAN sistémica se detectan con frecuencia crioglobulinas mixtas. Este hallazgo no

debe inducir a error en el diagnóstico de las vasculitis sistémicas que ocurren en pacientes con infección por el VHC. La vasculitis asociada a CM y la PAN sistémica presentan datos clínicos, histológicos y evolutivos que permiten diferenciarlas a pesar del hallazgo común de crioglobulinas mixtas.^{197, 194} Varios casos de vasculitis sistémicas de curso agresivo catalogadas como vasculitis asociada a CM corresponderían en realidad a casos de PAN sistémica.¹⁹⁸

La PAN es una entidad infrecuente y el mecanismo de producción subyacente parece deberse a la formación de inmunocomplejos. Como se ha reseñado anteriormente y en base a los resultados obtenidos del estudio de la vasculitis por CM, la infección de las células endoteliales no parece ser el mecanismo inicial en el desarrollo de las lesiones de vasculitis. Estos hallazgos indican que la presencia de receptores que se sobreexpresan en condiciones de inflamación permiten la entrada del VHC en determinados tipos celulares como las células endoteliales y aumentan la carga viral en células epiteliales. No existen estudios sobre la presencia del VHC en lesiones de vasculitis o piel sana de pacientes con periarteritis nodosa.

Los estudios sobre la prevalencia de la infección por el VHC en dermatosis inflamatorias apuntan hacia una posible relación etiopatogénica. Esto explica el mayor número de publicaciones sobre dermatosis inflamatorias de etiología desconocida como el liquen plano, la psoriasis, el prurigo, la urticaria crónica y las vasculitis en comparación con otras dermatosis como el eccema crónico donde se identifican con mayor facilidad los factores desencadenantes o etiológicos.

En regiones con baja prevalencia de infección, la ausencia de una asociación estadísticamente significativa plantea dudas sobre el posible papel etiopatogénico de la infección crónica en el desarrollo de ciertas patologías. En estudios caso-control es importante, especialmente en regiones con alta prevalencia de la infección por el VHC, que el grupo control proceda del mismo lugar que el grupo a estudio y que no exista un gran desfase temporal en la selección de ambos grupos. Esto evitará los sesgos de selección que tienden a sobreestimar la asociación entre la infección por el VHC y determinadas enfermedades cutáneas.

6.3. Detección del virus de la hepatitis C en glándulas secretoras y sudor

6.3.1. Generalidades

6.3.1.1. Glándulas sebáceas

La glándula sebácea forma parte del complejo pilosebáceo y se distribuye por toda la superficie corporal excepto en palmas y plantas. Su epitelio está constituido por células en distintos estadios de maduración. Las células periféricas son las que se replican y carecen de lípidos. Las células que se encuentran más cerca de la luz glandular son anucleadas y con gran número de gotas lipídicas. La secreción de la glándula sebácea es holocrina. Esto implica que en el momento de la secreción las células más diferenciadas se destruyen y junto con su contenido son expulsadas a la luz glandular.

El sebo se compone de lípidos neutros (colesterol y sus ésteres, escualeno, ésteres de cera y triglicéridos). Las proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos de membrana se digieren y posteriormente se reciclan durante la desintegración de las células. Durante su paso a través del conducto pilosebáceo los triglicéridos son parcialmente hidrolizados a ácidos grasos libres por enzimas de origen bacteriano. En los conductos pilosebáceos se encuentran las especies que forman parte de la flora de la piel, sobre todo levaduras y especies de *Propionobacterium*.¹⁹⁹

La ausencia de señal en la capa basal del epitelio glandular podría explicarse por la ausencia de factores de crecimiento que requiere el virus de la hepatitis C para su replicación. Estos factores se encuentran fundamentalmente en las células diferenciadas como corresponde a las de los estratos superiores del epitelio glandular. La secreción sebácea podría contener partículas víricas al igual que se ha demostrado en el sudor. Sin embargo existen otras variables que impiden confirmar esta hipótesis. En primer lugar el sebo contiene microorganismos productores de enzimas que podrían inactivar al virus. En segundo lugar existen dificultades técnicas para evaluar la secreción sebácea de forma aislada.

6.3.1.2. Glándulas sudoríparas

Existen dos tipos de glándulas sudoríparas, las glándulas sudoríparas ecrinas que están distribuidas por toda la superficie corporal pero con predilección en palmas y plantas y las glándulas sudoríparas apocrinas que se localizan en axilas y periné. Centraremos la discusión en las primeras.

La glándula sudorípara ecrina se compone de dos segmentos, una espiral secretora y un conducto. Cada segmento está formado por distintos tipos celulares. La espiral secretora presenta tres tipos celulares: células claras, células pardas y células mioepiteliales. Las células claras se encuentran en la periferia y se encargan de la secreción de agua y electrolitos. Las células pardas o mucoides se encuentran cerca de la luz de los conductos secretores y son las responsables de la secreción de glicoproteínas. El conducto ecrino se compone de células periféricas o basales y células internas o cuticulares. Las células basales están implicadas en la reabsorción activa de sodio y las células cuticulares aportan elasticidad estructural a la luz ductal.²⁰⁰

En los cortes seriados no hemos podido mostrar la presencia del conducto intraepidérmico (acrosiringio). A nivel de la dermis hemos demostrado la presencia de señal de hibridación así como tinción positiva para la proteína del core en el ovillo glandular basal que engloba la espiral secretora y el conducto excretor intradérmico. Mediante hibridación *in situ* detectamos el RNA-VHC genómico en todas las biopsias estudiadas pero en un porcentaje bastante inferior comparado con los hallazgos en las glándulas salivales: $9.6 \pm 5.2\%$ y $37.1 \pm 8.1\%$, respectivamente. Conviene destacar que en este trabajo se estudiaron glándulas sudoríparas de piel sana en contraposición al estudio de glándulas salivales de pacientes con xerostomía (sialoadenitis crónica o síndrome de Sjögren).¹²

La presencia de inflamación crónica con la consiguiente sobreexpresión de receptores LDL¹⁵⁵ u otros posibles co-receptores del virus podría haber facilitado la entrada del virus. Por otro lado el porcentaje de células positivas en las glándulas sudoríparas para la cadena genómica era superior al de la cadena antigenómica ($9.6 \pm 5.2\%$ vs $4.2 \pm 3.8\%$). Estos resultados difieren de los observados en las glándulas salivales donde prácticamente todas las células que presentaban la cadena genómica eran también positivas para la cadena

antigenómica.¹² En el momento actual no podemos aportar ninguna explicación para justificar estas diferencias. Podría deberse a la existencia de variantes del VHC con diferente tropismo por las glándulas sudoríparas o glándulas salivales. Otra hipótesis sería la existencia de factores celulares que permitirían una replicación viral más eficiente en las glándulas salivales que en las sudoríparas ecrinas. Son necesarios más estudios para investigar ambas hipótesis.

6.3.1.3. *Sudor*

El sudor está compuesto principalmente por iones inorgánicos (sodio, cloro, potasio y bicarbonato), lactato y amonía.^{201, 202} También se han aislado glicoproteínas y proteasas que disocian los enlaces de cisteína así como sus inhibidores endógenos.²⁰³

La presencia del RNA viral en el sudor ha sido previamente demostrada mediante PCR aunque no se determinaron las características de las partículas virales.²⁰⁴ En nuestro estudio detectamos que el genoma viral se encontraba encapsidado.

La presencia del virus en el sudor demuestra que, al igual que ocurre en las glándulas salivales, el virus de la hepatitis C tiene capacidad no sólo de infectar el epitelio si no de ser incorporado en la secreción glandular. Al contrario que la saliva que posee enzimas capaces de inactivar el virus, el sudor carece de estas moléculas. Las enzimas detectadas en el sudor que disocian los puentes disulfuro no parecen afectar la integridad del virus. Estos hallazgos sugieren que el virus no es degradado por las enzimas presentes en el sudor y que en teoría tendría capacidad de infectar otras células una vez que alcanzase la superficie cutánea. Son necesarios estudios *in vitro* para valorar la capacidad infectiva del virus presente en el sudor.

6.3.2. Vías de transmisión parenteral inaparentes

Según las distintas series en un 10-70% de los pacientes con infección por el VHC no se identifica ninguna vía de contagio aparente.^{44, 46, 50, 205-209} Ante estos hallazgos se piensa que la vía de contagio en muchos de estos casos es por transmisión parenteral inaparente a través de pequeñas erosiones cutáneas y mucosas.

La prevalencia de la infección entre contactos íntimos que no implican relación sexual varía entre el 0.7% en Europa occidental y América del Norte^{207, 210-213} y el 4% en el sur de Europa y Asia.²¹⁴⁻²²⁰ Una reciente revisión demostró que existía una homología concordante para el genotipo en el 66% y 74% de los contactos no sexuales y sexuales, respectivamente.²²¹

Se ha demostrado que el RNA viral es resistente a la desecación a temperatura ambiente durante al menos 48 horas.²²² Este dato es relevante considerando la posibilidad de transmisión a través de fluidos biológicos como la sangre, la saliva y el sudor.

Las soluciones de continuidad en la mucosa nasal provocadas por laceración con material contaminado podrían constituir una vía de transmisión parenteral inaparente en pacientes que consumen cocaína ya que esta práctica se ha identificado como un factor de riesgo independiente asociado a la infección por el VHC.²²³

El virus se ha aislado en la saliva^{224, 225} y en el sudor de pacientes infectados. Se ha logrado transmitir la infección a chimpancés mediante la inoculación de saliva de pacientes infectados.²²⁶

No existen trabajos en los que se haya cuantificado el título de RNA viral en saliva aunque presumiblemente sea bastante inferior al del suero como hemos demostrado en el caso del sudor. El bajo título viral presente en el sudor comparado con muestras correlativas en suero explicaría la escasa eficiencia de transmisión en contactos íntimos no sexuales.^{227, 228}

^{225 229}

La transmisión parenteral inaparente podría constituir una vía de contagio más significativa en el caso de pacientes con dermatosis que cursen con solución de integridad epidérmica.

En el estudio de posibles factores de riesgo en pacientes con infección por el VHC no se suelen investigar antecedentes de enfermedades inflamatorias cutáneas (eccema crónico de

manos, psoriasis). Sin embargo un estudio publicado hace dos décadas investigó la prevalencia de marcadores del virus de la hepatitis B (VHB) en pacientes con eccema y psoriasis de las manos. Se demostró una prevalencia más alta de positividad para alguno de los marcadores del VHB en el grupo a estudio comparado con el grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.²³⁰

Por otro lado en el estudio sistemático de un paciente dermatológico se tiende a investigar la posible infección por el VHC en aquellos que presentan entidades de etiología desconocida en las cuales se ha demostrado una asociación estadística con la infección crónica (liquen plano, vasculitis, urticaria crónica, prurigo, psoriasis).

Ya ha sido reseñada previamente la elevada prevalencia de la infección en enfermedades como la psoriasis que cursan de forma crónica con alteraciones de la integridad epidérmica y donde no se ha demostrado una relación etiopatogénica con la infección crónica por el VHC.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸ En este tipo de pacientes no se puede descartar que hayan contraído la infección a través de una vía parenteral inaparente, máxime cuando no se identifican otros factores de riesgo.

Estos resultados llevan a considerar la secreción sudorípara como un fluido susceptible de ser infectivo en determinadas circunstancias. Un posible contagio a través del sudor podría ser el responsable en ciertos casos de transmisión por vía parenteral inaparente tras exposiciones repetidas especialmente en zonas con una alta prevalencia de la infección como Egipto, Japón y el sur de Europa.

En base a nuestros datos no parece factible la transmisión del virus a través de la epidermis intacta ya que no se han detectado partículas virales en la capa córnea y ésta junto con los folículos pilosebáceos constituyen una excelente barrera físico-química frente a agentes externos. En base a estudios epidemiológicos se considera que el contagio a través de la vía parenteral inaparente por fluidos biológicos no es una vía de transmisión muy eficaz pero podría ser notable en pacientes con dermatosis inflamatorias crónicas que presentan soluciones de continuidad epidérmica.

7. CONCLUSIONES

1. El virus de la hepatitis C está presente en la piel sana de todos los pacientes con hepatopatía crónica por virus C sin patología cutánea asociada que fueron estudiados (n=15).
 - A) El virus de la hepatitis C presenta tropismo únicamente por las células epiteliales de la epidermis y de las glándulas sebáceas y sudoríparas. El porcentaje de infección no es superior al 12%.
 - B) La detección de la cadena antigenómica del virus sugiere que el virus es capaz de replicarse en las células infectadas.
 - C) Las células infectadas no muestran alteraciones morfológicas en el estudio con microscopía convencional.
 - D) Únicamente se ha demostrado una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre el porcentaje de células epiteliales de las glándulas sudoríparas con señal positiva para la cadena genómica del virus y la viremia.

2. El virus de la hepatitis C se detecta en el sudor.
 - A) El genoma viral se ha detectado en el sudor de todos los pacientes con RNA-VHC en suero estudiados (n=12). La concentración del virus en el sudor es 10-100 veces menor que en el suero.
 - B) El genoma viral se excreta en el sudor en forma encapsidada.
 - C) No existe correlación entre la concentración del virus en el sudor y la concentración del virus en el suero.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
2. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; 88: 773-779.
3. Horzinek MC. Pestiviruses--taxonomic perspectives. *Arch Virol Suppl* 1991; 3: 1-5.
4. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2451-2455.
5. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborcht B, Van Heuverswyn H, Maertens G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74: 1093-1102.
6. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-2399.
7. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-63.
8. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282: 103-107.
9. Katz RA, Skalka AM. Generation of diversity in retroviruses. *Annu Rev Genet* 1990; 24: 409-445.
10. Zignego AL, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti M, Foschi M, Maggi E, Romagnani S, Gentilini P, Brechot C. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 1992; 15: 382-386.
11. Lerat H, Berby F, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspe G. Specific

detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 845-851.

12. Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolome J, Pardo M, Manzarbeitia F, Oliva H, Macias DM, Carreno V. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 2001; 158: 259-264.

13. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative- strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 1998; 28: 1398-1401.

14. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. The presence of active hepatitis C virus replication in lymphoid tissue in patients coinfectd with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1998; 178: 1189-1192.

15. Zibert A, Schreier E, Roggendorf M. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* 1995; 208: 653-661.

16. Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzera A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 15394-15399.

17. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941.

18. Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 89-109.

19. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181: 293-300.

20. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other

flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12766-12771.

21. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 17-35.

22. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10: 439-449.

23. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191: 1499-1512.

24. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000; 6: 578-582.

25. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T- cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117: 933-941.

26. Eyster ME, Diamondstone LS, Lien JM, Ehmann WC, Quan S, Goedert JJ. Natural history of hepatitis C virus infection in multitransfused hemophiliacs: effect of coinfection with human immunodeficiency virus. The Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6: 602-610.

27. Kao JH, Chen PJ, Wang JT, Yang PM, Lai MY, Wang TH, Chen DS. Superinfection by homotypic virus in hepatitis C virus carriers: studies on patients with post-transfusion hepatitis. *J Med Virol* 1996; 50: 303-308.

28. Sheu JC, Wang JT, Wang TH, Wang CY, Yang PM, Huang GT, Shih LN, Lee HS, Chen DS. Prevalence of hepatitis C viral infection in a community in Taiwan. Detection by synthetic peptide-based assay and polymerase chain reaction. *J Hepatol* 1993; 17: 192-198.

29. Kiyosawa K, Tanaka E, Sodeyama T, Yoshizawa K, Yabu K, Furuta K, Imai H,

- Nakano Y, Usuda S, Uemura K, et al. Transmission of hepatitis C in an isolated area in Japan: community- acquired infection. The South Kiso Hepatitis Study Group. *Gastroenterology* 1994; 106: 1596-1602.
30. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 5-14.
31. Kamel MA, Ghaffar YA, Wasef MA, Wright M, Clark LC, Miller FD. High HCV prevalence in Egyptian blood donors. *Lancet* 1992; 340: 427.
32. Quinti I, el-Salman D, Monier MK, Hackbart BG, Darwish MS, el-Zamiaty D, Paganelli R, Pandolfi F, Arthur RR. HCV infection in Egyptian patients with acute hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2017-2023.
33. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, El Khoby T, Abdel-Wahab Y, Aly Ohn ES, Anwar W, Sallam I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 2000; 355: 887-891.
34. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341: 556-562.
35. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 1-16.
36. Farrell GC, Weltman M, Dingley J, Lin R. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *Gastroenterol Jpn* 1993; 28 Suppl 5: 32-36.
37. Tanaka E, Kiyosawa K, Sodeyama T, Hayata T, Ohike Y, Nakano Y, Yoshizawa K, Furuta S, Watanabe Y, Watanabe J, et al. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in Japanese schoolchildren: comparison with adult blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 460-464.
38. Stroffolini T, Menchinelli M, Taliani G, Dambruoso V, Poliandri G, Bozza A, Lecce R, Clementi C, Ippolito FM, Compagnoni A, et al. High prevalence of hepatitis C virus infection in a small central Italian town: lack of evidence of parenteral exposure. *Ital J Gastroenterol* 1995; 27: 235-238.
39. Ishibashi M, Shinzawa H, Kuboki M, Tsuchida H, Takahashi T. Prevalence of

inhabitants with anti-hepatitis C virus antibody in an area following an acute hepatitis C epidemic: age-and area-related features. *J Epidemiol* 1996; 6: 1-7.

40. Guadagnino V, Stroffolini T, Rapicetta M, Costantino A, Kondili LA, Menniti-Ippolito F, Caroleo B, Costa C, Griffo G, Loiacono L, Pisani V, Foca A, Piazza M. Prevalence, risk factors, and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. *Hepatology* 1997; 26: 1006-1011.

41. Abdel-Wahab MF, Zakaria S, Kamel M, Abdel-Khaliq MK, Mabrouk MA, Salama H, Esmat G, Thomas DL, Strickland GT. High seroprevalence of hepatitis C infection among risk groups in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 563-567.

42. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.

43. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996; 334: 1685-1690.

44. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Moyer LA, Fields HA, Bradley DW, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *Jama* 1990; 264: 2231-2235.

45. Donahue JG, Nelson KE, Munoz A, Vlahov D, Rennie LL, Taylor EL, Saah AJ, Cohn S, Odaka NJ, Farzadegan H. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 1206-1211.

46. Kelen GD, Green GB, Purcell RH, Chan DW, Qaqish BF, Sivertson KT, Quinn TC. Hepatitis B and hepatitis C in emergency department patients. *N Engl J Med* 1992; 326: 1399-1404.

47. Holsen DS, Harthug S, Myrmel H. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus and association with intravenous drug abuse and tattooing in a national prison in Norway. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 673-676.

48. Niu MT, Coleman PJ, Alter MJ. Multicenter study of hepatitis C virus infection in

chronic hemodialysis patients and hemodialysis center staff members. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 568-573.

49. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Brezina M, Russell J, Conrad A, Schmid P, Gerosa S, Gitnick G. Detection of de novo hepatitis C virus infection by polymerase chain reaction in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 1999; 19: 383-388.

50. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995; 171: 1607-1610.

51. Chiaramonte M, Stroffolini T, Lorenzoni U, Minniti F, Conti S, Floreani A, Ntakirutimana E, Vian A, Ngatchu T, Naccarato R. Risk factors in community-acquired chronic hepatitis C virus infection: a case-control study in Italy. *J Hepatol* 1996; 24: 129-134.

52. El-Ray A, Romeih M, Saber M. Reuse of disposable variceal injection sclerotherapy needles and risk of hepatitis C virus transmission. *Endoscopy* 2001; 33: 816-817.

53. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, Monhoven N, Gastin I, Chone L, Hudziak H, Rihn B, Delanoe C, LeFaou A, Bigard MA, Gaucher P, Rhin B. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997; 337: 237-240.

54. Esteban JI, Gomez J, Martell M, Cabot B, Quer J, Camps J, Gonzalez A, Otero T, Moya A, Esteban R, et al. Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med* 1996; 334: 555-560.

55. Ross RS, Viazov S, Gross T, Hofmann F, Seipp HM, Roggendorf M. Transmission of hepatitis C virus from a patient to an anesthesiology assistant to five patients. *N Engl J Med* 2000; 343: 1851-1854.

56. Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Levey AS. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 1991; 325: 454-460.

57. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77: 214-224.

58. Panlilio AL, Shapiro CN, Schable CA, Mendelson MH, Montecalvo MA, Kunches

- LM, Perry SW, 3rd, Edwards JR, Srivastava PU, Culver DH, et al. Serosurvey of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infection among hospital-based surgeons. Serosurvey Study Group. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 16-24.
59. Shapiro CN, Tokars JI, Chamberland ME. Use of the hepatitis-B vaccine and infection with hepatitis B and C among orthopaedic surgeons. The American Academy of Orthopaedic Surgeons Serosurvey Study Committee. *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78: 1791-1800.
60. Thomas DL, Gruninger SE, Siew C, Joy ED, Quinn TC. Occupational risk of hepatitis C infections among general dentists and oral surgeons in North America. *Am J Med* 1996; 100: 41-45.
61. Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Yamazaki C, Okamoto H, Tsuda F, Tanaka T, Mishiro S. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology* 1992; 16: 1109-1114.
62. Polish LB, Tong MJ, Co RL, Coleman PJ, Alter MJ. Risk factors for hepatitis C virus infection among health care personnel in a community hospital. *Am J Infect Control* 1993; 21: 196-200.
63. Lanphear BP. Trends and patterns in the transmission of bloodborne pathogens to health care workers. *Epidemiol Rev* 1994; 16: 437-450.
64. Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control* 1995; 23: 273-277.
65. Sartori M, La Terra G, Aglietta M, Manzin A, Navino C, Verzetti G. Transmission of hepatitis C via blood splash into conjunctiva. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 270-271.
66. Ippolito G, Puro V, Petrosillo N, De Carli G, Micheloni G, Magliano E. Simultaneous infection with HIV and hepatitis C virus following occupational conjunctival blood exposure. *Jama* 1998; 280: 28.
67. Yeung LT, King SM, Roberts EA. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 2001; 34: 223-229.
68. Thomas DL, Villano SA, Riester KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH,

- Hollinger FB, Davenny K, Riley L, Diaz C, Tang HB, Quinn TC. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 1998; 177: 1480-1488.
69. Granovsky MO, Minkoff HL, Tess BH, Waters D, Hatzakis A, Devoid DE, Landesman SH, Rubinstein A, Di Bisceglie AM, Goedert JJ. Hepatitis C virus infection in the mothers and infants cohort study. *Pediatrics* 1998; 102: 355-359.
70. Manzini P, Saracco G, Cerchier A, Riva C, Musso A, Ricotti E, Palomba E, Scolfaro C, Verme G, Bonino F, et al. Human immunodeficiency virus infection as risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission; persistence of anti-hepatitis C virus in children is associated with the mother's anti-hepatitis C virus immunoblotting pattern. *Hepatology* 1995; 21: 328-332.
71. Kumar RM, Shahul S. Role of breast-feeding in transmission of hepatitis C virus to infants of HCV-infected mothers. *J Hepatol* 1998; 29: 191-197.
72. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV, Quinn TC. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995; 171: 768-775.
73. Dienstag JL. Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 66S-70S.
74. Buscarini E, Tanzi E, Zanetti AR, Savi E, Sbolli G, Civardi G, Di Stasi M, Fornari F, Buscarini L. High prevalence of antibodies to hepatitis C virus among family members of patients with anti-HCV-positive chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 343-346.
75. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 21S-28S.
76. Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, Donato MF, Piva A, Di Carlo V, Dioguardi N. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 675-680.
77. Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, Kumada H, Kawanishi M. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 47-53.

78. Lunel F, Musset L, Cacoub P, Frangeul L, Cresta P, Perrin M, Gripon P, Hoang C, Valla D, Piette JC, et al. Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage. *Gastroenterology* 1994; 106: 1291-1300.
79. Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Duvoux C, Zafrani ES, Duval J, et al. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 1994; 19: 841-848.
80. Buskila D, Shnaider A, Neumann L, Lorber M, Zilberman D, Hilzenrat N, Kuperman OJ, Sikuler E. Musculoskeletal manifestations and autoantibody profile in 90 hepatitis C virus infected Israeli patients. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 28: 107-113.
81. Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, Mellor J, Ben Yahia MB, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Zafrani ES, Duval J, et al. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. *Ann Intern Med* 1995; 122: 169-173.
82. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti V, Yamamoto AM, Camproux AC, Hausfater P, Musset L, Veyssier P, Raguin G, Piette JC. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatitis C. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 47-56.
83. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974; 57: 775-788.
84. Levey JM BB, Banner B, Kuhns M, Malhotra R, Whitman N, Romain PL, Cropley TG, Bonkovsky HL. Mixed cryoglobulinemia in chronic hepatitis C infection. *Medicine (Baltimore)* 1994; 73: 53-67.
85. Misiani R, Bellavita P, Fenili D, Borelli G, Marchesi D, Massazza M, Vendramin G, Comotti B, Tanzi E, Scudeller G, et al. Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1992; 117: 573-577.
86. Marcellin P, Descamps V, Martinot-Peignoux M, Larzul D, Xu L, Boyer N, Pham BN, Crickx B, Guillevin L, Belaich S, et al. Cryoglobulinemia with vasculitis associated with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 272-277.

87. Daoud MS, el-Azhary RA, Gibson LE, Lutz ME, Daoud S. Chronic hepatitis C, cryoglobulinemia, and cutaneous necrotizing vasculitis. Clinical, pathologic, and immunopathologic study of twelve patients. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 219-223.
88. Dupin N, Chosidow O, Lunel F, Cacoub P, Musset L, Cresta P, Frangeul L, Piette JC, Godeau P, Opolon P. Essential mixed cryoglobulinemia. A comparative study of dermatologic manifestations in patients infected or noninfected with hepatitis C virus. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1124-1127.
89. Zignego AL, Ferri C, Giannini C, La Civita L, Careccia G, Longombardo G, Bellesi G, Caracciolo F, Thiers V, Gentilini P. Hepatitis C virus infection in mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol* 1997; 142: 545-555.
90. Vallisa D, Berte R, Rocca A, Civardi G, Giangregorio F, Ferrari B, Sbolli G, Cavanna L. Association between hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphoma, and effects of viral infection on histologic subtype and clinical course. *Am J Med* 1999; 106: 556-560.
91. Pena LR, Nand S, De Maria N, Van Thiel DH. Hepatitis C virus infection and lymphoproliferative disorders. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1854-1860.
92. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Font J. Sjogren's syndrome and hepatitis C virus. *Clin Rheumatol* 1999; 18: 93-100.
93. Cardinali C, Gerlini G, Caproni M, Pimpinelli N, Fabbri P. Hepatitis C virus: a common triggering factor for both nodular vasculitis and Sjogren's syndrome? *Br J Dermatol* 2000; 142: 187-189.
94. Cervoni E. High prevalence of hepatitis C antibody and RNA in patients with Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29: 266.
95. Loustaud-Ratti V, Riche A, Liozon E, Labrousse F, Soria P, Rogez S, Babany G, Delaire L, Denis F, Vidal E. Prevalence and characteristics of Sjogren's syndrome or Sicca syndrome in chronic hepatitis C virus infection: a prospective study. *J Rheumatol* 2001; 28: 2245-2251.
96. Ueda T, Ohta K, Suzuki N, Yamaguchi M, Hirai K, Horiuchi T, Watanabe J, Miyamoto T, Ito K. Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies

to hepatitis C virus. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 266-268.

97. Ferri C, La Civita L, Fazzi P, Solfanelli S, Lombardini F, Begliomini E, Monti M, Longombardo G, Pasero G, Zignego AL. Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 360-365.

98. Aisa Y, Yokomori H, Kashiwagi K, Nagata S, Yanagisawa R, Takahashi M, Hasegawa H, Tochikubo Y. Polymyositis, pulmonary fibrosis and malignant lymphoma associated with hepatitis C virus infection. *Intern Med* 2001; 40: 1109-1112.

99. Lin RY, Caren CB, Menikoff H. Hypocomplementaemic urticarial vasculitis, interstitial lung disease and hepatitis C. *Br J Dermatol* 1995; 132: 821-823.

100. Theilmann L, Gmelin K, Kallinowski B, Kommerell B, Koderisch J, Andrassy K. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in sera from patients with systemic necrotizing vasculitis. *Nephron* 1991; 57: 482.

101. Quint L, Deny P, Guillevin L, Granger B, Jarrousse B, Lhote F, Scavizzi M. Hepatitis C virus in patients with polyarteritis nodosa. Prevalence in 38 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 253-257.

102. Cacoub P, Lunel-Fabiani F, Du LT. Polyarteritis nodosa and hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 1992; 116: 605-606.

103. Carson CW, Conn DL, Czaja AJ, Wright TL, Brecher ME. Frequency and significance of antibodies to hepatitis C virus in polyarteritis nodosa. *J Rheumatol* 1993; 20: 304-309.

104. Soufir N, Descamps V, Crickx B, Thibault V, Cosnes A, Becherel PA, Wolkenstein P, Bournerias I, De La Salmoniere P, Picard C, Roujeau JC, Piette JC, Belaich S, Revuz J, Frances C. Hepatitis C virus infection in cutaneous polyarteritis nodosa: a retrospective study of 16 cases. *Arch Dermatol* 1999; 135: 1001-1002.

105. Fernandez-Soto L, Gonzalez A, Escobar-Jimenez F, Vazquez R, Ocete E, Olea N, Salmeron J. Increased risk of autoimmune thyroid disease in hepatitis C vs hepatitis B before, during, and after discontinuing interferon therapy. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1445-1448.

106. Morisco F, Mazziotti G, Rotondi M, Tuccillo C, Iasevoli P, Del Buono A, Sorvillo F,

- Amato G, Marmo R, Caporaso N, Carella C. Interferon-related thyroid autoimmunity and long-term clinical outcome of chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 247-253.
107. Pawlotsky JM, Bouvier M, Fromont P, Deforges L, Duval J, Dhumeaux D, Bierling P. Hepatitis C virus infection and autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Hepatol* 1995; 23: 635-639.
108. Linares M, Pastor E, Hernandez F, Montagud M, Blanquer A. Autoimmune thrombocytopenia and hepatitis C virus infection. *Am J Hematol* 1996; 53: 284.
109. Hernandez F, Blanquer A, Linares M, Lopez A, Tarin F, Cervero A. Autoimmune thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection. *Acta Haematol* 1998; 99: 217-220.
110. Wilson SE, Lee WM, Murakami C, Weng J, Moninger GA. Mooren's corneal ulcers and hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; 329: 62.
111. Chia SC, Bergasa NV, Kleiner DE, Goodman Z, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Pruritus as a presenting symptom of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2177-2183.
112. Dega H, Frances C, Dupin N, Lebre C, Simantov A, Callot C, Laporte JL, Blot C, Opolon P, Poynard T, Chosidow O. [Pruritus and the hepatitis C virus. The MULTIVIRC Unit]. *Ann Dermatol Venereol* 1998; 125: 9-12.
113. Cribier B, Samain F, Vetter D, Heid E, Grosshans E. Systematic cutaneous examination in hepatitis C virus infected patients. *Acta Derm Venereol* 1998; 78: 355-357.
114. Bonacini M. Pruritus in patients with chronic human immunodeficiency virus, hepatitis B and C virus infections. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 621-625.
115. Cribier B, Santinelli F, Schmitt C, Stoll-Keller F, Grosshans E. Should patients with pruritus be tested for hepatitis C virus infection? A case-controlled study. *Br J Dermatol* 2000; 142: 1249-1250.
116. Ghent CN. Pruritus of cholestasis is related to effects of bile salts on the liver, not the skin. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 117-118.
117. Jones EA, Bergasa NV. The pruritus of cholestasis: from bile acids to opiate agonists. *Hepatology* 1990; 11: 884-887.
118. Antinori S, Esposito R, Aliprandi CA, Tadani G. Erythema multiforme and hepatitis

C. Lancet 1991; 337: 428.

119. Calista D, Landi G. Lichen planus, erythema nodosum, and erythema multiforme in a patient with chronic hepatitis C. *Cutis* 2001; 67: 454-456.

120. Domingo P, Ris J, Martinez E, Casas F. Erythema nodosum and hepatitis C. *Lancet* 1990; 336: 1377.

121. Gillet-Terver MN, Modiano P, Gogolewski S, Gaucher P, Schmutz JL. [Erythema nodosum disclosing chronic active hepatitis C]. *Presse Med* 1995; 24: 1221.

122. Bodokh I, Lacour JP, Perrin C, Rainero C, Lebreton E, Grosshan E, Ortonne JP. [Cutaneous malacoplakia associated with chronic hepatitis caused by hepatitis C virus]. *Ann Dermatol Venereol* 1993; 120: 808-810.

123. Mazzone A, Stefano G, Chiara C. "Hemangioidermatitis" associated with chronic hepatitis C virus infection. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 1124-1125.

124. Keane FM, MacFarlane CS, Munn SE, Higgins EM. Pyoderma gangrenosum and hepatitis C virus infection. *Br J Dermatol* 1998; 139: 924-925.

125. Mizukawa Y, Shiohara T. Porokeratosis in patients with hepatitis C virus infection: does hepatitis C virus infection provide a link between porokeratosis and immunosuppression? *Br J Dermatol* 1999; 141: 163-164.

126. McKiernan S, Pilkington R, Ramsay B, Walsh A, Sweeney E, Kelleher D. Primary cutaneous B-cell lymphoma: an association of chronic hepatitis C infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 669-672.

127. Prati D, Zanella A, De Mattei C, Farma E, Boschetti C, Sirchia G, Venegoni L, Berti E. Chronic hepatitis c virus infection and primary cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 1999; 105: 841.

128. Yamamoto T, Nishioka K. Vitiligo vulgaris associated with hepatitis C virus. *J Dermatol* 2000; 27: 416-417.

129. Kontochristopoulos GJ, Aroni K, Anagnostopoulos G, Nakopoulou L, Tassopoulos NC. Erythema dyschromicum perstans and hepatitis C virus infection. *Int J Dermatol* 2001; 40: 346-348.

130. Mangia A, Andriulli A, Zenarola P, Lomuto M, Cascavilla I, Quadri R, Negro F. Lack

of hepatitis C virus replication intermediate RNA in diseased skin tissue of chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 1999; 59: 277-280.

131. Madejon A, Manzano ML, Arocena C, Castillo I, Carreno V. Effects of delayed freezing of liver biopsies on the detection of hepatitis C virus RNA strands. *J Hepatol* 2000; 32: 1019-1025.

132. Agnello V, Abel G, Knight GB, Muchmore E. Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28: 573-584.

133. Rodriguez-Inigo E, Bartolome J, de Lucas S, Manzarbeitia F, Pardo M, Arocena C, Gosalvez J, Oliva H, Carreno V. Histological damage in chronic hepatitis C is not related to the extent of infection in the liver. *Am J Pathol* 1999; 154: 1877-1881.

134. Sansonno D, Cornacchiulo V, Iacobelli AR, Di Stefano R, Lospalluti M, Dammacco F. Localization of hepatitis C virus antigens in liver and skin tissues of chronic hepatitis C virus-infected patients with mixed cryoglobulinemia. *Hepatology* 1995; 21: 305-312.

135. Krawczynski K, Beach MJ, Bradley DW, Kuo G, di Bisceglie AM, Houghton M, Reyes GR, Kim JP, Choo QL, Alter MJ. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 1992; 103: 622-629.

136. Sansonno D CV, Iacobelli AR, Lauletta G, Dammacco F. Immunodetection of hepatitis C virus (HCV)-related antigens in tissues: problems and perspective. En: *Liver pathophysiology*. Dianzani MU GP. Amsterdam, Elsevier Science: 1994, 117-128.

137. Gowans EJ. Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 85-102.

138. Agnello V, Abel G. Localization of hepatitis C virus in cutaneous vasculitic lesions in patients with type II cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2007-2015.

139. Erkek E, Bozdogan O, Olut AI. Hepatitis C virus infection prevalence in lichen planus: examination of lesional and normal skin of hepatitis C virus-infected patients with lichen planus for the presence of hepatitis C virus RNA. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 540-544.

140. Nagao Y, Kameyama T, Sata M. Hepatitis C virus RNA detection in oral lichen planus tissue. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 850.

141. Boyd AS, Nanney LB, King LE, Jr. Immunoperoxidase evaluation of lichen planus biopsies for hepatitis C virus. *Int J Dermatol* 1998; 37: 260-262.
142. Lazaro P, J. O, Bartolome J, Ortiz-Movilla N, Rodriguez-Inigo E, Pardo M, Lecona M, Pico M, Longo I, Garcia-Morras P, Carreno V. Detection of Hepatitis C virus RNA and core protein in keratinocytes from patients with cutaneous lichen planus and chronic hepatitis C. *J. Investigative Dermatology* 2002; 119: 798-803.
143. Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Bartolom inverted question marke J, Manzarbeitia F, Herrero M, Pardo M, Carreno V. Detection of hepatitis C virus replication by In situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus. *Hepatology* 2000; 32: 97-103.
144. Blight KJ GE. In situ hybridization and immunohistochemical staining of hepatitis C virus products. *Viral Hepat Rev* 1995; 1: 143-155.
145. Halprin KM. Epidermal "turnover time"--a re-examination. *Br J Dermatol* 1972; 86: 14-19.
146. Haake AR HK. The structure and development of the skin. En: Fitzpatrick's *Dermatology in General Medicine*. Freedberg IM EA, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. Nueva York, McGraw-Hill: 1999, 70-114.
147. Mokni M, Rybojad M, Puppin D, Jr., Catala S, Venezia F, Djian R, Morel P. Lichen planus and hepatitis C virus. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 792.
148. Cribier B, Garnier C, Laustriat D, Heid E. Lichen planus and hepatitis C virus infection: an epidemiologic study. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: 1070-1072.
149. Ingafou M, Porter SR, Scully C, Teo CG. No evidence of HCV infection or liver disease in British patients with oral lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; 27: 65-66.
150. Roy KM, Dickson EM, Staines KS, Bagg J. Hepatitis C virus and oral lichen planus/lichenoid reactions: lack of evidence for an association. *Clin Lab* 2000; 46: 251-254.
151. Imhof M, Popal H, Lee JH, Zeuzem S, Milbradt R. Prevalence of hepatitis C virus antibodies and evaluation of hepatitis C virus genotypes in patients with lichen planus.

Dermatology 1997; 195: 1-5.

152. Mignogna MD, Lo Muzio L, Favia G, Mignogna RE, Carbone R, Bucci E. Oral lichen planus and HCV infection: a clinical evaluation of 263 cases. *Int J Dermatol* 1998; 37: 575-578.

153. Nagao Y, Sata M, Tanikawa K, Itoh K, Kameyama T. Lichen planus and hepatitis C virus in the northern Kyushu region of Japan. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 910-914.

154. Dupin N, Chosidow O, Lunel F, Fretz C, Szpirglas H, Frances C. Oral lichen planus and hepatitis C virus infection: a fortuitous association? *Arch Dermatol* 1997; 133: 1052-1053.

155. Ponc M, te Pas MF, Havekes L, Boonstra J, Mommaas AM, Vermeer BJ. LDL receptors in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 50S-56S.

156. Jubert C, Pawlotsky JM, Pouget F, Andre C, DeForges L, Bretagne S, Mavier JP, Duval J, Revuz J, Dhumeaux D, et al. Lichen planus and hepatitis C virus--related chronic active hepatitis. *Arch Dermatol* 1994; 130: 73-76.

157. Protzer U, Ochsendorf FR, Leopolder-Ochsendorf A, Holtermuller KH. Exacerbation of lichen planus during interferon alfa-2a therapy for chronic active hepatitis C. *Gastroenterology* 1993; 104: 903-905.

158. Areias J, Velho GC, Cerqueira R, Barbedo C, Amaral B, Sanches M, Massa A, Saraiva AM. Lichen planus and chronic hepatitis C: exacerbation of the lichen under interferon-alpha-2a therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 825-828.

159. Nunez M, Miralles ES, de las Heras ME, Ledo A. Appearance of oral erosive lichen planus during interferon alfa-2a therapy for chronic active hepatitis C. *J Dermatol* 1995; 22: 461-462.

160. Barreca T, Corsini G, Franceschini R, Gambini C, Garibaldi A, Rolandi E. Lichen planus induced by interferon-alpha-2a therapy for chronic active hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 367-368.

161. Bickers DR PM, Lim HW. The porphyrias. En: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Freedberg IM EA, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. Nueva York, McGraw-Hill: 1999, 1766-1803.

162. Kushner JP, Barbuto AJ, Lee GR. An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda: decreased uroporphyrinogen decarboxylase activity. *J Clin Invest* 1976; 58: 1089-1097.
163. Elder GH, Lee GB, Tovey JA. Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 1978; 299: 274-278.
164. Fargion S, Piperno A, Cappellini MD, Sampietro M, Fracanzani AL, Romano R, Caldarelli R, Marcelli R, Vecchi L, Fiorelli G. Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology* 1992; 16: 1322-1326.
165. DeCastro M, Sanchez J, Herrera JF, Chaves A, Duran R, Garcia-Buey L, Garcia-Monzon C, Sequi J, Moreno-Otero R. Hepatitis C virus antibodies and liver disease in patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1993; 17: 551-557.
166. Lacour JP, Bodokh I, Castanet J, Bekri S, Ortonne JP. Porphyria cutanea tarda and antibodies to hepatitis C virus. *Br J Dermatol* 1993; 128: 121-123.
167. Lamoril J, Andant C, Bogard C, Puy H, Gouya L, Pawlotsky JM, Da Silva V, Soule JC, Deybach JC, Nordmann Y. Epidemiology of hepatitis C and G in sporadic and familial porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1998; 27: 848-852.
168. Navas S, Bosch O, Castillo I, Marriott E, Carreno V. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B viruses infection: a retrospective study. *Hepatology* 1995; 21: 279-284.
169. Cribier B, Petiau P, Keller F, Schmitt C, Vetter D, Heid E, Grosshans E. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C viral infection. A clinical and virologic study. *Arch Dermatol* 1995; 131: 801-804.
170. Murphy A, Dooley S, Hillary IB, Murphy GM. HCV infection in porphyria cutanea tarda. *Lancet* 1993; 341: 1534-1535.
171. Stolzel U, Kostler E, Koszka C, Stoffler-Meilicke M, Schuppan D, Somasundaram R, Doss MO, Habermehl KO, Riecken EO. Low prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria cutanea tarda in Germany. *Hepatology* 1995; 21: 1500-1503.
172. Sampietro M, Fracanzani AL, Corbetta N, Amato M, Mattioli M, Molteni V, Fiorelli G, Fargion S. High prevalence of hepatitis C virus type 1b in Italian patients with Porphyria cutanea tarda. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29: 543-547.

173. Herrero C, Vicente A, Bruguera M, Ercilla MG, Barrera JM, Vidal J, Teres J, Mascaro JM, Rodes J. Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda? *Lancet* 1993; 341: 788-789.
174. Ferri C, Baicchi U, la Civita L, Greco F, Longombardo G, Mazzoni A, Careccia G, Bombardieri S, Pasero G, Zignego AL, et al. Hepatitis C virus-related autoimmunity in patients with porphyria cutanea tarda. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 851-855.
175. Burrows NP, Norris PG, Alexander G, Wreghitt T. Chronic hepatitis C infection and psoriasis. *Dermatology* 1995; 190: 173.
176. Taglione E, Vatteroni ML, Martini P, Galluzzo E, Lombardini F, Delle Sedie A, Bendinelli M, Pasero G, Bencivelli W, Riente L. Hepatitis C virus infection: prevalence in psoriasis and psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 370-372.
177. Chouela E, Abeldano A, Panetta J, Ducard M, Neglia V, Sookoian S, Kina M, Castano G, Vereytou F, Frider B. Hepatitis C virus antibody (anti-HCV): prevalence in psoriasis. *Int J Dermatol* 1996; 35: 797-799.
178. Kanazawa K, Aikawa T, Tsuda F, Okamoto H. Hepatitis C virus infection in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 1996; 132: 1391-1392.
179. Georgetson MJ, Yarze JC, Lalos AT, Webster GF, Martin P. Exacerbation of psoriasis due to interferon-alpha treatment of chronic active hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1756-1758.
180. Pauluzzi P, Kokelj F, Perkan V, Pozzato G, Moretti M. Psoriasis exacerbation induced by interferon-alpha. Report of two cases. *Acta Derm Venereol* 1993; 73: 395.
181. Jucgla A, Marcoval J, Curco N, Servitje O. Psoriasis with articular involvement induced by interferon alfa. *Arch Dermatol* 1991; 127: 910-911.
182. Garcia-Lora E, Tercedor J, Massare E, Lopez-Nevot MA, Skiljo M, Garcia-Mellado V. Interferon-induced psoriasis in a patient with chronic hepatitis C. *Dermatology* 1993; 187: 280.
183. Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Psoriasis and hepatitis C virus. *Acta Derm Venereol* 1995; 75: 482-483.
184. Yamamoto T, Yokoyama A. Hepatitis C virus infection and nodular prurigo. *Br J*

Dermatol 1996; 135: 499.

185. Neri S, Raciti C, D'Angelo G, Ierna D, Bruno CM. Hyde's prurigo nodularis and chronic HCV hepatitis. *J Hepatol* 1998; 28: 161-164.

186. Kanazawa K, Yaoita H, Tsuda F, Murata K, Okamoto H. Association of prurigo with hepatitis C virus infection. *Arch Dermatol* 1995; 131: 852-853.

187. Reichel M, Mauro TM. Urticaria and hepatitis C. *Lancet* 1990; 336: 822-823.

188. Soter N. Urticaria and angioedema. En: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Freedberg IM EA, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. Nueva York, Mc Graw-Hill: 1999, 1409-1425.

189. Kanazawa K, Yaoita H, Tsuda F, Okamoto H. Hepatitis C virus infection in patients with urticaria. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35: 195-198.

190. Smith R, Caul EO, Burton JL. Urticaria and hepatitis C. *Br J Dermatol* 1997; 136: 980.

191. Llanos F, Raison-Peyron N, Meunier L, Ducos J, Meynadier J. Hepatitis C virus infection in patients with urticaria. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: 646.

192. Doutre MS, Beylot-Barry M, Beylot C. Urticaria and hepatitis C infection. *Br J Dermatol* 1998; 138: 194-195.

193. Cribier BJ, Santinelli F, Schmitt C, Stoll-Keller F, Grosshans E. Chronic urticaria is not significantly associated with hepatitis C or hepatitis G infection: a case-control study. *Arch Dermatol* 1999; 135: 1335-1339.

194. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1992; 327: 1490-1495.

195. Lee WY, Lockniskar MF, Fischer SM. Interleukin-1 alpha mediates phorbol ester-induced inflammation and epidermal hyperplasia. *Faseb J* 1994; 8: 1081-1087.

196. Shindo M, Di Bisceglie AM, Akatsuka T, Fong TL, Scaglione L, Donets M, Hoofnagle JH, Feinstone SM. The physical state of the negative strand of hepatitis C virus RNA in serum of patients with chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8719-8723.

197. Ferri C, Greco F, Longombardo G, Palla P, Moretti A, Marzo E, Fosella PV, Pasero

- G, Bombardieri S. Antibodies to hepatitis C virus in patients with mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1606-1610.
198. Cacoub P, Maisonobe T, Thibault V, Gatel A, Servan J, Musset L, Piette JC. Systemic vasculitis in patients with hepatitis C. *J Rheumatol* 2001; 28: 109-118.
199. Downing DT SM, Strauss JS. Lipids of the epidermis and the sebaceous glands. En: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Freedberg IM EA, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. Nueva York, Mc Graw-Hill: 1999, 144-155.
200. Goldsmith L. Biology of eccrine and apocrine sweat glands. En: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Freedberg IM EA, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. Nueva York, Mc Graw-Hill: 1999, 155-164.
201. Sato K, Dobson RL. Glucose metabolism of the isolated eccrine sweat gland. II. The relation between glucose metabolism and sodium transport. *J Clin Invest* 1973; 52: 2166-2174.
202. Brusilow SW. The permeability of the sweat gland to non-electrolytes. *Bibl Paediatr* 1967; 86: 32-40.
203. Yokozeki H, Hibino T, Takemura T, Sato K. Cysteine proteinase inhibitor in eccrine sweat is derived from sweat gland. *Am J Physiol* 1991; 260: R314-320.
204. Nakano I, Imoto M, Fukuda Y, Koyama Y, Urano F, Kanda N, Isobe K. Hepatitis C virus RNA in urine, saliva, and sweat. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1522.
205. Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, Kramer E, Miller JK, Mandel E, Hadler SC, Margolis HS. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *Jama* 1989; 262: 1201-1205.
206. Gordon SC, Elloway RS, Long JC, Dmuchowski CF. The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission: blood transfusion vs. intravenous drug use. *Hepatology* 1993; 18: 1338-1343.
207. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, Cheung L, DiBisceglie A, Hoofnagle J, Shih JW, et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 1691-1696.

208. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 62S-65S.
209. Saracco G, Ciancio A, Olivero A, Smedile A, Roffi L, Croce G, Colletta C, Cariti G, Andreoni M, Biglino A, Calleri G, Maggi G, Tappero GF, Orsi PG, Terreni N, Macor A, Di Napoli A, Rinaldi E, Ciccone G, Rizzetto M. A randomized 4-arm multicenter study of interferon alfa-2b plus ribavirin in the treatment of patients with chronic hepatitis C not responding to interferon alone. *Hepatology* 2001; 34: 133-138.
210. Deny P, Roulot D, Asselot C, Rauzy M, Rautureau J, Coste T. Low rate of hepatitis C virus (HCV) transmission within the family. *J Hepatol* 1992; 14: 409-410.
211. Brackmann SA, Gerritzen A, Oldenburg J, Brackmann HH, Schneeweis KE. Search for intrafamilial transmission of hepatitis C virus in hemophilia patients. *Blood* 1993; 81: 1077-1082.
212. Meisel H, Reip A, Faltus B, Lu M, Porst H, Wiese M, Roggendorf M, Kruger DH. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet* 1995; 345: 1209-1211.
213. Sachithanandan S, Fielding JF. Low rate of HCV transmission from women infected with contaminated anti- D immunoglobulin to their family contacts. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29: 47-50.
214. Bellobuono A, Zanella A, Petrini G, Zanuso F, Mozzi F, Sirchia G. Intrafamilial spread of hepatitis C virus. *Transfusion* 1991; 31: 475.
215. Napoli N, Fiore G, Vella F, Fera G, Schiraldi O. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among family members of patients with chronic hepatitis C. *Eur J Epidemiol* 1993; 9: 629-632.
216. Garcia-Bengoechea M, Cortes A, Lopez P, Vega JL, Emparanza JI, Sarriugarte A, Santos E, Arenas JI. Intrafamilial spread of hepatitis C virus infection. *Scand J Infect Dis* 1994; 26: 15-18.
217. Coltorti M, Caporaso N, Morisco F, Suozzo R, Romano M, D'Antonio M. Prevalence of hepatitis C virus infection in the household contacts of patients with HCV-related chronic liver disease. *Infection* 1994; 22: 183-186.
218. Guadagnino V, Stroffolini T, Foca A, Caroleo B, Loiacono L, Giacotti A, Menniti

- Ippolito F, Piazza M. Hepatitis C virus infection in family setting. *Eur J Epidemiol* 1998; 14: 229-232.
219. Oshita M, Hayashi N, Kasahara A, Yuki N, Takehara T, Hagiwara H, Hayakawa Y, Yasumatsuya Y, Kishida Y, Fusamoto H, et al. Prevalence of hepatitis C virus in family members of patients with hepatitis C. *J Med Virol* 1993; 41: 251-255.
220. Nakashima K, Ikematsu H, Hayashi J, Kishihara Y, Mutsutake A, Kashiwagi S. Intrafamilial transmission of hepatitis-C virus among the population of an endemic area of Japan. *Jama* 1995; 274: 1459-1461.
221. Ackerman Z, Ackerman E, Paltiel O. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review. *J Viral Hepat* 2000; 7: 93-103.
222. Piazza M, Borgia G, Picciotto L, Cicciarello S, Nappa S. HCV-RNA survival as detected by PCR in the environment. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1994; 70: 167-170.
223. Thorpe LE, Ouellet LJ, Levy JR, Williams IT, Monterroso ER. Hepatitis C virus infection: prevalence, risk factors, and prevention opportunities among young injection drug users in Chicago, 1997-1999. *J Infect Dis* 2000; 182: 1588-1594.
224. Takamatsu K, Koyanagi Y, Okita K, Yamamoto N. Hepatitis C virus RNA in saliva. *Lancet* 1990; 336: 1515.
225. Couzigou P, Richard L, Dumas F, Schouler L, Fleury H. Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. *Gut* 1993; 34: S59-60.
226. Abe K, Kurata T, Shikata T, Sugitani M, Oda T. Experimental transmission of non-A, non-B hepatitis by saliva. *J Infect Dis* 1987; 155: 1078-1079.
227. Everhart JE, Di Bisceglie AM, Murray LM, Alter HJ, Melpolder JJ, Kuo G, Hoofnagle JH. Risk for non-A, non-B (type C) hepatitis through sexual or household contact with chronic carriers. *Ann Intern Med* 1990; 112: 544-545.
228. Rodriguez M, Riestra S, San Roman F, Perez R, Suarez A, Sanchez JL, Rodrigo L. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed acute non-A, non-B hepatitis, from different epidemiological categories. *Liver* 1991; 11: 129-133.
229. Sagnelli E, Gaeta GB, Felaco FM, Stroffolini T, Conti S, Glielmo A, Piccinino F, Giusti G. Hepatitis C virus infection in households of anti-HCV chronic carriers in Italy: a

multicentre case-control study. *Infection* 1997; 25: 346-349.

230. Guadagnino V, Ayala F, Chirianni A, Picciotto L, Tiseo D, Piazza M. Risk of hepatitis B virus infection in patients with eczema or psoriasis of the hand. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 284: 84.

9. ANEXOS

Detection of Hepatitis C Virus RNA and Core Protein in Keratinocytes from Patients with Cutaneous Lichen Planus and Chronic Hepatitis C

Pablo Lazaro, Javier Olalquiaga, Javier Bartolomé,† Nuria Ortiz-Movilla,† Elena Rodríguez-Iñigo,† Margarita Pardo,† Manuel Lecona,* Mercedes Pico, Isabel Longo, Patricia García-Morrás, and Vicente Carreño†

Departments of Dermatology and *Pathology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; †Institute of Hepatology, Hospital Pardo de Aravaca and Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, Madrid, Spain

Cutaneous lichen planus has been associated in patients with chronic hepatitis C virus infection. It is still unknown whether hepatitis C virus infects keratinocytes of lichen planus lesions. In this report we have analyzed the presence of genomic and anti-genomic hepatitis C virus RNA in skin biopsies from 26 patients with chronic hepatitis C and healthy skin and from 24 patients with cutaneous lichen planus (five with and 19 without hepatitis C virus infection) by *in situ* hybridization. Hepatitis C virus RNA was detected in the keratinocytes of 69% of the patients with healthy skin and chronic hepatitis C, in 100% of the patients with lichen planus and hepatitis C virus infection, and in none of lichen planus patients

without hepatitis C virus infection. The percentage of keratinocytes showing genomic or anti-genomic hepatitis C virus RNA was statistically lower ($p < 0.01$ in all cases) in patients with healthy skin (mean \pm SD: $5.7 \pm 3.5\%$ and $2.7 \pm 3.1\%$ of keratinocytes with genomic or anti-genomic hepatitis C virus RNA, respectively) than in those with lichen planus lesions ($31.7 \pm 7.9\%$ and $18.8 \pm 7.4\%$, mean \pm SD) or the unaffected adjacent skin ($24.8 \pm 6.9\%$ and $14.3 \pm 3.8\%$, mean \pm SD). In conclusion, we have demonstrated that hepatitis C virus infects keratinocytes from patients with lichen planus and hepatitis C virus infection. **Key words:** hepatitis C virus-RNA/*in situ* hybridization/skin. *J Invest Dermatol* 119:798–803, 2002

Hepatitis C virus (HCV) is a small-enveloped virus belonging to the Flaviviridae family of animal viruses. Its genome consists of a single-stranded RNA of positive polarity and is about 9.4 kb in length (Kato *et al*, 1990). As is the case with other flaviviruses, it is thought that HCV replicates through a RNA intermediate of anti-genomic polarity (Clarke, 1997).

Chronic HCV infection causes a wide range of types of liver damage, ranging from mild chronic hepatitis to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Di Bisceglie, 1997); however, besides liver disease, chronic HCV infection is associated with several extrahepatic manifestations, with skin disorders frequently observed in these patients (Hadziyannis, 1998; Doutre, 1999). In relation to these skin diseases, several epidemiologic studies have shown that lichen planus (LP) lesions are more prevalent in patients with chronic hepatitis C than in the general population (Nagao *et al*, 1995; Carrozzo *et al*, 1996).

LP is a mucocutaneous disease of unknown etiology that may be caused by a cell-mediated immune response directed against induced antigenic changes in epidermal keratinocytes (Sugerman

et al, 2000). In a previous study, Mangia *et al* (1999), using the reverse transcription–polymerase chain reaction (reverse transcription–PCR), were unable to detect HCV-RNA of anti-genomic polarity (as an indicator of HCV replication) in skin samples from patients with LP and chronic hepatitis C. By contrast, Erkek *et al* (2001) detected HCV-RNA by PCR in lesional skin biopsies from patients with chronic HCV infection and LP. Furthermore, we have recently reported that HCV infects oral mucosa epithelial cells from patients with oral LP and chronic HCV infection (Arrieta *et al*, 2000). Thus, it must still be determined whether HCV infects keratinocytes from LP lesions.

For these reasons, in this study, we present the results of an *in situ* hybridization study on the presence of genomic and anti-genomic HCV-RNA in skin biopsies from patients with cutaneous LP and chronic hepatitis C compared with biopsies of healthy skin from patients with chronic HCV infection.

PATIENTS AND METHODS

Patients The presence of HCV-RNA of genomic and anti-genomic polarities was analyzed by *in situ* hybridization in paraffin-embedded skin biopsies from three groups of patients.

Group 1 Twenty-six patients (12 female/14 male; age: 42.54 ± 12.38 y, mean \pm SD) with histologically proven chronic hepatitis C and healthy skin without LP. All patients were anti-HCV positive, and HCV-RNA was detectable in the serum of 23 of them. Seven patients had normal alanine aminotransferase (ALT) values (upper normal limit 40 IU per liter), whereas the remaining 19 patients had abnormal ALT levels (87.2 ± 40.3 IU per liter, mean \pm SD).

Manuscript received November 1, 2001; revised February 7, 2002, June 27, 2002; accepted for publication June 28, 2002

Reprint requests to: Vicente Carreño, MD, Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, C/Guzmán el Bueno, 72, 28015 Madrid, Spain. Email: fehvpa@fehv.org

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; reverse transcription–PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction; ALT, alanine aminotransferase.

Table I. Histologic characteristics and location of cutaneous LP lesions in the patients included in the study

	Location of the lesions			Infiltrate density		
	Arms	Legs	Trunk	1	2	3
Patients with chronic hepatitis C (n = 5)	80%	80%	80%	–	40%	60%
Patients without HCV infection (n = 19)	94.7%	84.2%	68.4%	5.3%	78.9%	15.8%

Group 2 Five patients (two female/three male; mean: 52 ± 12.94 y, mean \pm SD) with cutaneous LP and chronic HCV infection. HCV-RNA was detectable in the serum of all five patients but only one of them was anti-HCV positive. Four of the five patients had normal ALT levels, whereas the other patient had abnormal ALT values (52 IU per liter).

Group 3 Nineteen patients (10 female/nine male; age: 49.58 ± 17.84 y, mean \pm SD) with cutaneous LP without markers of HCV infection (anti-HCV and HCV-RNA negative in serum), and with normal ALT values.

The inclusion criteria for patients from groups 2 and 3 were that there would be sufficient paraffin-embedded tissue to perform the *in situ* hybridization studies and that a serum sample obtained at the time of the skin biopsy properly stored at -20°C would be available.

None of the patients were receiving anti-viral or immunosuppressive therapy when the skin biopsies were obtained. Other causes of liver disease, such as autoimmune hepatitis, coinfection with other hepatotropic viruses, etc., were excluded. Furthermore, all the patients included in this study were negative for the antibodies against the human immunodeficiency virus (anti-human immunodeficiency virus).

Skin biopsies from LP lesions and from the unaffected adjacent skin were obtained to confirm the clinical diagnosis. After histologic examination, the remaining tissue was used for the *in situ* hybridization studies. The anatomical locations of the LP lesions in patients with and without chronic HCV infection are shown in **Table I**.

Skin samples from patients with healthy skin and chronic hepatitis C were obtained when the diagnostic liver biopsy was performed. Liver biopsies were obtained under ultrasonographic control and local anesthesia. At the biopsy needle penetration site (between the eighth or ninth intercostal space in the mid-axillary line), a 4 mm punch skin biopsy was performed. Obtaining the skin biopsy did not modify the procedure used to perform the liver biopsy.

The study was conducted in accordance with the guidelines of "Good Clinical Practice" that underwrites the principles of the Declaration of Helsinki on human experimentation. Written informed consent was obtained from each patient participating in the study.

Serologic markers Anti-HCV was determined by a third-generation enzyme-linked immunoassay (INNOTEST HCV AbIII, Innogenetics, Heiden, Germany), and confirmed by a recombinant immunoblot assay (INNO-LIA HCV AbIII, Innogenetics).

Hepatitis B virus surface antigen, antibodies against hepatitis B virus surface antigen, antibodies against hepatitis B core antigen, anti-hepatitis D virus, IgM anti-hepatitis A virus, and anti-human immunodeficiency virus were studied by commercial enzyme immunoassays (Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland).

HCV-RNA quantification and genotyping in serum samples HCV-RNA concentration in serum was determined using the Amplicor HCV Monitor Quantitative Assay (Roche Diagnostics Systems). HCV genotypes were determined with the INNO-LIPA HCV II test (Innogenetics NV, Zwijnaarde, Belgium).

In situ hybridization Positive and negative polarity labeled HCV riboprobes were generated by *in vitro* transcription of the pC5'NCR plasmid (that contains the cDNA corresponding to the complete 5' noncoding region of the HCV genome) in the presence of digoxigenin 11-uridine triphosphate (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Dewaxed sections of the skin biopsies were hybridized with positive or negative polarity labeled probes to detect anti-genomic and genomic HCV-RNA, respectively, as previously described (Arrieta *et al*, 2001).

The *in situ* hybridization specificity was assessed by: (i) hybridization with an unrelated probe (a 360 bp fragment of the chloramphenicol

acetyl transferase gene, generated by PCR and cloned in the pCRII-TOPO vector); (ii) omission of the probe from the hybridization mixture; and (iii) digestions of the sections with RNase A (0.2 mg per ml) (Sigma, St Louis, MO) or DNase I (20 U per ml) (Sigma) for 2 h at 37°C prior to *in situ* hybridization.

The hybridization specificity of the positive and negative polarity riboprobes with their complementary HCV-RNA was assessed by dot blot hybridization as described previously (Arrieta *et al*, 2001).

Immunohistochemistry Immunohistochemical detection of HCV core antigen was performed in the skin biopsies from eight HCV-RNA-positive and five HCV-RNA-negative patients from whom enough paraffin-embedded tissue was available to perform this technique.

Detection of the HCV core antigen was automatically performed (Tech Mate 500, Dako, Glostrup, Denmark) using an anti-HCV core monoclonal antibody (Hepatitis C virus MonotopeTM, ViroStat, Portland, ME) at a 1 : 30 dilution after antigenic retrieval pressure cooking (3 min in 10 mM citrate buffer pH 6.0) using the Dako Envision staining procedure. The detection specificity of the HCV core antigen was assessed by omitting the anti-HCV core antibody in the immunohistochemical detection in serial sections of the same skin biopsies.

As described above, immunohistochemical detection of the S-100 antigen (a marker of Langerhans dendritic cells) was also automatically performed in the same tissue sections that were previously employed for *in situ* hybridization using an anti-S-100 polyclonal antibody (Dako) at 1 : 2000 dilution.

Histologic diagnosis of LP lesions LP was histologically diagnosed when there was basal cell damage, lymphohistiocytic infiltrate in a band-like pattern with variable intraepithelial exocytosis, and the presence of homogeneous acidophilic bodies.

The severity of the inflammatory infiltrate in hematoxylin-eosin-stained skin sections was scored from 1 to 3, depending on the intensity:

- 1 When the interphase between the dermis and the epidermis was preserved and the intensity of the infiltrate was mild or focal in distribution in the papillary dermis.
- 2 When the interphase between the dermis and the epidermis was affected but had not disappeared, and the infiltrate had a band-like disposition of moderate intensity.
- 3 When the interphase had disappeared and the density of the infiltrate was severe.

Statistical analysis The Student's t test was used to analyze quantitative data and the Spearman correlation test for correlation. All p-values are two-tailed; $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. All statistical analyses were performed using the SPSS package (SPSS for Windows release 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

HCV-RNA in serum In group 1 (chronic hepatitis C patients with healthy skin), 23 of the 26 patients had HCV-RNA detectable in serum. The viremia levels in these patients ranged from 9.5×10^3 IU per ml to 1.78×10^6 IU per ml ($4.91 \times 10^5 \pm 4.13 \times 10^5$ IU per ml, mean \pm SD).

In group 2 (patients with cutaneous LP and chronic HCV infection), the five patients had detectable HCV-RNA in their serum at concentrations ranging from 10^3 IU per ml to 8.87×10^5 ($1.79 \times 10^5 \pm 3.95 \times 10^5$ IU per ml, mean \pm SD).

The fact that only one of the five patients with cutaneous LP and HCV-RNA in serum had anti-HCV antibodies could indicate that these patients were immunosuppressed. All these patients, however, were anti-human immunodeficiency virus negative and their immunoglobulin levels and the leukocyte and lymphocyte counts were within the normal ranges (**Table II**).

With respect to the HCV genotype, in group 1, 21 patients were infected by HCV 1b, one patient by HCV 1a, and the remaining patient was infected by the HCV 2a genotype. In group 2, the five patients were infected by the HCV 1b genotype.

Detection of HCV-RNA in keratinocytes by in situ hybridization Positive hybridization signals were detected in keratinocyte cytoplasm of the basal, spinous, and granular layers of the epidermis in 18 of 26 (69.2%) of the skin biopsies from patients with chronic hepatitis C and healthy skin (group 1) and in five of five (100%) of the patients with LP and chronic HCV infection

Table II. Immunoglobulin levels, number of leukocytes and percentage of lymphocytes in LP patients with HCV-RNA detectable in serum

Patient no.	Anti-HCV	IgG ^a (mg per 100 ml)	IgA ^b (mg per 100 ml)	IgM ^c (mg per 100 ml)	IgE ^d (mg per 100 ml)	Leukocytes ^e (cells per ml)	Lymphocytes ^f (%)
1	Negative	920	200	80	0.05	6×10^6	40
2	Negative	860	145	70	0.09	9×10^6	45
3	Negative	1200	187	90	0.17	7×10^6	35
4	Negative	960	220	125	0.08	9×10^6	35
5	Positive	950	195	140	0.15	8×10^6	40

^aNormal values: 800–1800 mg per 100 ml.

^bNormal values: 90–400 mg per 100 ml.

^cNormal values: 60–250 mg per 100 ml.

^dNormal values: 0.01–0.43 mg per 100 ml.

^eNormal values: $4.5\text{--}10 \times 10^6$ cells per ml.

^fNormal values: 20–50%.

(group 2) in both the LP lesions as well as in the unaffected adjacent skin. No positive hybridization signals were observed in the skin biopsies from the 19 anti-HCV-negative, serum HCV-RNA-negative patients with cutaneous LP (group 3) (Fig 1).

The specificity of the *in situ* hybridization was further confirmed by the lack of signals when the slides were hybridized with an unrelated probe, when the probe was omitted from the hybridization mix and when the slides were digested with RNase prior to hybridization. In contrast, no changes were observed in the hybridization patterns when the slides were predigested with DNase (Fig 2).

Regarding the percentage of cells showing hybridization signals, HCV-RNA of genomic polarity was observed in $5.7 \pm 3.5\%$ (mean \pm SD; range: 0.5–11.5%) of keratinocytes from patients with healthy skin and in $31.7 \pm 7.9\%$ (mean \pm SD; range: 20–40%) and in $24.8 \pm 6.9\%$ (mean \pm SD; range: 17–35%) of the keratinocytes of LP lesions and the unaffected adjacent skin, respectively, from the patients with cutaneous LP. The differences in the percentages of keratinocytes showing genomic HCV-RNA in healthy skin and in LP lesions and the unaffected adjacent skin were statistically significant ($p = 0.001$ and $p = 0.003$, respectively). Similarly, the percentages of keratinocytes showing anti-genomic HCV-RNA was significantly lower ($p = 0.007$ and $p = 0.001$, respectively) in patients with healthy skin (mean \pm SD: $2.7 \pm 3.1\%$; range: 0.4–13.2%) than in LP lesions (mean \pm SD: $18.8 \pm 7.4\%$; range: 15–32%), and than in the unaffected adjacent skin (mean \pm SD: $14.3 \pm 3.8\%$; range 8–18%) (Table III).

The possibility of an unspecific hybridization between the positive polarity probe and the genomic HCV-RNA and the negative polarity probe and the anti-genomic viral RNA was discarded as no unspecific hybridization was detected by dot-blot hybridization (Fig 3).

No statistical correlation was found between the percentage of keratinocytes showing HCV-RNA of genomic or anti-genomic polarities and the HCV viremia in patients with healthy skin or patients with LP.

Finally, no topologic correlation was observed between HCV-infected keratinocytes and the inflammatory infiltrate in the LP lesions of the patients with chronic HCV infection.

Immunohistochemical detection of HCV core antigen and colocalization of HCV-RNA by *in situ* hybridization and the S-100 antigen by immunohistochemistry

To confirm further that HCV infects and replicates in keratinocytes, immunohistochemical detection of HCV core antigen was performed in skin sections from patients with and without HCV-RNA in serum. As shown in Fig 4, HCV core antigen was detected in the keratinocyte cytoplasm from HCV-RNA positive patients but not in the skin samples from the HCV-RNA negative cases.

In order to confirm that the HCV-infected cells were keratinocytes and not dendritic (Langerhans) cells, immunohisto-

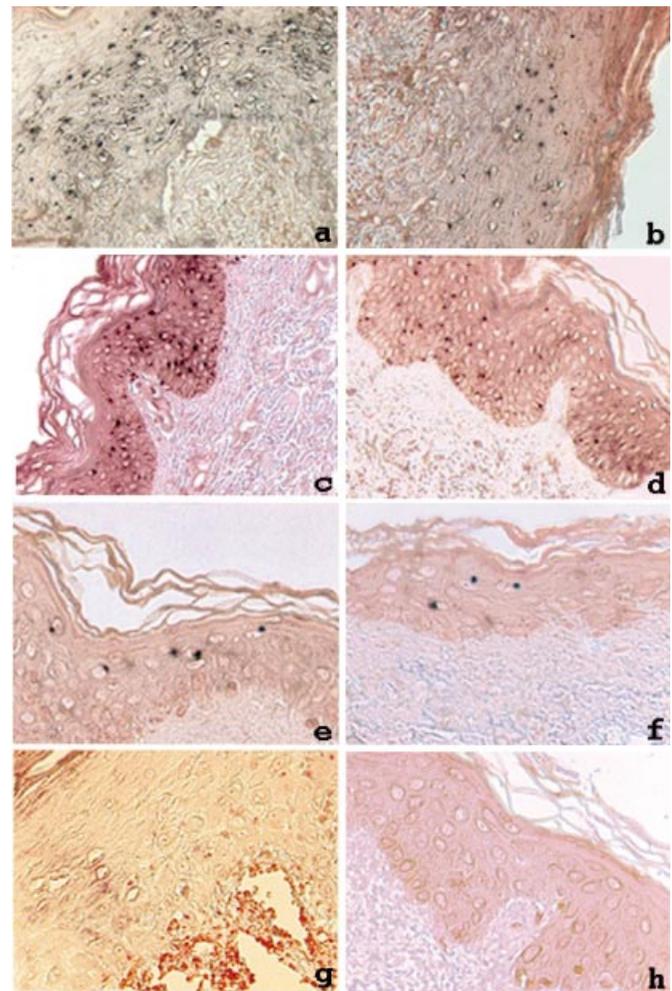


Figure 1. Detection of genomic and anti-genomic HCV-RNA in patients with and without cutaneous LP. Hybridization signals corresponding to genomic HCV-RNA in LP lesions (a), unaffected adjacent skin (c), and healthy skin (e). Detection of anti-genomic HCV-RNA in LP lesions (b), unaffected adjacent skin (d), and healthy skin (f). Lack of hybridization signals in a LP lesion (g) and in the unaffected adjacent skin (h) from a patient without HCV infection. Counterstained with safranin, original magnification (a–d,g) $\times 200$; (e,f,h) $\times 400$.

chemical detection of the S-100 antigen was performed on the same slides used for the detection of HCV-RNA by *in situ* hybridization. As shown in Fig 5, the cells expressing the S-100 antigen were different from those showing HCV-RNA.

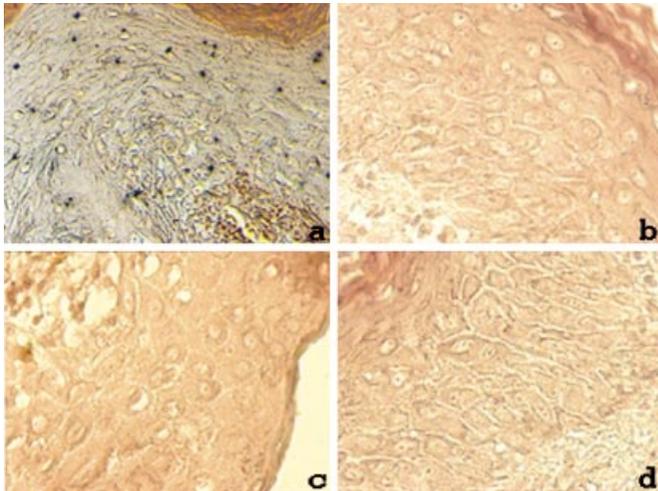


Figure 2. Specificity controls of the *in situ* hybridization technique performed in different sections of the skin biopsy of the lesion from a patient with LP and HCV-RNA in serum. (a) DNase digestion and (b) RNase digestion (c) hybridization with the unrelated labeled probe and (d) hybridization in the absence of the HCV-labeled probe. Counterstained with saffranine, original magnification: (a) $\times 200$; (b-d) $\times 400$.

Histologic damage in patients with LP and with or without HCV infection Regarding the intensity of the lymphocytic infiltrate in patients with LP with and without HCV infection, three of five (60%) patients with LP and HCV infection had an inflammatory infiltrate of intensity 3, whereas this occurred in three of 19 (15.8%) patients with LP but without HCV infection. This difference did not reach statistical significance (**Table I**).

DISCUSSION

In this study we investigated the presence of HCV-RNA in keratinocytes from patients with chronic HCV infection with and without cutaneous LP.

HCV-RNA of genomic and anti-genomic polarities was detected in the keratinocytes of 69% of patients with healthy skin and chronic hepatitis C and in 100% of the patients with cutaneous LP and chronic HCV infection. Viral infection of keratinocytes was also confirmed by the detection of HCV core antigen in skin samples from patients with HCV-RNA in serum but not in the skin biopsies from the HCV-RNA negative cases. Viral infection of keratinocytes does not seem to be a special feature of HCV as it has been shown that another hepatotropic virus, the hepatitis B virus, is able to infect and replicate in keratinocytes (Mason *et al*, 1993). Furthermore, it has been suggested that cytomegalovirus infection of skin keratinocytes may be implicated in the development of skin lesions in patients with systemic lupus erythematosus (Zhu, 1995)

Table III. Percentage of infected keratinocytes and serum viremia levels in the chronic hepatitis C patients with LP (1-5) or with healthy skin (6-31)

Patients with LP	Genomic HCV-RNA (% of positive cells)		Anti-genomic HCV-RNA (% of positive cells)		HCV viremia (IU per ml)
	LP	Adjacent ^a	LP	Adjacent ^a	
1	40	17	32	15.4	8.87×10^5
2	31	28	16	8	9.29×10^3
3	20	22	15	13.5	1.2×10^3
4	38	35	16	16.5	10^3
5	29.5	22	15	18	10^3
Patients without LP	Genomic HCV-RNA (% of positive cells)		Anti-genomic HCV-RNA (% of positive cells)		HCV viremia (IU per ml)
6	0		0		2.55×10^5
7	0.5		0.7		8×10^5
8	0		0		—
9	0.5		1		3×10^5
10	9		13.2		3.75×10^5
11	1		0.4		8.5×10^5
12	8		4		8.07×10^5
13	0%		0		—
14	6		1		1.85×10^5
15	0		0		7.4×10^5
16	6.4		4.6		3.2×10^5
17	3.7		3		5.27×10^4
18	9		1		1.78×10^6
19	5		7.5		8.5×10^5
20	7		1		6.3×10^5
21	8		1		7.63×10^5
22	11.5		2.3		2.63×10^5
23	8.5		3		3.96×10^5
24	7.4		2.4		9.46×10^5
25	10		1		2×10^5
26	0.5		1		1.3×10^4
27	2		1.5		2.43×10^5
28	0		0		9.5×10^3
29	0		0		—
30	0		0		1×10^5
31	0		0		4.92×10^4

^aAdjacent unaffected skin.

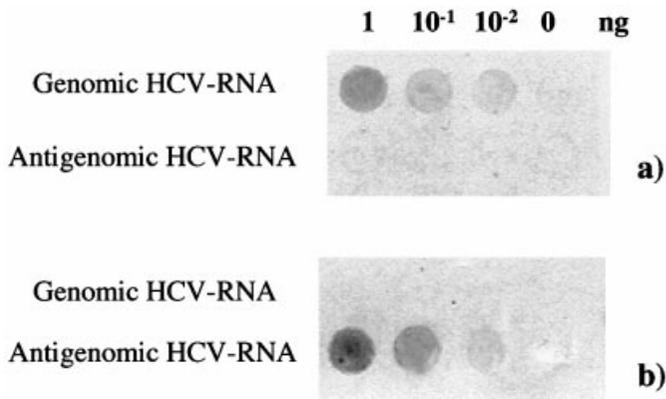


Figure 3. Dot-blot hybridization of serial dilutions of synthetic HCV-RNA of genomic and anti-genomic polarity with the HCV anti-sense (a) and sense (b) probes.

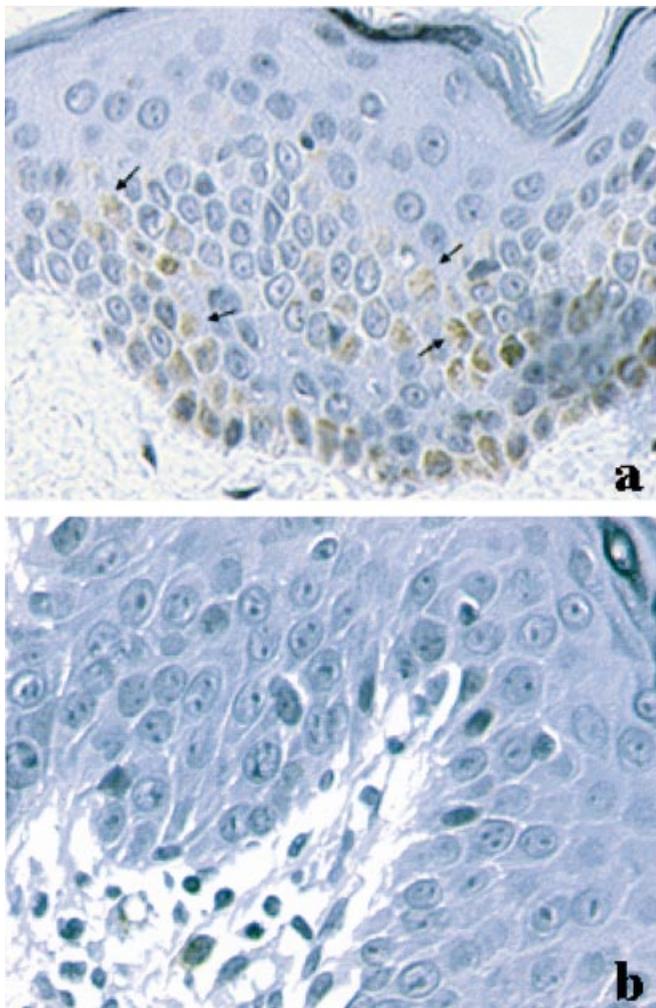


Figure 4. Immunohistochemical detection of HCV core antigen in the skin biopsies from an HCV-RNA positive patient (a) and from a HCV-RNA negative case (b). Arrows indicate positively stained keratinocytes.

and Epstein–Barr virus infection of epithelial cells is associated with the appearance of oral hairy leukoplakia (Greenspan *et al*, 1985).

The percentage of keratinocytes showing hybridization signals corresponding to HCV-RNA of genomic and anti-genomic

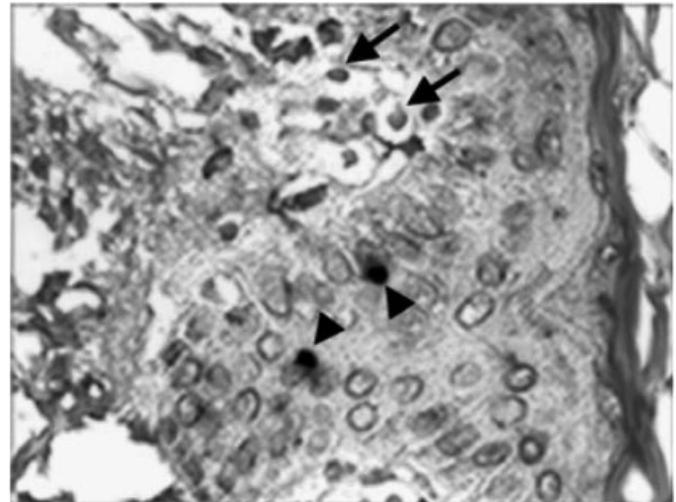


Figure 5. Simultaneous detection of the S-100 antigen (open arrows) and HCV-RNA (black arrows) in the LP lesion of a patient with chronic hepatitis C. Original magnification $\times 400$.

polarities was significantly higher in LP patients (in both the LP lesion as well as in the unaffected adjacent skin) than in patients with normal skin. As photoexposed skin is immunosuppressed (Granstein, 1999), it may be argued that the differences observed in the percentages of infected keratinocytes between patients with healthy skin and patients with LP was due to the fact that the skin biopsies from LP patients were obtained from a part of their body that had been exposed to light. This is not the case, however, as not only the skin samples from patients with healthy skin but also the biopsies from LP patients were obtained from body zones that are usually similarly photoexposed (the trunk in patients with healthy skin, and legs, arms, or trunk in LP patients).

On the other hand, it could be argued that hybridization signals are localized in the dendritic Langerhans cells and that they correspond to HCV particles phagocytosed by these cells. When colocalization of HCV-RNA and the S-100 antigen were performed, however, the corresponding signals were observed in different cells.

Our results are in agreement with those reported by Erkek *et al* (2001) who detected HCV-RNA in skin biopsies from LP lesions in patients with chronic HCV infection; however, they differ from those obtained by Mangia *et al* (1999) who did not detect HCV-RNA of genomic and anti-genomic polarity using reverse transcription–PCR in cutaneous LP lesions from patients with chronic hepatitis C. The lack of detection of HCV-RNA by reverse transcription–PCR in skin biopsies in the report by Mangia *et al* may be explained by the time that elapsed between when the skin biopsies were obtained and when they were frozen. Thus, it has been reported that if liver biopsies are frozen in liquid nitrogen 5 min after they were obtained, HCV-RNA may be undetectable by reverse transcription–PCR due to the partial degradation of the viral RNA (Madejón *et al*, 2000). In fact, this effect should be more pronounced in skin biopsies than in liver biopsies, as the total amount of HCV-RNA in skin samples should be lower than in liver samples, in which up to 80% of hepatocytes may be infected by the virus (Agnello *et al*, 1998; Rodríguez-Iñigo *et al*, 1999).

On the other hand, consistent with this study, in a previous report it was demonstrated the presence of HCV-RNA of positive and negative polarities in oral mucosa epithelial cells in oral LP lesions from patients with chronic hepatitis C (Arrieta *et al*, 2000). In that report, however, the percentage of infected oral mucosa epithelial cells was similar in both the LP lesions and in healthy oral mucosa, whereas in this study, as mentioned earlier, the proportion of HCV-infected keratinocytes was significantly higher in LP

lesions than in healthy skin. We have no explanation for this discrepancy, although it may be speculated that oral mucosa epithelial cells produce different cellular factors that allow more efficient HCV infection in oral mucosa epithelial cells than in keratinocytes. This hypothesis requires testing in the future.

With respect to the implication of HCV infection of keratinocytes in the development of cutaneous LP, the fact that the percentage of HCV-infected keratinocytes was significantly higher in LP lesions than in healthy skin suggests that HCV infection of keratinocytes may be involved in the pathogenesis of cutaneous LP. The fact that the percentage of infected keratinocytes in LP lesions ($31.7 \pm 7.9\%$) was very similar to that found in the unaffected adjacent skin ($24.8 \pm 6.9\%$), however, goes against this hypothesis. Nevertheless, our findings in LP patients suggest that HCV infection of keratinocytes may contribute to the development of LP lesions in patients with chronic HCV infection. On the other hand, it is also possible that an unidentified host factor of patients with LP may facilitate the infection and propagation of the virus in keratinocytes from these patients. In this sense, as only one of the five patients with LP and HCV infection had detectable anti-HCV antibodies, it may be speculated that these patients may have an immunologic defect that facilitates HCV infection of keratinocytes. None of these patients, however, showed clinical or analytical evidence of immunosuppression. Furthermore, in the only patient with cutaneous LP and anti-HCV detectable in serum the percentage of infected keratinocytes (40%) was similar to that found in the four anti-HCV-negative cases (20–38%). Further research is needed to establish whether the presence of circulating anti-HCV in patients with LP does or does not modify the pattern of HCV infection of keratinocytes.

On the other hand, it has been previously shown that HCV is associated with very low-density lipoproteins in type II cryoglobulins (Agnello, 1997) and that HCV may infect cells via the low-density lipoprotein receptor (Agnello *et al*, 1999). As these receptors are upregulated in keratinocytes from inflammatory skin lesions (Agnello and Abel, 1997), the higher proportion of infected keratinocytes observed in LP lesions compared with that in healthy skin may be an epiphenomenon related to the greater expression of low-density lipoprotein receptors in keratinocytes from cutaneous LP lesions than in healthy skin. This hypothesis requires confirmation through the analysis of patients with chronic HCV infection who also have other inflammatory skin diseases that are not associated with the HCV infection, such as psoriasis.

With respect to the severity of LP lesions in patients with and without HCV infection, in this study we have observed that, whereas 60% of the patients with LP and chronic HCV infection had a degree 3 inflammatory infiltrate, this occurred in only 16% of the patients with cutaneous LP without HCV infection. This suggests that HCV infection of keratinocytes may increase the severity of cutaneous LP lesions by a currently unidentified mechanism. This clearly warrants further investigation.

In conclusion, in this study we have demonstrated that HCV infects keratinocytes from cutaneous LP lesions and that the viral RNA is translated in these cells as demonstrated by the detection of HCV core protein in the skin biopsies. Although, however, we have detected HCV-RNA of negative polarity (which is usually accepted as an indicator of HCV replication), we cannot affirm that HCV replicates in keratinocytes, as the negative polarity viral RNA may be the result of an abortive transcription of the HCV-RNA. So, further studies are needed to provide direct evidence of HCV

replication in keratinocytes. On the other hand, the percentage of HCV-infected keratinocytes in patients with chronic hepatitis C was significantly higher in patients with cutaneous LP than in patients with healthy skin. This finding suggests that HCV infection of keratinocytes is involved in the pathogenesis of cutaneous LP in patients with chronic HCV infection; however, more studies are required to confirm this hypothesis.

This work has been supported by a grant from the Fundación Mapfre Medicina

REFERENCES

- Agnello V: The etiology and pathophysiology of mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection. *Springer Semin Immunopathol* 19:111–129, 1997
- Agnello V, Abel G: Localization of hepatitis C virus in cutaneous vasculitic lesions in patients with type II cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 40: 2007–2015, 1997
- Agnello V, Abel G, Knight GB, Muchmore E: Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. *Hepatology* 28:573–584, 1998
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang Q-X: Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12766–12771, 1999
- Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Casqueiro M, *et al*: Detection of hepatitis C virus replication by in situ hybridization in epithelial cells of anti-HCV positive patients with and without oral lichen planus. *Hepatology* 32:97–103, 2000
- Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, *et al*: In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 158:259–264, 2001
- Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P, Brocchetto R, Garcino-Demo P, Ghisetti V: Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. *J Oral Pathol Med* 25:527–533, 1996
- Clarke B: Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 78:2397–2410, 1997
- Di Bisceglie AM: Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 26(Suppl. 1):34S–38S, 1997
- Doutre MS: Hepatitis C virus-related skin diseases. *Arch Dermatol* 135:1335–1339, 1999
- Erkek E, Bozdogan O, Olut AI: Hepatitis C virus infection prevalence in lichen planus. Examination of lesional and normal skin of hepatitis C virus-infected patients with lichen planus for the presence of hepatitis C virus RNA. *Clin Exp Dermatol* 26:540–544, 2001
- Granstein RD: Photoimmunology. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, *et al* (eds). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 5th edn. New York: McGraw-Hill, 1999, pp 1562–1573
- Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, Abrams DI, Conant MA, Petersen V, Freese UK: Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral “hairy” leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 313:1564–1571, 1985
- Hadziyannis SJ: Skin diseases associated with hepatitis C virus infection. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 10:12–21, 1998
- Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakawara M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9524–9528, 1990
- Madejón A, Manzano ML, Arocena C, Castillo I, Carreño V: Effects of delayed freezing of liver biopsies on the detection of hepatitis C virus RNA strands. *J Hepatol* 32:1019–1025, 2000
- Mangia A, Andriulli A, Zenarola P, Lomuto M, Cascavilla I, Quadri R, Negro F: Lack of hepatitis C virus replication intermediate RNA in diseased skin tissue of chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 59:277–280, 1999
- Mason A, Wick M, White H, Perrillo M: Hepatitis B virus replication in diverse cell types during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 18:781–789, 1993
- Nagao Y, Sata M, Tanikawa K, Itho K, Kameyama T: Lichen planus and hepatitis C virus in Northern Kyushu region of Japan. *Eur J Clin Invest* 25:910–914, 1995
- Rodríguez-Iñigo E, de Bartolomé J, Lucas S, *et al*: Histological damage in chronic hepatitis C is not related to the extent of the infection in the liver. *Am J Pathol* 154:1877–1881, 1999
- Sugerman PB, Savage NW, Zhou X, Walsh LJ, Bigby M: Oral lichen planus. *Clin Dermatol* 18:533–539, 2000
- Zhu J: Cytomegalovirus infection induced expression of 60 KD/Ro antigen on human keratinocytes. *Lupus* 4:396–406, 1995